

# Nova abordagem ao diagnóstico da Síndrome de Alport: pesquisa da cadeia $\alpha 5$ do colagénio tipo IV na pele

Fernando Teixeira e Costa, Maria João Galvão, Fernanda Carvalho

Laboratório de Morfologia Renal. Serviço de Nefrologia.  
Hospital de Curry Cabral. Lisboa

## RESUMO

Em 2000, os autores iniciaram no Serviço de Nefrologia do Hospital de Curry Cabral, um protocolo de avaliação do papel do estudo imunopatológico da biópsia cutânea no diagnóstico da Síndrome de Alport (SA).

A SA é uma doença hereditária, secundária a um defeito do colagénio tipo IV (col. IV), principal componente das membranas basais. O col. IV é constituído por 6 cadeias distintas ( $\alpha 1$  a  $\alpha 6$ ). A cadeia  $\alpha 5$  está presente nas membranas basais glomerulares e da epiderme

(MBE). Em cerca de 85% dos casos de SA (forma de transmissão ligada ao cromossoma X) verifica-se uma alteração da cadeia  $\alpha 5$ , com consequente ausência ou intermitência desta cadeia, na MBE.

O objectivo deste trabalho foi pesquisar a presença da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV na MBE, e consequentemente avaliar o papel da biópsia cutânea no diagnóstico da SA. Para o efeito estudámos as biópsias cutâneas de dezanove indivíduos pertencentes a seis famílias distintas. Em cada uma das famílias havia pelo menos um indivíduo com história de SA. As biópsias cutâneas foram avaliadas por método de imunofluorescência indirecta, com antisoros dirigidos às cadeias  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 5$  do col. IV. No padrão normal há a presença das cadeias  $\alpha 5$  e  $\alpha 1$  e ausência de  $\alpha 3$  na MBE.

Recebido em: 11/03/2003

Aceite em: 08/06/2004

Verificou-se a ausência de  $\alpha 5$  na MBE em quatro homens com SA enquanto que um caso de SA apresentou um padrão positivo. Nas mulheres com SA verificámos a intermitência da  $\alpha 5$ . Nas sintomáticas, mas sem doença, obtivemos um padrão de intermitência da  $\alpha 5$  em três casos e um padrão positivo em três casos. Nas três mulheres assintomáticas, os padrões foram igualmente positivos. Em todos os espécimes biópticos verificou-se a presença de  $\alpha 1$  (controlo positivo) e a ausência de  $\alpha 3$  (controlo negativo).

Realçamos o valor da biópsia cutânea no diagnóstico da SA. Este método é particularmente relevante no homem, onde a ausência da  $\alpha 5$  na MBE determina o diagnóstico da SA com forma de transmissão ligada ao cromossoma X. Nas mulheres verificam-se dois padrões possíveis, positivo ou intermitente. A intermitência estará relacionada com a presença de SA ou estado portador. Assim consideramos que a biópsia cutânea deverá ser o primeiro passo na marcha diagnóstica para a SA em qualquer doente em que se suspeite desta patologia.

**Palavras chave:** Síndrome de Alport, biópsia cutânea, cadeia  $\alpha 5$  do colagénio tipo IV.

## SUMMARY

### **The role of skin biopsy in the diagnosis of Alport syndrome: study of COL4A5 distribution in epidermal basement membrane**

To date, diagnosis of Alport Syndrome (AS) is based upon clinical features and the ultrastructural findings in the kidney biopsy. In 85% of all AS cases (X-linked) there is an abnormality in type IV collagen  $\alpha 5$ -chain (COL4A5), with

absence or mosaic pattern in the epidermal basement membrane (EBM).

The aim of our work was to evaluate the role of skin biopsy in the diagnosis of AS. Punch skin biopsy specimens were obtained from 19 individuals out of 6 families in which there was at least one case of AS. Immunohistochemical analysis of skin biopsies was performed using monoclonal antibodies against COL4A1, COL4A3 and COL4A5. Sections of controls and patients were positive for COL4A1, with an uninterrupted staining pattern of the EBM, and negative for COL4A3. Males with AS had no staining for COL4A5 in four cases and in one case had a positive staining. All females with AS (or with renal failure) had an intermittent COL4A5 pattern. Females with haematuria and/or deafness but no renal failure displayed an intermittent COL4A5 pattern in 3 cases and a positive pattern in 3 cases. All symptom less female were positive for COL4A5. In conclusion we think that skin biopsy findings appear to be particularly relevant in males, where the absence of COL4A5 establishes the diagnosis of AS. In females an intermittent pattern correlates with either AS or the carrier state. The meaning of a positive pattern in females remains to be clarified. Our findings confirm the previously described value of skin biopsy in the diagnosis of AS.

