

## Un caso clinico di sindrome di Alport rapidamente progressiva in una giovane paziente

Nefrologo in corsia

**Lorenzo D'Elia<sup>1</sup>, Antonella Barreca<sup>2</sup>, Luciano Cencioni<sup>1</sup>, Martina Ferraresi<sup>3</sup>, Antonio Marciello<sup>3</sup>, Antonietta Rizzuto<sup>3</sup>, Paolo Maurizio Perosa<sup>3</sup>, Luisa Sandri<sup>3</sup>, Paola Vittoria Santirosi<sup>4</sup>**

1 UOS Nefrologia e dialisi Ospedale "Santa Maria della Stella" USL Umbria 2 Orvieto (TR), Italia

2 Anatomia Patologica, AOU Città della Salute e della Scienza, Torino, Italia

3 SS Nefrologia e dialisi ASLTO3, Ospedale "E. Agnelli" di Pinerolo (TO), Italia

4 UOS Nefrologia e Dialisi Ospedale "San Matteo degli infermi" Usl Umbria 2 Spoleto (PG), Italia



Lorenzo D'Elia

**Corrispondenza a:**

Lorenzo D'Elia

UOS Nefrologia e dialisi Ospedale "Santa Maria della Stella"

Località Ciconia 1

05018 Orvieto (TR)

E-mail: lorenzo.delia@uslumbria2.it

### ABSTRACT

La sindrome di Alport rappresenta una condizione clinica ereditaria caratterizzata da alterazioni polidistrettuali (sordità neuro sensoriale, oculari) associate ad ematuria e proteinuria. In considerazione della sua variabilità genetica e della molteplice sintomatologia, viene spesso diagnosticata in modo del tutto casuale e tardivo.

Lo scopo di questo lavoro è quello di focalizzare l'attenzione su questa patologia tramite un caso clinico. Verranno inoltre accennate le nuove possibilità terapeutiche relative alla patologia.

**PAROLE CHIAVE:** sindrome di Alport, danno renale, caso clinico, nuove terapie

## Introduzione

La sindrome di Alport (SA) è una patologia caratterizzata da sordità neuro sensoriale, anomalie oculari e progressiva perdita della funzione renale, che si manifesta prevalentemente con differenti sintomi come: macroematuria, ematuria microscopica associata a proteinuria, ematuria isolata e proteinuria, quest'ultima secondaria ad alterazioni costitutive della membrana basale glomerulare (MBG) [1]. I primi studi che affrontarono la caratterizzazione biochimica della MBG vennero condotti tra la metà degli anni '60 e l'inizio degli anni '70 su varie specie animali [2–3]. Attraverso queste osservazioni si documentò come le costituenti “macroscopiche” della membrana (lamina rara interna, lamina densa e lamina rara esterna) fossero costituite a livello ultrastrutturale da un intreccio di catene tra il collagene di tipo IV ed altre proteine come la laminina -521, l'agrina e proteoglicani solfati. A livello ultrastrutturale i filamenti di collagene IV sono composti da tre catene proteiche con struttura ad alfa elica che interagiscono tra loro attraverso specifici domini non collageni C-terminali [4]. Mutazioni nei geni codificanti per queste catene di collagene, in particolare i geni, COL4A3, COL4A4 e COL4A5, sono alla base delle diverse patologie ereditarie che interessano la MBG come la sindrome di Alport [5]. Sono noti anche altri geni non codificanti per catene di collagene implicati nell'eziopatogenesi della malattia come MYH9 e LAMB2, codificanti rispettivamente per la catena pesante della miosina IIA e per la laminina [6–7].

Le associazioni di filamenti costituite tra i vari sottotipi delle catene di collagene sono essenzialmente tre ovvero:  $\alpha1\alpha1\alpha2$ ,  $\alpha3\alpha4\alpha5$ ,  $\alpha5\alpha5\alpha6$  e presentano un'organizzazione in esameri distribuiti in diverse concertazioni nelle varie membrane dell'organismo. A livello della MBG prevalgono gli esameri costituiti dalle catene  $\alpha3\alpha4\alpha5$ . Le sei catene di collagene di tipo IV sono codificate da sei differenti geni distribuiti in coppie su vari cromosomi di cui riportiamo le principali localizzazioni cromosomiche. Come noto, i geni COL 4A1 e COL 4A2 sono mappati sul cromosoma 13, i COL 4A3 e COL 4A4 sul cromosoma 2 e COL 4A5 e COL 4A6 sul cromosoma X. In generale, le mutazioni che interessano i geni relativi alla sindrome di Alport presentano molteplice origine; se ne riportano di seguito le principali suddivise per gene [8–9].

### COL4A5

Varianti missenso (~45% delle varianti, 85% delle quali sono sostituzioni di glicina nella sequenza di ripetizione Gly-Xaa-Yaa del dominio collagenico della catena alfa5 (IV)); varianti del sito di giunzione (~20%); varianti non senso (~7%); grandi delezioni e inserzioni / duplicazioni (~12%) e altri grandi riarrangiamenti strutturali (inversioni e traslocazioni). Sono note più di 1168 varianti singole.

### COL4A4

Varianti missenso (~50% delle varianti, il 75% delle quali sono sostituzioni di glicina nella sequenza di ripetizione Gly-Xaa-Yaa conservata nel dominio collagenico della catena alfa4 (IV)); mutazioni frame shifts (piccole delezioni, piccoli inserimenti / duplicazioni) (~27%); varianti del sito di giunzione (~13%); varianti non senso (~9%) e delezioni maggiori. Sono note più di 268 varianti singole.

### COL4A3

Varianti missenso (~45% delle varianti, 85% delle quali sono sostituzioni di glicina nella sequenza di ripetizione Gly-Xaa-Yaa conservata nel dominio collagenico della catena alfa3 (IV)); mutazioni frame shifts (piccole delezioni, piccoli inserimenti / duplicazioni) (~20%); varianti non senso (~15%); varianti del sito di giunzione (~15%) e delezioni maggiori. Sono note più di 266 varianti singole. A questi meccanismi “classici” di mutazione va aggiunto nel sesso femminile la presenza della “lionizzazione” ovvero l'inattivazione casuale di uno dei due cromosomi X, il cui effetto è quello di determinare una distribuzione a mosaico della catena mutante del collagene IV  $\alpha5$  e conseguentemente un'ulteriore variabilità fenotipica della patologia [10].

Da un punto di vista eziopatogenetico l'origine della sindrome di Alport è stata chiarita in seguito all'osservazione che, nei soggetti affetti dalla malattia, gli anticorpi anti MBG non erano in grado di legarsi ai propri bersagli [11]. In questo modo è stata chiarita l'importanza delle alterazioni congenite del collagene di membrana nel determinismo della patologia sottolineandone il ruolo sulla corretta formazione strutturale della MBG.

Sebbene spesso si ritenga che la sindrome di Alport colpisca principalmente gli uomini, numerose evidenze suggeriscono un discreto interessamento anche nel sesso femminile, sovente sotto diagnosticato o non completamente indagato, responsabile nel 15-30% dei casi di insufficienza renale entro i 60 anni e perdita dell'udito entro la mezza età [12].

L'ereditarietà della patologia riconosce diversi meccanismi di trasmissione: X-linked nell'85% dei casi, autosomica recessiva nel 15% e molto più raramente autosomica dominante nel rimanente 5% dei casi [13].

La forma X-linked è secondaria alla presenza di varianti anomale del gene COL4A5 mappato sul cromosoma X, che codifica per la catena alfa-5(IV) del collagene IV [14]. Tale forma si associa sovente ad una storia familiare di ematuria (associata o meno a proteinuria) e insufficienza renale progressiva. Pur riscontrandosi spesso una forte familiarità, circa il 15% delle forme ereditate con modalità X-linked originano da mutazioni *ex novo* [15]. Da un punto di vista sintomatologico la presenza di ematuria microscopica rappresenta un aspetto quasi costante della malattia, riscontrandosi in tutti i maschi affetti e nel 98% delle femmine, mentre circa il 73% delle femmine affette presenta una associazione di proteinuria ed ematuria [16].

Nei soggetti di sesso maschile, l'insorgenza di proteinuria risulta essere assai precoce con comparsa di sintomi già a partire dalla prima infanzia che si accompagnano ad un progressivo deterioramento della funzione renale a partire dai 25 anni cui consegue progressione verso l'ESRD nel 90% dei casi a 40 anni [17]. Nelle donne invece la progressione verso un ESRD in età precoce (<40 anni) è relativamente rara osservandosi in circa il 12% dei casi [18]. La sordità neurosensoriale rappresenta una caratteristica particolarmente frequente di questa patologia e interessa principalmente il sesso maschile. Nel sesso femminile, si stima che si possa osservare una sordità neuro sensoriale precoce in circa il 10% dei casi, tuttavia non è ancora chiaro quanto questo aspetto possa essere correlato con una più rapida progressione verso l'ESRD. Nelle donne a differenza di quanto si osserva nel sesso maschile, le anomalie oculari risultano meno frequenti. Nelle forme associate ad una ereditarietà autosomica recessiva (ARAS), i genitori di bambini affetti sono necessariamente portatori di mutazioni in eterozigosi e presentano una sintomatologia simile alla forma X-linked. Questa forma deriva da difetti genetici localizzati a livello dei geni COL4A3 o COL4A4. I geni COL4A3 e COL4A4 codificano rispettivamente per la catena alfa-3(IV) (che contiene l'antigene Goodpasture) e la catena alfa-4(IV). Anche nei pazienti in cui si osserva un'ereditarietà autosomica dominante (ADAS), si osservano mutazioni a carico di COL4A3 e COL4A4 con manifestazioni cliniche, specialmente nei pazienti più giovani, apparentemente più lievi rispetto a quelle evidenziate nei soggetti con XLAS o con ARAS ma con insorgenza precoce rispetto a questi ultimi [19]. Sono suggestivi di una SA autosomica recessiva le seguenti caratteristiche:

- coinvolgimento di entrambi i sessi in egual misura nell'ambito della medesima famiglia,
- trasmissione della patologia da un soggetto di sesso maschile,
- consanguineità dei genitori,
- assenza o scarse alterazioni della funzionalità renale nei genitori di un paziente affetto da nefropatia evidente,
- comparsa in giovane donna di un quadro di IRC avanzata prima dei 20 anni di età.

Da un punto di vista epidemiologico la SA è da considerarsi una patologia rara essendo presente in meno di 1 individuo su 2000 [20]. Dati provenienti degli Stati Uniti documentano un'incidenza di circa 1 neonato su 50.000 [21] e una prevalenza della patologia nel 3% dei bambini con insufficienza renale cronica, con una incidenza variabile tra i bambini sottoposti a biopsia renale dall'1 al 12% [22–23]. Studi eseguiti nei paesi scandinavi, attribuiscono una prevalenza di 1 su 17.000 nelle aree meridionali della Svezia [24] e di 1 su 53.000 in Finlandia [25].

### Caso clinico

Descriviamo il caso clinico di una donna di 20 anni che, nel settembre 2020, si presentava alla nostra attenzione per progressivo peggioramento della funzione renale ed ipertensione arteriosa di difficile controllo farmacologico. Non venivano riferite patologie di rilievo in ambito familiare né anamnesi positiva per malattie renali.

La paziente, di origine straniera, era seguita abitualmente presso il policlinico Universitario di Tirana presso cui sono stati avviati i primi accertamenti diagnostici che successivamente sono stati portati alla nostra attenzione.

Attraverso l'anamnesi remota, si apprendeva della comparsa di ipoacusia sviluppatasi progressivamente a partire dal 2015 cui si associava, dal 2019, l'insorgenza di ipertensione arteriosa. Si prendeva visione di una ecografia addominale che documentava reni di volume conservato (diametro trasverso: rene destro 11,4 cm; rene sinistro 10,4 cm) con parenchima minimamente iperecogeno e lieve riduzione della componente cortico-midollare in assenza di stenosi delle arterie renali.

A partire dal giugno 2020, subentrava comparsa di cefalea associata a severi episodi ipertensivi, anemia (Hb 7,8 g/dl) e peggioramento della funzione renale (Creatinina sierica 2,8 mg/dl; urea: 100 mg/dl); peggioravano ulteriormente il mese successivo (Creatinina 3,5 mg/dl; urea 144 mg/dl; Uricemia 6,9 mg/dl), associandosi alla comparsa di proteinuria in range nefrosico (3620 mg/24h) non riscontrata precedentemente.

Veniva quindi avviata terapia antiproteinurica con Ramipril 10 mg. Presso il Policlinico Universitario di Tirana, sono stati inoltre eseguiti ulteriori accertamenti strumentali che documentavano la presenza di un danno sistemico, evidenziandosi all'ecocardiogramma un quadro di ipertrofia ventricolare sinistra e, ad un esame del *fundus oculi*, una retinopatia di I grado.

Data la difficoltà ad accedere ad ulteriori indagini diagnostiche e strumentali ed in considerazione del fatto che i familiari della paziente risiedevano stabilmente in Italia, si provvedeva ad eseguire un ricovero presso il nostro reparto di nefrologia di Pinerolo per ulteriori accertamenti.

All'ingresso in reparto, si confermava un quadro di significativo decremento della funzione renale con Creatinina sierica pari a 4,65 mg/dl, azotemia 129,3 mg/dl e filtrato glomerulare stimato con CKD-EPI pari a 12 ml/min. Era inoltre presente un quadro di deficit proteico (5,9g/dl), in presenza di proteinuria (3110 mg/24h) ed iperkaliemia (6 mmol).

L'assetto lipidico appariva alterato con ipertrigliceridemia (220 mg/dl) ed ipercolesterolemia (224 mg/dl). All'elettroforesi delle proteine sieriche si osservava un incremento percentuale nella frazione alfa1 (4,6%). Si procedeva ad una valutazione immunologica che risultava nella norma.

PARAMETRO	RISULTATO	INTERVALLO RIFERIMENTO
Reuma TEST (Immuno-turbidimetrico)	<14	<14
Complemento C3 (Immuno-turbidimetrico)	96 mg/dl	82-180 mg/dl
Complemento C4 (Immuno-turbidimetrico)	32 mg/dl	10-40 mg/dl
Ab Anti Nucleo (ANA) IFI su cellule HEp2	Assenti	Assenti: <1/80 Bassa positività: 1/80 Media positività: 1/160-1/320 Alta positività: >1/640
Ab ANTI Ds-DNA (IFI su Chritidia Luciliae)	Assenti	Assenti
Ab ANTI CITOPLASMA DEI NEUTROFILI (IFI su neutrofili fissati)	Assenti	Assenti
Ab ANTI PR3 (EliA sensibile)	0,01 IU/ml	Negativo: <2 Dubbio: >2 <3 Positivo: >3
Ab ANTI MPO (EliA sensibile)	0,01 IU/ml	Negativo <3,5 Dubbio >3,5 <5 Positivo > 5
Ab ANTI ENA (EliA)	Assenti	Assenti

**Tabella I: Pannello autoimmunitario della paziente**

Venivano inoltre valutati gli anticorpi rivolti contro SS-A/RO, SS-B La, SM, U1RNP, JO1, SCL70 e proteina B centromerica che risultavano tutti negativi. La ricerca dei marcatori virali HbsAG, HCV ab e HIV ab risultava negativa, la paziente tuttavia non risultava vaccinata per HBV (HBsAb <3 µL/mL). A completamento diagnostico, si indagava l'equilibrio acido base tramite EGA arterioso che risultava sostanzialmente conservato (PH 7,4 PCO<sub>2</sub> 40 mmHg; HCO<sub>3</sub>- 22 mmol).