**Key-words:** Alport syndrome, skin biopsy, type IV collagen  $\alpha 5$ -chain.

## INTRODUÇÃO

A Síndrome de Alport (SA) é uma entidade clínica, hereditária, que cursa com glomerulonefrite não-imune, hematurica e evolutiva, caracterizada ultraestruturalmente por membrana basal glomerular com espessamento

progressivamente irregular e lamelação, que frequentemente se associa a surdez neuro-sensorial e alterações oculares<sup>1</sup>. A SA é a nefropatia hereditária com atingimento glomerular mais frequente<sup>2</sup>. A prevalência anual provável, definida para esta entidade, é de 1 caso em 50.000 nascimentos<sup>3</sup>. Os dados do USRDS (United States Renal Data System) de 1999 referem esta entidade como sendo responsável por cerca de 3% dos casos de insuficiência renal crónica terminal (IRCT) na população pediátrica e por cerca de 0.2% dos casos de IRCT na população adulta.

A SA é uma doença de transmissão hereditária e geneticamente heterogénea<sup>4</sup>. A forma de transmissão ligada ao cromossoma X ocorre em 85% dos casos, sendo em 15% autossómica (ligada ao cromossoma 2 - em 14% é recessiva e, provavelmente, em 1% é dominante)<sup>5,6</sup>. Apesar de a doença ser hereditária, nalguns casos (15%) não se encontra qualquer história familiar. Nestes casos, estaremos, provavelmente, face a mutações “de novo” ou perante formas autossómicas recessivas<sup>7,8</sup>. O que se verifica, então, no caso da SA, é que a mutação genética presente condiciona um defeito na codificação e consequente síntese de uma cadeia alfa ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  ou  $\alpha 5$ ) do colagénio tipo IV (col. IV). Consequentemente ocorre um defeito nas membranas basais, dado que o col. IV é um dos principais componentes dessas. Esta alteração é determinante no que respeita ao quadro clínico associado a esta doença. Assim, a distribuição normal das cadeias a do col. IV é crucial na determinação dos órgãos atingidos<sup>9</sup>.

As cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  estão presentes em todas as membranas basais, sendo a sua ausência incompatível com a vida.

As cadeias  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  estão presentes nas seguintes estruturas:

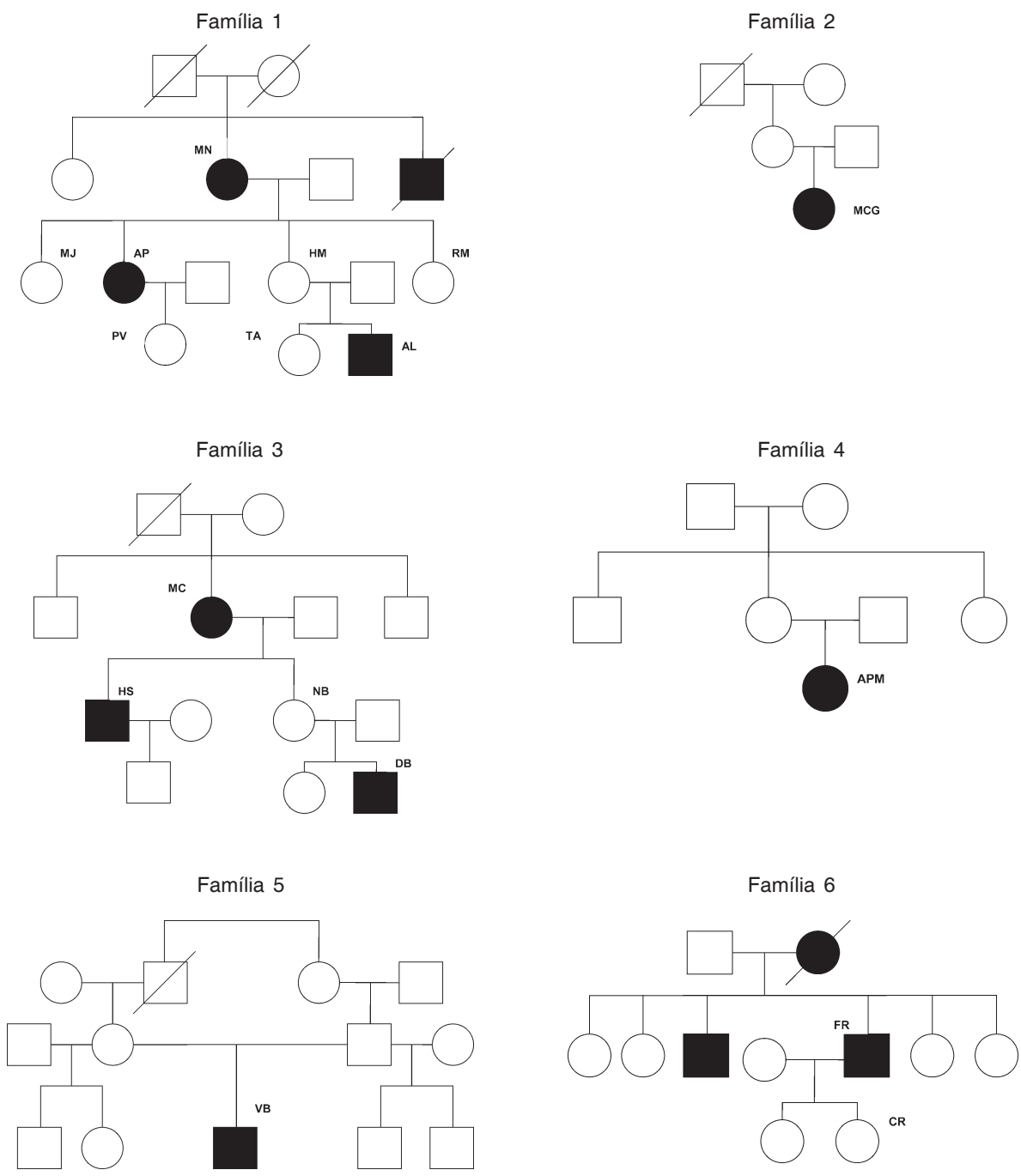
- Rim (membrana basal glomerular, cápsula de Bowman, tubo contornado distal e tubo colector).
- Córnea (stria vascularis).
- Olho (cristalino, membranas de Bruch e Descemet).
- Pulmão (membrana basal alveolar).
- Pele (a cadeia  $\alpha 5$  é a única das cadeias presentes na membrana basal da epiderme - MBE).

Nos últimos anos, tem vindo a ser dada uma importância crescente ao estudo imunohistoquímico das membranas basais, no que concerne ao conhecimento e distribuição das cadeias a do col. IV. Assim, a utilização de anticorpos monoclonais dirigidos contra as cadeias  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  do col. IV tem vindo a revelar-se essencial para o diagnóstico<sup>10</sup>. Este aspecto torna-se tanto mais relevante quando esta técnica poderá ser determinante uma vez que, em 85% dos casos de SA a forma de transmissão está ligada ao cromossoma X. Nessas situações a mutação ocorre ao nível do gene codificador das cadeias  $\alpha 5$  do col. IV<sup>11</sup>. Nestes casos poder-se-á obter o diagnóstico através da realização de biópsia cutânea<sup>5,10,12-15</sup>. Este procedimento é pouco invasivo e rápido na resposta, cerca de 48 horas.

Este trabalho tem como objectivos pesquisar a presença ou ausência da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV na MBE, e avaliar o papel da biópsia cutânea no diagnóstico da SA.

## DOENTES E MÉTODOS

Entre Janeiro de 2000 e Dezembro de 2002 realizámos e estudámos as biópsias cutâneas de dezanove indivíduos pertencentes a seis famílias distintas (Fig. 1a-f) que tinham pelo menos um indivíduo com diagnóstico de SA, de



**Fig. 1**  
 Indivíduo do sexo masculino □  
 Doente com Síndrome de Alport do sexo masculino ■  
 Indivíduo do sexo feminino ○  
 Doente com Síndrome de Alport do sexo feminino ●  
 Indivíduo falecido /

acordo com a presença de critérios definidos anteriormente<sup>1</sup>. Estudámos ainda, como controlos, a biópsia cutânea de dois indivíduos saudáveis, sem patologia cutânea.

As biópsias foram efectuadas na região deltoideia, utilizando um biótomo de 3 mm de diâmetro e avaliadas por método de imunofluorescência. Efectuaram-se cortes de congelação de 3  $\mu$ m que foram fixados em acetona durante 10 minutos, lavados com tampão fosfato (PBS/Tween – Labvision), desnaturados durante 5 minutos em solução fria de glicina/ureia à temperatura ambiente e lavados em água destilada. Seguidamente, foram incubados, durante 45 minutos, com os anticorpos monoclonais para as cadeias  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  do colagénio tipo IV. A incubação foi à temperatura ambiente com diluição de 1:20 para os antiseros contra as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  e 1:10 para o antisoro contra a cadeia  $\alpha 5$ . Procedeu-se posteriormente à lavagem em tampão fosfato seguida de incubação, durante 60 minutos, com antisoro secundário anti-mouse fluoresceínado e diluído a 1:20. A montagem das lâminas foi feita em meio aquoso.

Os anticorpos monoclonais contra as cadeias  $\alpha$  do colagénio tipo IV foram fornecidos pelo laboratório Wieslab – Suécia. O anticorpo secundário anti-mouse foi fornecido pelo laboratório Dako (FITC – Dako F 261).

Na observação utilizámos um microscópio Leica com fonte de luz emitida por lâmpada de vapor de mercúrio a alta pressão 100 W, com blocos de filtros para observação em luz azul (PB 420-480).

## RESULTADOS

A observação da pele dos indivíduos estudados permitiu definir padrões morfológicos de fluorescência das cadeias  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 5$  do col.

IV e averiguar a distribuição das cadeias nos três grupos de indivíduos: grupo com SA, grupo não doente, grupo controlo.