In considerazione del quadro clinico, della giovane età e del rapido peggioramento della funzione renale, appariva giustificata, previo consenso, l'esecuzione di agobiopsia ecoguidata. Si provvedeva dapprima ad eseguire un nuovo accertamento ecografico che risultava sostanzialmente compatibile con il precedente. Infatti, si evidenziavano "reni di dimensioni conservate, con parenchima di aspetto iperecogeno d'ambo i lati e libere le vie urinarie". Si provvedeva quindi all'accertamento biptico, che veniva eseguito al polo inferiore del rene sinistro con il prelievo di due frustoli parenchimali per studio anatomopatologico. Veniva quindi eseguito un controllo ecografico post procedurale, che "escludeva la presenza segni di raccolte perirenali e/o di FAV indesiderate". Il campione raccolto veniva quindi inviato presso l'UO di Anatomia Patologica della AOU Città della Salute e della Scienza di Torino ed il referto isto-patologico, evidenziava un quadro di sclerosi glomerulare che interessava il 70% dei corpuscoli del Malpighi presenti nel campione (per un 40% con sclerosi di tipo globale e per un 30% con sclerosi di tipo segmentario) associato ad un discreto danno tubulo interstiziale cronico come evidenziato nella figura sottostante (Figura 1).

La Biopsia renale dimostrava tre glomeruli (3/10) comprendenti aree segmentarie di sclerosi o scleroso-ialinosi (Figura 1A; PAS B Tricromica di Masson), tipo forma classica, interessanti circa dal 15 al 30% delle anse capillari ed in rapporto alle quali erano evidenti sinechie flocculo-capsulari. Si osservava inoltre una discreta atrofia tubulare con associata discreta fibrosi interstiziale (Figura 1C; PAS D Tricromica di Masson). L'immunofluorescenza eseguita su materiale congelato evidenziava grossolani ammassi in verosimili aree di sclerosi con una positività spiccata per C3 (+++), tale reperto si configurava come un intrappolamento aspecifico con aspetto focale e segmentario compatibile con quanto evidenziato alla M.O. (Figura 1E). La catena Alfa-5 del COLIV risultava invece assente in

corrispondenza delle membrane basali glomerulari e conservata a livello della capsula del Bowmann (Figura 1F) e della membrana basale dei tubuli distali (Figura 1G) compatibile con Sindrome di Alport.

È stata quindi eseguita un'indagine ultrastrutturale su materiale fissato in gluteraldeide, in cui non si repertavano glomeruli e si procedeva pertanto ad esame ultrastrutturale sul materiale previamente congelato per l'immunofluorescenza. La microscopia elettronica (ingrandimento 7000x; Figura 1H), con i limiti imposti dalla presenza di artefatti da preservazione del materiale (congelato per IF), dimostrava tratti di membrane basale glomerulari di aspetto disomogeneo per slaminamento e vaga reticolazione della lamina densa con profilo esterno talora irregolare. Si confermava inoltre l'assenza di depositi elettrondensi.

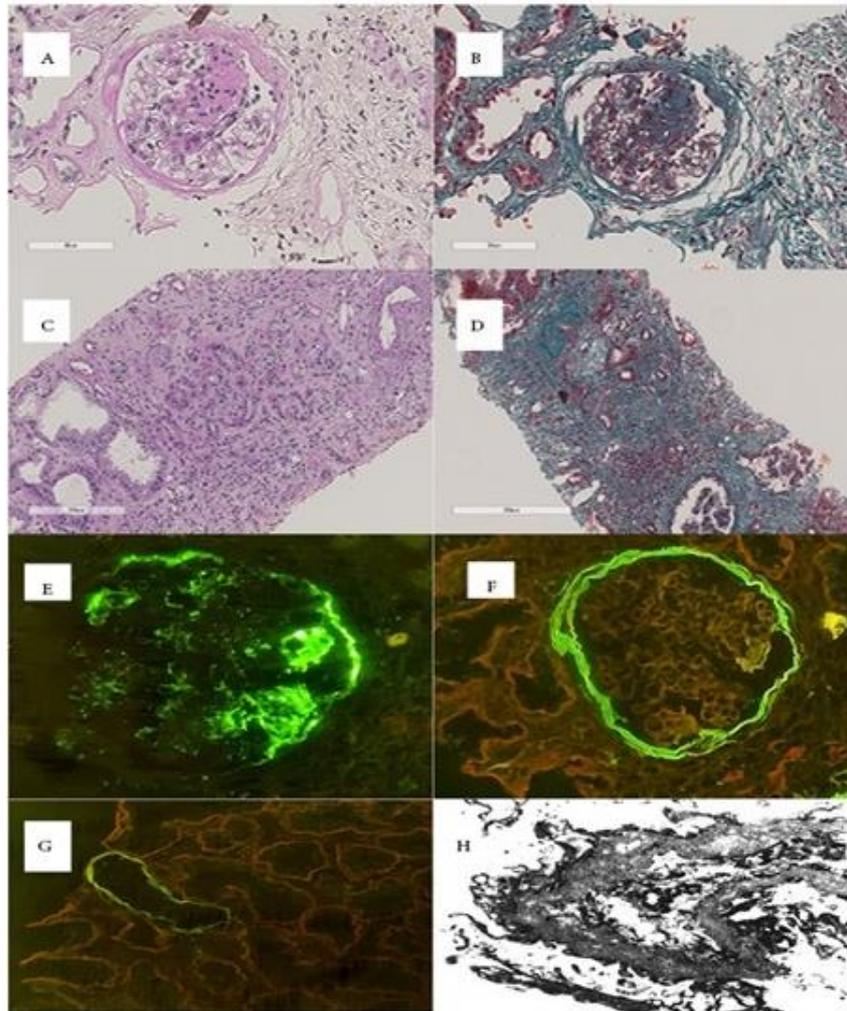


Figura 1: Biopsia renale della paziente

Durante la degenza si osservava un lieve miglioramento degli indici di funzione renale (Creatinina sierica 3,7 mg/dl; azotemia 118 mg/dl) ma, dopo la rimodulazione della terapia antiproteinurica resasi necessaria a causa dell'iperkaliemia, si osservava un incremento della proteinuria delle 24 ore fino a 3,8g/24h. Veniva inoltre documentato un quadro di iperparatiroidismo secondario (PTH 104,5 pg/ml) con fosforemia 4,6 mg/dl; Calcemia 8,6 mg/dl.

Stabilita la diagnosi, la paziente veniva quindi indirizzata ad un follow-up nefrologico stretto, finalizzato anche all'esecuzione in tempi rapidi degli accertamenti clinico-strumentali necessari per inserimento in lista trapianto preemptive.

Si provvedeva tuttavia ad eseguire anche uno studio vascolare finalizzato al confezionamento di FAV e un colloquio con equipe specializzata nel trattamento peritoneale in considerazione della rapida

progressione della patologia.

Presso L'AOU dell'Università di Torino è stata inoltre eseguita una consulenza genetica al fine di individuare con esattezza il genotipo associato, analizzando un pannello di geni associati a sindrome di Alport (COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, MYH9) tramite metodica NGS (Next Generation Sequencing) come evidenziato nella figura sottostante.

<b>Struttura richiedente:</b> S.C. Nefrologia – Ospedale Civile E. Agnelli					
<b>Medico Richiedente:</b> Dr. L. Sandri					
<b>Data prelievo:</b> 04/03/2021		<b>Data accettazione:</b> 04/03/2021		<b>Data analisi DNA:</b> 25/03/2021	
<b>Campione:</b> sangue		<b>Tipo di test:</b> sequenziamento NGS di esoma clinico.			
<b>Indicazione Clinica:</b> sospetta sindrome di Alport con IRC in stadio avanzato					
<b>ANALISI DI SEQUENZIAMENTO NGS DI UN PANNELLO DI GENI RENALI</b>					
<b>Geni analizzati in base all'indicazione clinica:</b> l'analisi è stata effettuata su un pannello di geni associati a sindrome di Alport (COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, MYH9).					
<b>Metodi:</b> NGS TruSight One Expanded					
<b>Dati tecnici dell'analisi:</b>					
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Profondità media di sequenziamento: 345.0 x</li> <li>• Lunghezza dei frammenti: 233 bp</li> <li>• Copertura regioni target ad almeno 20x: 99.49 %</li> </ul>					
<b>RISULTATI</b>					
Gene	Sequenza di riferimento	Regione	Variante identificata	Genotipo	Interpretazione
COL4A4 Chr 2q36.3	NM_000092.5	Esone 20	Delezione di 52 NT Chr2: 227958837- 227958889	n.a	C4
COL4A4 Chr 2q36.3	NM_000092.5	Esone 20	Possibile delezione dell'intero esone	Eterozigote	C3-VUS

**Figura 2: analisi genetica della paziente**

L'analisi ha individuato a livello di COL4A4:

- Una delezione di 52 nucleotidi nell'esone 20 del gene COL4A4 (NM 000092.5) classificata come patologica (C5) dal software di analisi. Questa variante alternativa, sebbene più rara, è già nota in letteratura [26] per essere associata alla sindrome di Alport. Si segnala che la variante riscontrata nella paziente risulta nella perdita del sito di splicing a livello dell'esone 20 con possibile impatto sullo splicing stesso.
- Una possibile delezione in eterozigosi dell'intero esone 20 del gene COL4A4 (NM 000092.5) classificata come di incerto significato (C3-VUS).

Tali reperti apparivano compatibili con il fenotipo della paziente e si associavano a Sindrome di Alport autosomica recessiva di tipo 2 (OMIM 203780). Nei mesi successivi al ricovero, per il progressivo deterioramento della funzione renale, la paziente veniva avviata a trattamento dialitico tramite posizionamento di catetere peritoneale e si procedeva con l'esecuzione degli accertamenti clinico-strumentali necessari per un rapido inserimento in lista trapianto.

### Metodologia utilizzata per l'analisi genetica

Per l'analisi genetica è stata utilizzata una preparation library e un sequenziamento mediante sintesi su piattaforma Illumina (kit TruSight One Expanded e lettura su NEXTSEQ550). L'analisi bioinformatica prevedeva l'uso dei software BWA Aligner 1.1.4 o DRAGEN Enrichment 3.6.3. Le sequenze sono state allineate al genoma umano di riferimento GRCh37 che permette la chiamata di varianti a singolo nucleotide e strutturali. Per l'analisi delle varianti è stato utilizzato il software Illumina Variant Interpreter. Per la selezione dei geni associati all'indicazione clinica sono stati

utilizzati i database OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), PanelApp e Orphanet. Sono state considerate esclusivamente varianti con profondità di lettura >20x e parametri di qualità adeguati [27]. Le varianti sono annotate secondo la nomenclatura HGVS [28] e classificate secondo le linee guida dell’American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [29]. Per il processo di classificazione e d’interpretazione delle varianti sono stati consultati specifici database OMIM, VEP, ClinVar, Varsome, GnomAD, LOVD, COSMIC, dbSNP, ExAC, EVS e ClinGen.

## Discussione

La sindrome di Alport è una patologia ereditaria caratterizzata da una progressiva perdita della funzionalità renale secondaria ad anomalie della MBG. A causa dell’elevata distribuzione delle catene di collagene nei vari distretti corporei, ben si comprende come tale sindrome presenti una sintomatologia particolarmente estesa, associando a sintomi propri di un danno renale (come ematuria persistente, insufficienza renale), alterazioni sensoriali (perdita dell’udito, lenticono e macchie retiniche) [30], manifestazioni rare come leiomiomi specie in sede esofagea e bronchiale [31] ed aneurismi aortici toraco-addominali specie nei soggetti maschili [32–33]. Riportiamo nella seguente tabella le principali manifestazioni diagnostiche della malattia elaborate dal working Group on Alport Syndrome della Società di nefrologia pediatrica giapponese [34].

<b>Manifestazioni Primarie</b>
· Ematuria Persistente (durata superiore ai 3 mesi confermata in almeno due occasioni)
<b>Manifestazioni Secondarie</b>
· Mutazioni genetiche delle catene del collagene tipo IV (mutazioni in omozigosi o eterozigosi di COL4A3- COL4A3A o emizigosi maschile o eterozigosi femmine per COL5A4)
· Anomala espressione del collagene tipo IV
· Anomalie specifiche della MBG
<b>Manifestazioni Accessorie</b>
· Storia familiare di nefropatia
· Sordità neurosensoriale bilaterale
· Anomalie oculari (lenticono anteriore, cataratta sub capsulare, macchie retiniche, distrofia polimorfica posteriore)
· Leiomiomatosi diffusa

**Tabella II: Manifestazioni primarie, secondarie e accessorie della sindrome di Alport**

La patologia si presenta con una progressione “multi-steps”, inizialmente caratterizzata da ematuria isolata, cui fa seguito dapprima una albuminuria moderata, quindi una proteinuria grave e infine il declino della GFR. L’intervallo tra varie manifestazioni cliniche è variabile da paziente a paziente ed è influenzato principalmente dal sesso e dal genotipo COL4A. Anche la progressione è variabile, da un andamento molto rapido che richiede una terapia sostitutiva renale nell’adolescenza o nella prima età adulta, ad uno molto lento caratterizzato dal mantenimento di una funzione renale pressoché normale per lunghi periodi [35]. Nella popolazione pediatrica, le principali cause di ematuria glomerulare isolata persistente, con livelli normali di complemento sierico, comprendono la nefropatia da immunoglobulina A (IgAN) e le condizioni associate alle varianti dei geni COL4A3, COL4A4 e COL4A5, che, come descritto, possono essere raggruppati come sindrome di Alport. Queste diagnosi hanno implicazioni diverse. I bambini affetti da IgAN che si presentano con ematuria

isolata hanno solitamente una malattia stabile per molto tempo, mentre al contrario quelli affetti da SA presentano un rischio significativo di progressione verso proteinuria conclamata, CKD e insufficienza renale terminale. Poiché tale rischio può essere in parte modificato attraverso con un intervento precoce, ben si comprende come sia necessaria una diagnosi precisa e precoce anche alla luce delle notevoli manifestazioni sistemiche della malattia.