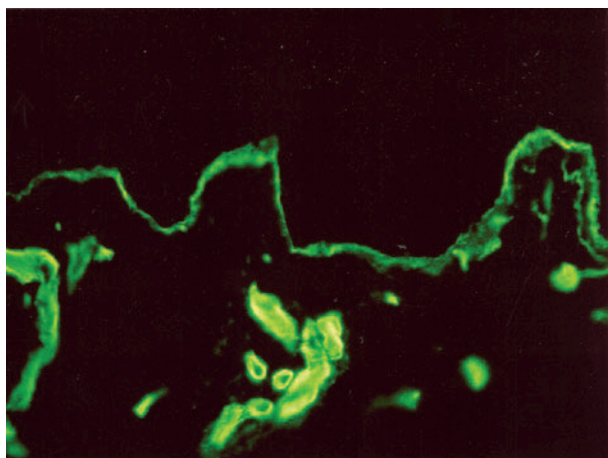
### ***Padrões morfológicos de fluorescência:***

- 1) Linear contínuo desenhando a MBE – positivo contínuo.
- 2) Linear descontínuo desenhando intermitentemente a MBE – positivo intermitente (ou em mosaico).
- 3) Ausência total da reacção fluorescente ao longo da MBE – negativo.

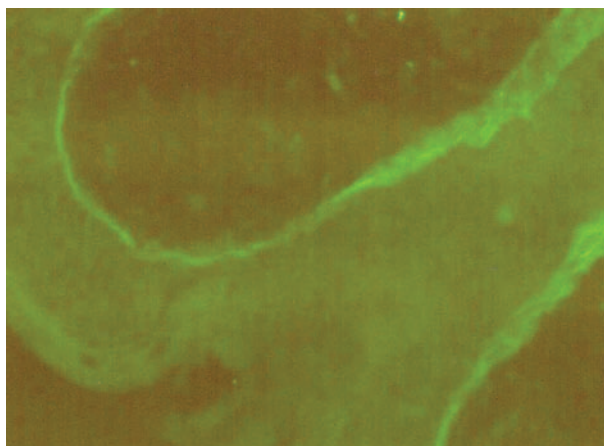
### ***Distribuição das cadeias $\alpha 1$ , $\alpha 3$ e $\alpha 5$ do col. IV nos três grupos estudados*** (Quadro I):

- 1) Cadeia  $\alpha 1$  do col. IV – esteve sempre presente em todos os indivíduos dos três grupos, com um padrão de fluorescência linear contínuo (positivo) ao longo da MBE (Fig. 2).
- 2) Cadeia  $\alpha 3$  do col. IV – esteve sempre ausente da MBE (negativo) em todos os indivíduos dos três grupos estudados.
- 3) Cadeia  $\alpha 5$  do col. IV – com a cadeia  $\alpha 5$  individualizámos três padrões de fluorescência: positivo contínuo, positivo descontínuo (ou intermitente) e negativo (Fig. 3, 4, 5).
  - 3.1 Positivo contínuo – este padrão foi encontrado em todos os indivíduos do grupo controlo, em seis indivíduos do sexo feminino (MJ, HM, RM, TA, DS, FPM) e num doente (com SA) do sexo masculino (VB).
  - 3.2 Negativo – este padrão foi observado em quatro doentes com SA do sexo masculino (AL, DB, HS, FR).
  - 3.3 Positivo descontínuo (intermitente) – este padrão definiu-se em oito casos de indivíduos do sexo feminino (AP, PV, MN, MCG, NB, MC, APM, CR).

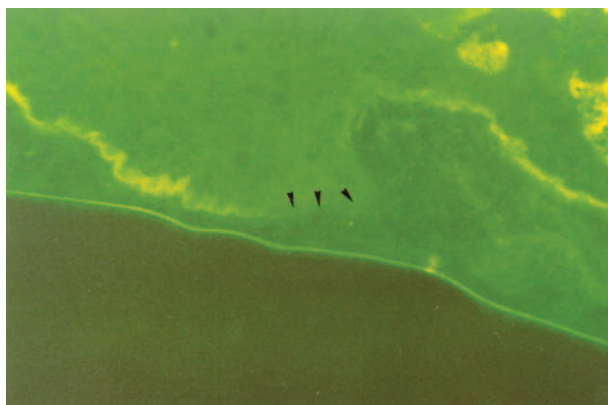




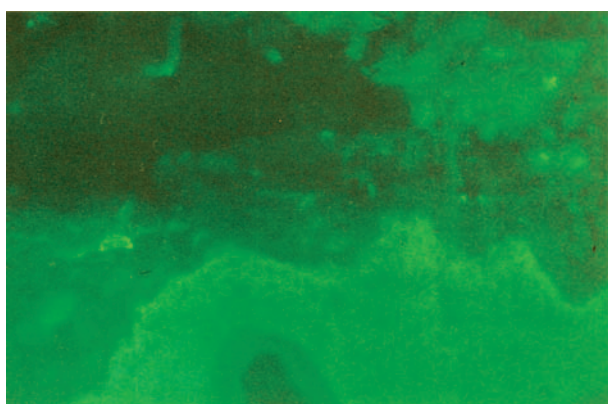
**Figura 2** – Presença de depósito da cadeia  $\alpha 1$  do col. IV ao longo da membrana basal da pele e nos vasos (IMF x 400).



**Figura 5** – Depósito da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV ao longo da membrana basal da pele (IMF x 400).



**Figura 3** – Depósito intermitente ou em mosaico da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV ao longo da membrana basal da pele. Zona negativa assinalada (IMF x 400).



**Figura 4** – Ausência de depósito da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV ao longo da membrana basal da pele (IMF x 400).

Neste padrão intermitente, apenas verificado em indivíduos do sexo feminino, foi possível identificar duas variantes quantitativas da expressão do depósito da cadeia  $\alpha 5$ :

3.3.1 Extensa ausência da cadeia  $\alpha 5$  ao longo da MBE – mais de 70% do comprimento da transição dermo-epidérmica não evidenciava a presença da cadeia  $\alpha 5$  (AP, MN, PV, APM, MCG, CR).

3.3.2 Pequenas ausências da cadeia  $\alpha 5$  ao longo da MBE, estando presente em mais de 70% do comprimento da MBE (NB, MC).

## DISCUSSÃO

O col. IV é um dos componentes das membranas basais. A sua função consiste, aparentemente, em facilitar a adesão da célula à membrana basal - interação com os receptores das integrinas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ <sup>16,17</sup>. A estrutura molecular do col. IV é constituída por uma hélice tripla com trímeros compostos por cadeias  $\alpha$  distintas (de  $\alpha 1$  a  $\alpha 6$ ). Estas podem-se organizar em heterotrímeros, em que as

**Quadro I**

Dados clínicos e imunohistoquímicos da população estudada

Família	Nome	Sexo	Idade	Clínica	Cadeia $\alpha 5$
1	AL	M	28	SA – Tx	Negativa
1	MJ	F	37	mH	Positiva
1	HM	F	50	mH	Positiva
1	RM	F	35	Ø	Positiva
1	TA	F	21	mH, Su	Positiva
1	AP	F	40	Hd	Intermitente
1	PV	F	20	mH	Intermitente
1	MN	F	71	Hd, Su	Intermitente
2	MCG	F	39	SA – Tx	Intermitente
2	DS	F	65	Ø	Positiva
3	DB	M	6	mH,Su	Negativa
3	HS	M	32	SA – Hd	Negativa
3	NB	F	27	mH, Pu	Intermitente
3	MC	F	53	Hd	Intermitente
4	APM	F	22	SA – Tx	Intermitente
4	FPM	F	45	Ø	Positiva
5	VB	M	21	SA – Tx	Positiva
6	FR	M	37	SA – Tx	Negativa
6	CR	F	10	mH	Intermitente
Controlo 1		F			Positiva
Controlo 2		M			Positiva

SA – Síndrome de Alport;  
Tx – transplante renal;  
Hd – hemodiálise;  
mH – microhematúria;  
Ø – assintomática;  
Su – surdez;  
Pu – proteinúria.

cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  se associam entre si ou uma associação entre  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$ . No que concerne à cadeia  $\alpha 6$ , esta associa-se à cadeia  $\alpha 5$ <sup>18</sup>. O col. IV é constituído por moléculas secretadas pelas células endoteliais e epiteliais. No rim, verifica-se que  $\alpha 1$  é sintetizada pela célula endotelial e,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  e  $\alpha 5$  são secretadas pelos podócitos<sup>19</sup>.

A SA é uma doença hereditária que em cerca de 85% dos casos apresenta uma forma de

transmissão ligada ao cromossoma X. O gene em questão, denominado COL4A5, localiza-se em Xq22.3 e é responsável pela codificação da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV. Desde que em 1990 Barker et al descreveram a primeira mutação neste gene, perto de 300 mutações foram já descritas associadas à SA<sup>20</sup>. Como tal, quando existe uma mutação em COL4A5 não ocorre integração da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV nas membranas basais glomerulares e epidérmicas. No caso desta patologia, verifica-se um defeito na codificação e consequente síntese de uma das cadeias a do col. IV levando quer à sua própria ausência na membrana basal glomerular, quer à ausência de incorporação, a esse nível, das restantes cadeias  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  ou  $\alpha 5$ , dado que as três cadeias formam uma rede conjunta<sup>19</sup>. Este aspecto é o processo patológico habitual, no entanto, num menor número de casos (menos de 30%), em que a mutação envolvida é menor (missense ou splicing), pode haver uma expressão parcial das cadeias  $\alpha$ <sup>19,21</sup>. Nessas situações, apesar de ocorrer uma mutação ligeira no gene codificador, a cadeia a respectiva está presente no tecido, no entanto, apresenta uma maior susceptibilidade para a sua degradação. Este processo é geralmente acompanhado por uma forma mais suave da doença renal.