Per consentire un inquadramento diagnostico affidabile, l'Alport Syndrome Classification Working Group ha recentemente proposto un nuovo schema classificativo, fondato principalmente su criteri genetici, clinici e molecolari invece che soltanto su tratti istologici e clinici, con l'obiettivo di limitare il più possibile la dipendenza dal sesso, dall'età o da varianti genetiche rare [36]. I risultati delle valutazioni genetiche dei pazienti con CKD consentirebbero, alla luce della nuova classificazione proposta, di inquadrare come affetti da SA numerosi pazienti per i quali la causa della malattia renale è rimasta misconosciuta o ritenuta secondaria ad altre condizioni più comuni, come ad esempio diabete di tipo 2 o ipertensione. In tal senso, uno studio del 2019 condotto da Groopman e collaboratori ha evidenziato che l'analisi del sequenziamento dell'esoma di specifiche regioni genomiche codificanti eseguita su una coorte di 3315 pazienti affetti da CKD, ha prodotto una diagnosi genetica in circa il 10% dei casi [37]. Tra questi pazienti, circa il 30% presentava mutazioni interessanti i geni COL4A3, COL4A4 o COL4A5. Anche Morinière e coll. [38] attraverso un'analisi di screening per mutazioni in COL4A3, COL4A4 e COL4A5 eseguita su 101 pazienti non imparentati tra loro con storia positiva per ematuria, ha documentato la presenza in circa il 20% dei casi di una ereditarietà autosomica dominante, con una frequenza decisamente superiore alla media per questa modalità di ereditarietà.

L'importanza del nuovo sistema classificativo proposto è particolarmente evidente anche alla luce delle nuove conoscenze relative all'eziopatogenesi della malattia, in cui appare sempre più importante il ruolo del "pathway" infiammatorio sul danno renale e la conseguente progressione verso l'ESRD. Recenti acquisizioni hanno infatti documentato il ruolo attivo delle cellule renali come cellule mesangiali, podociti e cellule tubulari, nella risposta infiammatoria cronica [39].

La biopsia (cutanea e /o renale) pur rivestendo un ruolo particolarmente importante nella diagnostica della malattia, deve essere affiancata da test genetici di conferma in modo anche da individuare le forme autosomiche dominanti e recessive in cui la trasmissione deriva da mutazione dei geni per le catene COL $\alpha$ 3 e  $\alpha$ 4 che non vengono espressi in sede cutanea ma unicamente renale [40]. La biopsia cutanea, quindi, risulta utilizzabile esclusivamente nelle forme X-linked di malattia e in cui si osserva la perdita dell'espressione lineare continua della catena  $\alpha$ 5(IV) lungo la giunzione dermo-epidermica [41].

Al momento non esiste una terapia specifica per la SA e i principali trattamenti effettuati sono perlopiù sintomatici. Il principale obiettivo terapeutico è spesso rappresentato dal rallentamento della progressione della CKD e dal contenimento della proteinuria, che viene ottenuto tramite l'utilizzo di farmaci bloccanti il sistema RAAS.

Le prime prove relative all'efficacia del blocco del sistema RAAS, sono state fornite da Proesmans e collaboratori su una piccola coorte pediatrica [42]; successivamente, Webb e collaboratori hanno dimostrato una buona risposta in termini di riduzione della proteinuria tramite l'utilizzo di sartani [43]. Sebbene l'uso degli ACE-I e dei sartani sia ampiamente diffuso nel controllo della proteinuria [44], nessuno studio clinico controllato randomizzato ha mai valutato la sicurezza e l'efficacia degli ACE-I o di una loro implementazione precoce nei pazienti pediatrici con SA. Un recente studio multicentrico di fase III in doppio cieco randomizzato e controllato con placebo, condotto da Gross e collaboratori potrebbe far luce sull'efficacia dell'uso precoce del ramipril nei bambini prima che sviluppino albuminuria [45]. Al momento sebbene esistano prove di sicurezza e relativa efficacia del

blocco esteso anche all'aldosterone nei pazienti affetti da SA, non tutti gli autori le considerano abbastanza forti da raccomandare tale condotta terapeutica routinariamente [46–47]. Un approccio poli-farmacologico volto ad un blocco pressoché completo del RAAS (definito triplo blocco ed ottenuto tramite l'uso sequenziale di ACE-I, sartani e spironolattone) è stato recentemente proposto da Mastrangelo e coll. [48], alla luce dei risultati ottenuti tramite un piccolo studio retrospettivo (dal 1995 al 2019) condotto su 26 pazienti con diagnosi certa di Alport, in cui se ne dimostrava la fattibilità e la relativa sicurezza, pur evidenziandosi la necessità di un costante monitoraggio della kaliemia. L'idea di introdurre un anti-aldosteronico è stata sviluppata con l'obiettivo di bypassare il cosiddetto fenomeno di fuga dell'aldosterone [49], fenomeno farmacologico noto della terapia con ACE-I o con sartani che alla lunga determina una progressiva riduzione dell'efficacia terapeutica.

Negli ultimi anni la ricerca di una terapia specifica per la SA è diventata oggetto di studio per molteplici ragioni:

- La patologia rappresenta un buon modello di CKD con proteinuria e fibrosi che può essere utilizzato anche per altre malattie;
- I farmaci approvati per questa malattia saranno farmaci “orfani” con conseguenti vantaggi come tempi di approvazione ridotti ed incentivi economici;
- Il numero di pazienti eleggibili è comunque notevole essendo la SA la seconda malattia genetica renale che causa ESRD dopo l'ADPKD;
- I pazienti, in considerazione della giovane età, presentano spesso poche comorbidità associate;
- Non esiste un trattamento specifico per la malattia con conseguente esclusività di mercato [50].

In considerazione delle sempre maggiori evidenze del ruolo dello stato infiammatorio sulla genesi della patologia, il bardoxolone è stato indagato come possibile farmaco in grado di migliorare la prognosi dell'ESRD. Il farmaco appartiene alla classe dei anti-ossidanti modulatori dell'infiammazione (AIM) la cui azione si esplica principalmente a livello del nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), con conseguente inibizione del quadro infiammatorio e profibrotico. Il bardoxolone metile è un attivatore sperimentale di Nrf2 e si lega selettivamente a Keap1, una proteina che regola l'attività dello stesso Nrf2 in risposta ad uno stress cellulare. Il legame con Keap 1 favorirebbe la riduzione della produzione dei ROS prevalentemente in sede mitocondriale. Come conseguenza dell'effetto infiammatorio del bardoxolone, si è osservato un incremento dell'EGFR, attribuito nei modelli pre-clinici alla soppressione dell'infiammazione in sede glomerulare, alla riduzione della disfunzione endoteliale e della contrazione delle cellule mesangiali, con aumento della superficie glomerulare e ripristino della velocità di filtrazione glomerulare per singolo nefrone [51]. Nel 2011 attraverso lo studio BEACON è stato osservato un miglioramento dell'EGFR in un periodo di 52 settimane in pazienti affetti da Diabete Mellito II e con CKD compresa tra il II e il III stadio [52]; tuttavia nei pazienti con nefropatia più grave si è osservato lo sviluppo di notevole sovraccarico idrico secondario alla soppressione del segnale indotto dall'endotelina, con conseguente interruzione dello studio [53]. Nei pazienti con SA il farmaco potrebbe svolgere un ruolo interessante, visto che tali pazienti sono affetti da un minor numero di comorbidità e, di conseguenza, meno esposti ai rischi derivanti dalla farmacocinetica del bardoxolone. Il recente studio CARDINAL, se da una parte ha effettivamente documentato un miglioramento della filtrazione glomerulare, dall'altro ha evidenziato l'incremento della proteinuria secondario proprio all'aumentata filtrazione [54].