Uma vez que a cadeia  $\alpha 5$  do col. IV se encontra presente na MBE, a análise imunohistoquímica da biópsia cutânea é um método rápido, acessível e mais fácil de avaliar as SA com transmissão ligada ao cromossoma X. Este aspecto torna-se mais evidente nas crianças muito jovens, nas quais o atraso da execução de uma biópsia renal, adia o diagnóstico da doença e, nas situações de insuficiência renal crónica, onde a biópsia renal não é exequível ou não permite fornecer dados diagnósticos<sup>5,10,12-15,22-24</sup>. Na maior parte dos estudos disponíveis na literatura actual, a biópsia cutânea

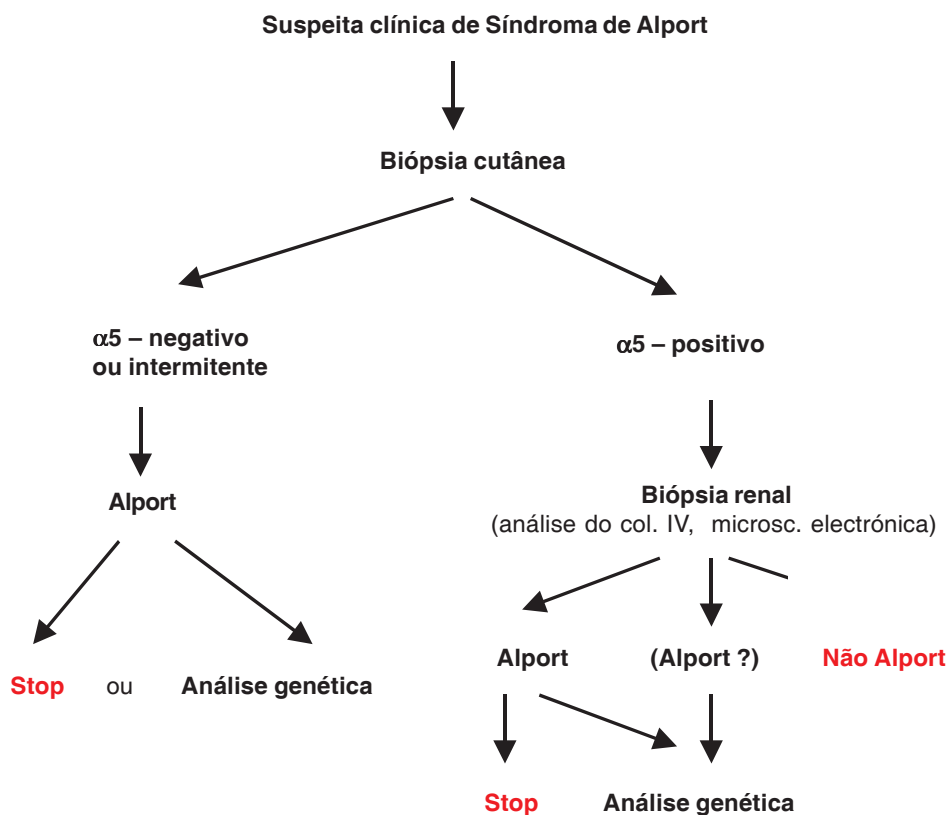


Figura 6 – Organograma para o diagnóstico de Síndrome de Alport

é tida como uma técnica muito específica (100%) para o diagnóstico de SA com forma de transmissão ligada ao cromossoma X, apresentando, no entanto, uma sensibilidade de apenas 75%<sup>27</sup>.

A avaliação da biópsia cutânea, no que concerne ao sexo masculino, pode fornecer dois resultados possíveis. Um resultado negativo, traduzindo uma ausência da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV na MBE. Neste caso estabelece-se o diagnóstico da SA. Por outro lado, pode-se obter um resultado positivo, no qual a cadeia  $\alpha 5$  do col. IV está presente ao longo de toda a MBE. Esta situação tem duas interpretações possíveis:

1. Ou não se trata da SA com forma de transmissão ligada ao X (poderá ser SA autosómico ou outra nefropatia).
2. Ou trata-se da SA com forma de transmissão ligada ao X, mas em que a mutação envolvida permite a síntese da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV (como já foi referido anteriormente esta situação representa cerca de 30% das mutações do gene COL4A5).

Como tal, sempre que deparamos com resultados inconclusivos como este, a investigação diagnóstica deverá continuar com a eventual execução de biópsia renal (Fig. 6).