Un altro punto di ricerca è rappresentato dallo sviluppo di oligonucleotidi rivolti contro i micro RNA.

I micro RNA sono piccoli frammenti di RNA non codificante che funzionano principalmente come regolatori post-trascrizionali dell'espressione genica [55] e che possono silenziare l'espressione di un numero di geni funzionalmente correlati, funzionando in modo analogo, ma inverso, ai fattori trascrizionali [56–57]. L'importanza di questi componenti nell'eziopatogenesi del danno renale è stata chiarita analizzando gli effetti sul rene secondari ad un loro blocco di sintesi [58]. Il Mi-RNA 21 sembra essere, in modelli murini, particolarmente coinvolto nella risposta ad un danno renale (sia acuto che cronico) e appare over-espresso [59–60]. Sembra quindi logico individuare come possibili target terapeutici questi oligonucleotidi ed è stato dimostrato in modelli murini come l'inibizione farmacologica di tali frammenti determini una riduzione della progressione della malattia renale cronica. Poiché anche la SA presenta quadri istopatologici compatibili con fibrosi e danno tubulo interstiziale oltre che glomerulare, secondario ad un processo cronico, ben si comprende l'ipotetico ruolo di questi oligonucleotidi ingegnerizzati diretti contro i frammenti Mi-RNA. Attraverso uno studio su modelli murini, Gomez e coll. [61] hanno effettivamente dimostrato un incremento della sopravvivenza dell'organo, con riduzione della fibrosi secondaria ad un effetto protettivo per inibizione di TGF- $\beta$  in sede glomerulare ed interstiziale, verosimilmente dovuto ad una maggiore attività PPAR $\alpha$ /retinoide X e una migliore attività mitocondriale con riduzione della produzione di ROS. Anche le proteine appartenenti alla famiglia delle Chaperonine rappresentano un possibile bersaglio farmacologico, così come già avviene nella sindrome di Fabry con il Migalastat. Il razionale all'impiego di Chaperonine nella malattia di Alport trae origine dal fatto che circa il 50% delle mutazioni presenti sono di tipo missenso con conseguente sviluppo di proteine con struttura tridimensionale anomala e che pertanto vengono degradate dai sistemi cellulari [62]. L'utilizzo di una Chaperonina consentirebbe pertanto alle proteine di collagene anomalo di raggiungere comunque la MBG, funzionando in modo subottimale ma comunque sufficiente ad impedire le principali manifestazioni della malattia. Una proteina candidata a questo utilizzo sembrerebbe essere l'acido taurodesossicolico, che facilitando il ripiegamento della laminina IV consentirebbe lo sviluppo di una MBG comunque funzionante seppur difettosa [63], mentre l'acido 4 fenil butirato di sodio (PBA), uno scavenger dell'ammoniaca somministrato per via orale già in uso clinico per il trattamento dei disturbi del ciclo dell'urea, sembrerebbe ridurre l'autofagia in colture di fibroblasti con mutazioni del collagene tipo IV [64]. In merito alla correzione tra stato infiammatorio e sviluppo della patologia, sottolineiamo anche un recente studio condotto su modelli murini di SA che ha dimostrato come l'attivazione del Discoidin domain receptor 1 (DDR1) mediata da Col I possa indurre una lesione lipotossica podocitaria mediata da CD36 sottolineando come l'ezetimibe interferirebbe con l'interazione CD36/DDR1 prevenendo la lipotossicità e preservando la funzione renale in modo simile a quanto osservato con l'impiego di ramipril [65]. Anche lo studio sperimentale condotto da Axelsson e coll. [66] su ratti Wistar, si inserisce nella cornice dell'inibizione dei mediatori dello stato infiammatorio. Gli autori hanno sottolineato il possibile ruolo dell'inibizione della cascata infiammatoria tramite l'utilizzo di scavenger dei ROS con conseguente blocco dell'afflusso di calcio nelle cellule. Le molecole testate sono: la dimethylthiourea (DMTU), il paracalcitolo, inibitori della RhoA-chianasi Y-27632, tacrolimus e per tutte si è osservato un possibile ruolo nel blocco della cascata infiammatoria per inibizione nel rilascio di calcio con conseguente riduzione della permeabilità della MBG. L'utilizzo della Ciclosporina A, che inizialmente pareva ritardare la progressione del danno renale cronico sia nell'uomo [67] che nel cane [68], è stato attualmente abbandonato sia a motivo dell'origine genetica della patologia che della nefrotossicità conseguente all'utilizzo prolungato nel tempo [69]. Risultati contrastanti sono stati prodotti dall'impiego di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) poiché alcuni studi hanno effettivamente dimostrato un ripristino della rete di collagene tipo IV e una ripresa funzionale della MBG [70] mentre altri non sono arrivati alle medesime conclusioni [71].

I pazienti affetti dalla patologia, non presentano in genere controindicazioni al trapianto renale e

non si osserva recidiva della malattia primaria, essendo la MBG del donatore esente da alterazioni strutturali [72]. I tassi complessivi di sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato sono rispettivamente del 95,1% e 90,2% a 1 anno; 80,5% e 86,8% a 5 anni; 66% e 45,3% a 10 anni dal trapianto, con una disfunzione del Graft secondaria per lo più ad alterazioni ascrivibili a nefropatia cronica da farmaci immunosoppressori (70%) che a quadri di rigetto acuti o subacuti [73]. La comparsa di Ab Anti MBG è si riscontra in circa il 3% dei casi soprattutto nei soggetti di sesso maschile sebbene in alcune casistiche siano riportate percentuali inferiori [74].

## Conclusioni

Attualmente non esistono terapie specifiche per la SA ed è d'obbligo uno stretto monitoraggio delle manifestazioni cliniche. Nei pazienti probandi con familiarità per SA l'utilizzo di farmaci inibitori del sistema renina angiotensina deve essere avviato fin dal momento della diagnosi ed eventualmente associato ad un anti-aldosteronico, mentre non sono presenti prove certe per raccomandare l'utilizzo di un doppio o triplo blocco del sistema RAAS, sebbene a livello fisiopatologico sia comunque possibile pur con uno stretto monitoraggio.

La presenza di sintomi "chiave" come sordità, ematuria e proteinuria in individui giovani deve essere sempre indagata tramite esami di secondo livello come biopsia renale e sequenziamento genico in considerazione anche dell'evoluzione della malattia indipendentemente dalla familiarità. Inoltre, le donne dovrebbero essere informate circa i rischi relativi alla trasmissibilità della malattia tramite un adeguato counselling genetico. Al momento, l'unica opzione terapeutica risolutiva risulta essere il trapianto; tuttavia, nel prossimo futuro, nuovi e mirati farmaci con una azione inibitoria ad ampio spettro sullo stato infiammatorio sistemico e locale potrebbero affiancare ed eventualmente sostituire l'attuale terapia basata sull'inibizione del RAAS, con netto miglioramento della prognosi. Sono tuttavia necessari ulteriori studi, essendo le conoscenze attuali limitate a modelli animali o colture cellulari.

## BIBLIOGRAFIA

1. An XG, Zhang YQ, Ding J, Wang F, Xiao HJ, Yao Y. [Analysis of diagnosis and treatment of Alport syndrome]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2016; 54(9):669-73. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.09.008>
2. Kefalides NA. A collagen of unusual composition and a glycoprotein isolated from canine glomerular basement membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 22(1):26-32. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(66\)90597-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(66)90597-3)
3. Hudson BG, Spiro RG. Studies on the native and reduced alkylated renal glomerular basement membrane. Solubility, subunit size, and reaction with cyanogen bromide. *J Biol Chem* 1972; 247(13):4229-38.
4. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 2004 Oct; 15(10):2514-27. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141462.00630.76>
5. Chen YM, Miner JH. Glomerular basement membrane and related glomerular disease. *Transl Res* 2012; 160:291-97. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.03.004>
6. Fernandez-Prado, Raul et al. MYH9-related disease: it does exist, may be more frequent than you think and requires specific therapy. *Clin Kidney J* 2019; 12:488-93. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz103>
7. Abrahamson DR, Prettyman AC, Robert B, St John PL. Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes. *Kidney Int* 2003; 63(3):826-34. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00800>
8. Hertz JM, Thomassen M, Storey H, Flinter F: Clinical utility gene card for: Alport syndrome – update 2014. *Eur J Hum Genet* 2012; 20:713. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.237>
9. Savige J, Ars E, Cotton RG, Crockett D, Dagher H, et al; International Alport Mutation Consortium. DNA variant databases improve test accuracy and phenotype prediction in Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2014; 29(6):971-77. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2486-8>
10. Kashtan CE. Familial hematuria. *Pediatr Nephrol* 2009; 24:1951-58. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0622-z>
11. Hudson BG. The Molecular Basis of Goodpasture and Alport Syndromes: Beacons for the Discovery of the Collagen IV Family. *JASN* 2004; 15(10):2514-27. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141462.00630.76>
12. Judy Savige, Deb Colville, Michelle Rheault, Susie Gear, Rachel Lennon, Sharon Lagas, Moira Finlay, Frances Flinter Alport Syndrome in Women and Girls *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11:1713-20. <https://doi.org/10.2215/CJN.00580116>
13. Rheault MN, Kashtan CE. Inherited glomerular diseases. *Ped Nephrol* 2016; 7:1918-84.
14. Heiskari N, Zhang X, Zhou J, et al. 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* 1996 May; 7(5):702-9. <https://doi.org/10.1681/ASN.V75702>
15. Nozu K, Nakashi K, Abe Y, Dagawa T, et al. A review of clinical characteristics and genetic background in Alport Syndrome. *Clin Experimental Nephrol* 2019; 23:158-68. <https://doi.org/10.1007/s10157-018-1629-4>
16. Tomohiko Y, Kandai N, Xue Jun F, et al. Natural History and Genotype-Phenotype Correlation in Female X-Linked Alport Syndrome. *Kidney Int Rep* 2017; 2(5):850-55. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2017.04.011>
17. Jais JP, Knebelmann B, Giatras, et al. X linked Alport Syndrome: natural History in 195 families and genotype-phenotype correlation in males. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(4):649-57. <https://doi.org/10.1681/ASN.V114649>
18. Jais JP, Knebelmann B, Giatras, et al. X linked Alport Syndrome: natural History and genotype-phenotype correlation in girl and woman belonging to 195 families a European Community Alport Syndrome Concerted Action study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10):2603-10 <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000090034.71205.74>
19. Kamiyoshi N, Nozu K, Fu XJ, et al. Genetic, clinical, and pathologic backgrounds of patients with autosomal dominant Alport syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11:1441-49. <https://doi.org/10.2215/CJN.01000116>
20. Baldovino S, Moliner AM, Taruscio D, Daina E, Roccatello D. Rare diseases in Europe: from a wide to a local perspective. *Isr Med Assoc J* 2016; 18:359-63. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27468531/>
21. Hicks J, Mierau G, Wartchow E, Eldin K. Renal diseases associated with hematuria in children and adolescents: a brief tutorial. *Ultrastruct Pathol* 2012; 36(1):1-18. <https://doi.org/10.3109/01913123.2011.620731>
22. Kashtan CE. Alport syndrome. An inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78(5):338-60. <https://doi.org/10.1097/00005792-199909000-00005>
23. Coppo R, Gianoglio B, Porcellini MG, Maringhini S; Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Pediatric Nephrology and Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Nephrology. Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy

- in children (report of the Italian National Registry of Renal Biopsies in Children). *Nephrol Dial Transplant* 1998 Feb; 13(2):293-97. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.ndt.a027821>
24. Persson U, Hertz JM, Wieslander J, Segelmark M. Alport syndrome in southern Sweden. *Clin Nephrol* 2005; 64:85-90. <https://doi.org/10.5414/cnp64085>
  25. Pajari H, Kääriäinen H, Muhonen T, Koskimies O. Alport's syndrome in 78 patients: Epidemiological and clinical study. *Acta Paediatr* 1996; 85:1300-06. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb13915.x>
  26. Jais JP; Knebelmann B; Giatras; De Marchi M; Rizzoni G Ranieri A, et al. X linked Alport Syndrome: natural History and genotype-phenotype correlation in girl and woman belonging to 195 families a European Community Alport Syndrome Concerted Action study. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(10):2603-10. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000090034.71205.74>
  27. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17:405-23. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
  28. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. The Human Variome Project (HVP), and the Human Genome Organisation (HUGO) HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016; 37:564-69. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
  29. Rehm H, Bale S, Bayrak-Toydemir P, et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med* 2013; 15:733-47. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.92>
  30. Savige J, Ratnaik S, Colville D. Retinal abnormalities characteristic of inherited renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:1403-15. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010090965>
  31. Antignac C, Zhou J, Sanak M, Cochat P, Roussel B, Deschênes G, Gros F, Knebelmann B, Hors-Cayla MC, Tryggvason K, et al. Alport syndrome and diffuse leiomyomatosis: deletions in the 5' end of the COL4A5 collagen gene. *Kidney Int* 1992 Nov; 42(5):1178-83. <https://doi.org/10.1038/ki.1992.402>
  32. Lyons OT, St John ERC, Morales JP, Chan YC, Taylor PR. Ruptured thoracoabdominal aortic aneurysm in a renal transplant patient with Alport's Syndrome. *Ann Vasc Surg* 2007; 21:816-18. <https://doi.org/10.1016/j.avsg.2007.06.004>
  33. Kashtan CE, Segal Y, Flinter F, Makanjuola D, Gan JS, Watnic T. Aortic abnormalities in male with Alport Syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:3554-60. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq271>
  34. Nozu Y, Ye MJ, Imafuku A, Miura K, Yamamura T, Minamikawa S, Shono A, Ninchoji T, Morioka I, Nakanishi K, Yoshikawa N, Kaito H, Iijima K. Genetic, Clinical, and Pathologic Backgrounds of Patients with Autosomal Dominant Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016 Aug 8; 11(8):1441-49. <https://doi.org/10.2215/CJN.01000116>
  35. Kashtan CE. Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *Am J Kidney Dis* 2021 Feb; 77(2):272-79. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2020.03.026>
  36. Kashtan CE, Ding J, Garosi G. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV alpha345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int* 2018; 93(5):1045-51. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.018>
  37. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S. Diagnostic utility of exome sequencing for kidney disease. *N Engl J Med* 2019; 380(2):142-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1806891>
  38. Morinière V, Dahan K, Hilbert P. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(12):2740-51. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013080912>
  39. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol* 2013 Oct; 13(10):738-53. <https://doi.org/10.1038/nri3523>
  40. Savige J, Ariani F, Mari F. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2019; 34(7):1175-89. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-3985-4>
  41. Ghohestani RF, Hudson BG, Claudy A, Uitto J. The alpha 5 chain of type IV collagen is the target of IgG autoantibodies in a novel autoimmune disease with subepidermal blisters and renal insufficiency. *J Biol Chem* 2000 May 26; 275(21):16002-06. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16002>
  42. Proesmans W, Knockaert H, Trouet D. Enalapril in paediatric patients with Alport syndrome: 2 years' experience. *Eur J Pediatr* 2000; 159: 430-33. <https://doi.org/10.1007/s004310051301>
  43. Webb NJA, Lam C, Shahinfar S, et al. Efficacy and safety of losartan in children with Alport syndrome-results from a subgroup analysis of a prospective, randomized, placebo- or amlodipine-controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2521-26. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq797>
  44. Savige J, Gregory M, Groot O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc*