No caso do sexo feminino, o estudo da



biópsia cutânea permite obter dois resultados. Ou a pesquisa da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV é positiva ou é intermitente (padrão em mosaico, ou seja, zonas da MBE em que se observa a presença de  $\alpha 5$  em alternância com zonas em que essas cadeias estão ausentes). Este último aspecto descrito é consequência do fenómeno de lyonização, em que, cada célula expressa apenas um dos cromossomas X. Numa fase muito precoce do desenvolvimento embrionário ocorre a inibição de um dos cromossomas sexuais. Apesar do que inicialmente se julgava, provavelmente essa inibição não será totalmente aleatória<sup>25,26</sup>. Há autores que referem que a expressão quantitativa da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV na MBE é inversamente proporcional à gravidade da doença<sup>26</sup>, ou seja, quanto menor a presença da cadeia  $\alpha 5$  na MBE mais grave poderá ser o envolvimento renal. Como tal, este aspecto poderá ser extremamente útil na definição do prognóstico da doença renal. Ainda segundo alguns autores, os achados de IMF obtidos, quer na pele quer no rim (membrana basal glomerular), poderão ser considerados patognomónicos da SA<sup>10</sup>. Assim, podemos referir que a presença de um padrão intermitente (em mosaico) determina o diagnóstico de portadora/doente (SA).

O resultado positivo para a cadeia  $\alpha 5$  na MBE, no sexo feminino confirma um resultado inespecífico e pode corresponder a SA autossómico, SA com forma de transmissão ligada ao cromossoma X ou outra nefropatia. Uma vez mais, e face à dúvida, a marcha diagnóstica deve prosseguir através da realização de biópsia renal (Fig. 6).

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho, permitiu verificar que no caso do sexo masculino, ocorreu a ausência de cadeia  $\alpha 5$  do col IV em quatro dos cinco indivíduos avaliados. Assim, em três indivíduos (AL, HS, FR) confirmou-se o diagnóstico de SA previa-

mente definido (com forma de transmissão ligada ao cromossoma X). Num indivíduo (DB) efectuou-se o diagnóstico de SA apenas com base na biópsia cutânea. Trata-se de uma criança de 6 anos de idade, com microhematúria, ligeira surdez neuro-sensorial e história familiar de SA. Face ao resultado da biópsia cutânea estabeleceu-se o diagnóstico, sendo dispensável a realização de biópsia renal, método bastante mais invasivo e com maior comorbilidade. No quinto doente masculino (VB – família 5), a pesquisa da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV na pele foi positiva. Este doente, apresenta diagnóstico prévio de SA. Perante este resultado positivo para a cadeia  $\alpha 5$  na MBE, a forma de transmissão envolvida poderá ser autossómica ou ligada ao cromossoma X. A história familiar de consanguinidade, torna francamente plausível a hipótese de estarmos face a um caso de SA autossómico recessivo.

No sexo feminino, a investigação permitiu-nos registar que, todas as mulheres com insuficiência renal crónica terminal (em hemodiálise ou submetidas a transplantação renal) apresentaram um padrão de intermitência da cadeia  $\alpha 5$  na MBE (SA com forma de transmissão ligada ao cromossoma X). Sugerimos que este aspecto esteja relacionado, de acordo com alguns estudos, com o facto de, quanto menor for a expressão da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV na pele, pior será o prognóstico renal<sup>26</sup>. No caso particular da família 1, verificou-se que as mulheres que desenvolveram insuficiência renal crónica terminal (AP, MN), apresentaram um padrão intermitente com grande ausência de  $\alpha 5$  na MBE (em mais de 70% do comprimento da MBE não se detectou a cadeia  $\alpha 5$ ). Este aspecto morfológico foi partilhado por outro elemento do sexo feminino da mesma família (PV), bem como de outra família (CR), que sugerimos, poderão apresentar um mau prognóstico renal. No que se refere ainda, a outros elementos do

sexo feminino de outras famílias com IRCT (APM e MCG), estas apresentaram igualmente um padrão intermitente com quase total ausência da cadeia  $\alpha 5$ . No entanto, este padrão não foi uniforme, dado que, num caso (MC – família 3), também em regime regular de hemodiálise, o padrão obtido foi intermitente com a presença da cadeia  $\alpha 5$  em cerca de 70% do comprimento da MBE. Por outro lado, o padrão intermitente com presença da cadeia  $\alpha 5$  em quase toda a extensão da MBE ( $\pm 90\%$ ) foi observado numa mulher (NB) com microhematúria e proteinúria ligeira, mas com função renal preservada e com história familiar de SA em outros elementos do sexo feminino. Sugerimos que este aspecto (presença da cadeia  $\alpha 5$  em mais de 70% do comprimento da MBE) possa definir um bom prognóstico renal.

Face aos resultados obtidos podemos concluir que a avaliação imunohistoquímica da biópsia cutânea, com o estudo da cadeia  $\alpha 5$  do col. IV permite estabelecer o diagnóstico de SA, sem recorrer a outros métodos. Uma pesquisa negativa da cadeia  $\alpha 5$  na MBE define o diagnóstico no sexo masculino. Um padrão intermitente da cadeia  $\alpha 5$  na MBE, no sexo feminino, define também o diagnóstico e poderá sugerir o prognóstico da doença renal, consoante a quantificação da presença da cadeia  $\alpha 5$  ao longo da MBE.