- Nephrol 2013 Feb; 24(3):364-75.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2012020148>
45. Gross O, Friede T, Hilgers R et al. Safety and efficacy of the ACE-inhibitor ramipril in Alport syndrome: the double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter Phase III EARLY PRO-TECT Alport trial in pediatric patients. *ISRN Pediatr* 2012; 2012:1.  
<https://doi.org/10.5402/2012/436046>
  46. Kaito H, Nozu K, Iijima K, Nakanishi K, Yoshiya K, Kanda K, Przybyslaw Krol R, Yoshikawa N, Matsuo M. The effect of aldosterone blockade in patients with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2006 Dec; 21(12):1824-29.  
<https://doi.org/10.1007/s00467-006-0270-8>
  47. Giani M, Mastrangelo A, Villa R, Turolo S, Marra G, Tirelli AS, Hopfer H, Edefonti A. Alport syndrome: the effects of spironolactone on proteinuria and urinary TGF- $\beta$ 1. *Pediatr Nephrol* 2013 Sep; 28(9):1837-42.  
<https://doi.org/10.1007/s00467-013-2490-z>
  48. Mastrangelo A, Brambilla M, Romano G, et al. Single, Double and Triple Blockade of RAAS in Alport Syndrome: Different Tools to Freeze the Evolution of the Disease. *J Clin Med* 2021; 10(21):4946.  
<https://doi.org/10.3390/jcm10214946>
  49. Struthers AD. Aldosterone escape during ACE inhibitor therapy in chronic heart failure. *Eur Heart J* 1995 Dec; 16(Suppl N):103-06.  
[https://doi.org/10.1093/eurheartj/16.suppl\\_n.103](https://doi.org/10.1093/eurheartj/16.suppl_n.103)
  50. Torra R, Furlano M. New therapeutic options for Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 34(8):1272-79.  
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfz131>
  51. Wu QQ, Wang Y, Senitko M, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPAR $\gamma$ , and HO-1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 300(5): F1180-92.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00353.2010>
  52. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, Krauth M, Ruiz S, Audhya P, Christ-Schmidt H, Wittes J, Warnock DG; BEAM Study Investigators. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2011 Jul 28; 365(4):327-36.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1105351>
  53. de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, Bakris GL, et al.; BEACON Trial Investigators. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2013 Dec 26; 369(26):2492-503.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306033>
  54. Toto RD. Bardoxolone-the Phoenix? *J Am Soc Nephrol* 2018 Feb; 29(2):360-61.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2017121317>
  55. Godwin JG, Ge X, Stephan K, Jurisch A, Tullius SG, Iacomini J. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 Aug 10; 107(32):14339-44.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912701107>
  56. Kato M, Natarajan R. MicroRNA circuits in transforming growth factor- $\beta$  actions and diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2012; 32(3):253-60.  
<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.04.004>
  57. Thum T, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456(7224):980-84.  
<https://doi.org/10.1038/nature07511>
  58. Chau BN, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med* 2012; 4(121).  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003205>
  59. Denby L, et al. miR-21 and miR-214 are consistently modulated during renal injury in rodent models. *Am J Pathol* 2011; 179(2):661-72. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.021>
  60. Zhong X, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2013; 56(3):663-74.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-012-2804-x>
  61. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest* 2015; 125(1):141-56. <https://doi.org/10.1172/JCI75852>
  62. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamshirsaz AA, Masoumi A, Schrier RW. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010 May; 21(5):876-83.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2009070784>
  63. Chen YM, Zhou Y, Go G, Marmorstein JT, Kikkawa Y, Miner JH. Laminin  $\beta$ 2 gene missense mutation produces endoplasmic reticulum stress in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2013 Jul; 24(8):1223-33.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2012121149>
  64. Wang D, Mohammad M, Wang Y et al. The chemical chaperone, PBA, reduces ER stress and autophagy and increases collagen IV  $\alpha$ 5 expression in cultured fibroblasts from men with X-linked Alport syndrome and missense mutations. *Kidney Int Rep* 2017; 2(4):739-48  
<https://doi.org/10.1016/j.ekir.2017.03.004>
  65. Kim JJ, David JM, Wilbon SS, Santos JV, et al. Discoidin domain receptor 1 activation links extracellular matrix to podocyte lipotoxicity in Alport syndrome. *EBioMedicine* 2021 Jan; 63:103162.  
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103162>
  66. Axelsson J, Rippe A, Sverrisson K, Rippe B. Scavengers of reactive oxygen species, paracalcitol, RhoA, and Rac-1 inhibitors and tacrolimus inhibit angiotensin II-induced actions on glomerular permeability. *Am J Physiol Renal*

- Physiol 2013 Aug 1; 305(3):F237-43.  
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00154.2013>
67. Callis L, Vila A, Carrera M, Nieto J. Long-term effect of cyclosporine A in Alport Syndrome. *Kidney int* 1999; 55:1051.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.0550031051.x>
68. Chen D, Jefferson B, Harvey SJ, Zheng K, Gartley CJ, Jacobs RM, Thorner PS. Cyclosporine A slow the progressive renal disease Alport Syndrome (X-linked Hereditary nephritis): Result from canine models. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:690-98.  
<https://doi.org/10.1097/01.asn.0000046964.15831.16>
69. Charbit, Gubler MC, Dechaux M, Guadagnoux MF, Grunfeld JP, Niaudet P. Cyclosporin Therapy in patient with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:57-63.  
<https://org/10.1007/s00467-006-0227-y>
70. Lin X, Suh JH, Go G, Miner JH. Feasibility of repairing glomerular basement membrane defects in Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2014 Apr; 25(4):687-92.  
<https://doi.org/10.1681/ASN.2013070798>
71. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, et al. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* 2006 Jul; 70(1):121-29. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001521>
72. Watson S, Padala SA, Bush JS. Alport Syndrome, 2021 Aug 2. In: StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing: 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470419/>
73. Michael C. Byrne, Milos N, et al. Renal transplant in patients with Alport's syndrome. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(4):769-75.  
<https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.31997>
74. Katsuma A, Nakada Y, Yamamoto I, et al. Long-term survival in Japanese renal transplant recipients with Alport syndrome: a retrospective study. *BMC Nephrol* 2018; 19:  
<https://doi.org/10.1186/s12882-018-1052-9>