Consideramos que, perante os resultados obtidos e de acordo com os dados publicados na literatura, o estudo imunohistoquímico da biópsia cutânea deve assumir um papel essencial no diagnóstico da SA. Deve ser o primeiro método de estudo a efectuar, tal como sugerimos no organograma para o diagnóstico desta doença (Fig. 6).

#### Correspondência:

Dr. Teixeira e Costa  
Serviço de Nefrologia  
Hospital de Curry Cabral  
Rua da Beneficência  
1069-166 Lisboa  
Portugal  
e-mail: [teixeiraecosta@iol.pt](mailto:teixeiraecosta@iol.pt)

#### Referências

1. GREGORY MC, ATKIN CL. In Diseases of the Kidney and Urinary track, 7th edition. Lippincott Company 2001:589-619
2. GRÜNFELD JP, JOLY D. Inherited glomerular diseases. In Nephrology – Clinical Medicine Series. Mcgraw-Hill,2001:395-7
3. KASHTAN CE. Hereditary nephritis (Alport Syndrome). Up to date 2002. Vol 10 No 3
4. FEINGOLD J, BOIS E, CHOMPRET A, et al. Genetic heterogeneity of Alport syndrome. *Kidney Int* 1985;27:672-7
5. VAN DER LOOP F, MONNENS L, SCHRÖDER C, et al. Identification of COL4A5 defects in Alport's Syndrome by immunohistochemistry of skin. *Kidney Int* 1999;55:1217-24
6. JEFFERSON JA, LEMMINK HH, HUGHES AE. Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha3 and alpha4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:1595-9
7. TRYGGVASON K, ZHOU J, HOSTIKKA SL et al. Molecular genetics of Alport syndrome. *Kidney Int* 1993;43:38-44
8. MASSELLA L, RIZZONI G, DE BLASIS R, et al. De-novo COL4A5 gene in Alport's Syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:1408-11
9. KASHTAN CE, MICHAEL AF. Alport Syndrome. *Kidney Int* 1996;50:1445-63
10. PIRSON Y: Making the diagnosis of Alport's syndrome. *Kidney Int* 1999;56:760-75
11. BARKER DF, HOSTIKKA SL, ZHOU J et al. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990;248:1224-7
12. KASHTAN C, FISH AJ, KLEPPEL M, et al. Nephritogenic antigen determinants in epidermal and renal basement membranes of kindreds with Alport-type familial nephritis. *J Clin Invest* 1986;78:1035-44
13. KAGAWA M, KISHIRO Y, NAITO I, et al. Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport's syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:1238-41
14. GUBLER MC, KNEBELMANN B, BEZIAU A, et al. Autosomal recessive Alport syndrome: Immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int* 1995;47:1142-7.
15. YOSHIOKA K, HINO S, TAKEMURA T, et al: Type IV collagen 5 chain; Normal distribution and abnormalities in X-linked Alport syndrome revealed by monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1994;144:986-96

16. VANDENBERG P, KERN A, RIES A, et al. Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the  $\alpha$ 1b1 and  $\alpha$ 2b1 integrins. *J Biol Chem* 1991;113:1475-83
17. KRISHNAMURTI U, CHEN Y, MICHAEL A, et al. Integrin-mediated interactions between primary/T-sv40 immortalized human glomerular epithelial cells and type IV collagen. *Lab Invest* 1996;74:650-7
18. HUDSON BG, KALLURI R, TRYGGVASON K. Pathology of glomerular basement nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1994;3:334-9
19. HEIDET L, CAI Y, GUICHARNAUD L, et al. Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport Syndrome kidneys. *Am J Path* 2000;156:1901-10
20. JAIS JP, KNEBELMANN B, GIATRAS I, et al. X-linked Alport syndrome: Natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:649-57
21. NAITO I, KAWAI S, NOMURA S, et al. Relationship between COL4A5 gene mutation and distribution of type IV collagen in male X linked Alport syndrome. *Kidney Int* 1996;50:304-11
22. NAKANISHI K, YOSHIKAWA N, IJIMA K, et al. Immunohistochemical study of  $\alpha$ 1-5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis. *Kidney Int* 1994;46:1413-1421
23. TEIXEIRA E COSTA F, CARVALHO MF, GALVÃO MJ et al. Alport syndrome: Role of skin biopsy in the diagnosis (abstract). *J Am Soc Nephrol* 2001;12:561A
24. TEIXEIRA E COSTA, GALVÃO MJ, CARVALHO MF et al. Alport syndrome: Role of skin biopsy in the diagnosis (abstract). *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(Suppl 12):193
25. BROWN RM, BROWN GK. X chromosome inactivation and the diagnosis of X-linked disease in females. *J Med Genet* 1993;30:177-84
26. NAKANISHI K, IJIMA K, KURODA N, et al. Comparison of alpha5 (IV) collagen chain expression in skin with disease severity in women with X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1433-40
27. GRÜNFIELD JP. Contemporary diagnostic approach in Alport's syndrome. *Ren Fail* 2000;22:759-63