



## ORIGINALES

# *Condrocalcinosis e hipomagnesemia en un paciente portador de una nueva mutación en el gen del cotransportador de ClNa sensible a tiazidas*

V. García Nieto, A. Cantabrana\*, D. Müller\*\* y F. Claverie-Martín\*\*\*

Unidades de Nefrología Pediátrica, \*Reumatología y de \*\*\*Investigación. Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife. \*\*Department of Pediatric Nephrology. Humboldt University. Charité Children's Hospital. Berlin. Alemania.

### RESUMEN

*Se comunica la historia clínica de un paciente adulto que debutó en la adolescencia con episodios agudos de inflamación, monoarticulares, con afectación de grandes articulaciones de miembros superiores e inferiores, en ausencia de síntomas renales. El estudio radiológico mostró calcificaciones de los meniscos de ambas rodillas, de la sínfisis del pubis y de otras articulaciones. Al demostrarse la existencia de hipomagnesemia, se observó que tenía, además, hipopotasemia, hipocalciuria, incremento de la eliminación urinaria de magnesio, niveles de renina ligeramente elevados, defecto de dilución y una reducción moderada de la reabsorción de ClNa tubular distal renal, todo ello compatible con el diagnóstico de síndrome de Gitelman. La secuenciación de los exones y de las regiones intrónicas flanqueantes del gen SLC12A3, que codifica el cotransportador de ClNa sensible a tiazidas, mostró que el paciente es portador homocigótico de una nueva mutación en el intrón 7. La mutación consiste en el cambio de una G a una A en el sitio donador del «splicing» del RNA.*

**Palabras clave:** *Síndrome de Gitelman. Gen SLC12A3. Cotransportador de ClNa sensible a tiazidas. Hipomagnesemia. Condrocalcinosis.*

### CHONDROCALCINOSIS AND HYPOMAGNEAEMIA IN A PATIENT WITH A NEW MUTATION IN THE GENE OF THE THIAZIDE-SENSITIVE Na-Cl CO-TRANSPORTER

### SUMMARY

*We report the clinical history of an adult patient that debuted during adolescence with sharp episodes of arthritis several joints, with affectation of big articu-*

Recibido: 26-V-2003.  
Aceptado: 15-VII-2003.

**Correspondencia:** Víctor García Nieto  
Unidad de Nefrología Pediátrica  
Hospital Universitario Ntra. Sra. de Candelaria  
Carretera del Rosario, s/n.  
38010 Santa Cruz de Tenerife

*lations of superior and inferior members, in absence of renal symptoms. An X-ray showed calcification of the menisci in both knees, the symphysis of the pubis and of other joints. When the presence of hypomagnesaemia was demonstrated, we observed that he also had hypokalemia, hypocalciuria, increment of the urinary elimination of magnesium, slightly high levels of renine, dilution defect and a moderate reduction of the NaCl tubular distal reabsorption, all compatible with the diagnosis of Gitelman syndrome. We sequenced the exons and intron flanking regions of the SLC12A3 gene, encoding the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter, and showed that the patient is homozygous for a new mutation in intron 7. This mutation consisted of a G to A transition at position +1 of the donor splice site of intron 7.*

**Key words: Gitelman syndrome. SLC12A3 gene. Thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. Hypomagnesaemia. Chondrocalcinosis.**

## INTRODUCCIÓN

En 1966, Gitelman y Welt publicaron las historias clínicas de tres pacientes adultos, dos de ellos hermanos, afectados de hipopotasemia, hipomagnesemia y alcalosis metabólica<sup>1</sup>. Durante muchos años, pacientes con estas características fueron diagnosticados erróneamente de síndrome de Bartter. La presencia de hiperreninismo e hiperaldosteronismo, contribuyó a la confusión con el síndrome de Bartter clásico. A finales de los años 80, el síndrome de Gitelman se definió como una entidad distinta, distinguiéndose de aquel por el hallazgo de hipocalciuria, capacidad de concentración renal normal, morfológica glomerular renal normal en la biopsia renal y, a menudo, ausencia de síntomas con la excepción de episodios transitorios de debilidad muscular o de tetania<sup>2</sup>. Además, en pacientes con síndrome de Gitelman, la respuesta calciúrica a la furosemida está anulada, lo que permite la diferenciación de los pacientes con síndrome de Bartter, que muestran una respuesta calciúrica incrementada a la furosemida<sup>3</sup>.

En pacientes con síndrome de Gitelman o síndrome de hipokaliemia-hipomagnesemia familiar, la observación tanto, de que las anomalías electrolíticas se asemejaban a los efectos producidos por la administración crónica de tiazidas<sup>4</sup>, como los resultados obtenidos en los estudios de aclaramientos<sup>5</sup>, apuntaron a que el defecto tubular en esta enfermedad debía residir en el transporte distal de cloro y sodio (ClNa) sensible a tiazidas. En efecto, en 1996, se estableció que el síndrome de Gitelman es producido por una reducción en el transporte de ClNa en el túbulo contorneado distal debido a la existencia de mutaciones causantes de una pérdida de función en el gen *SLC12A3*<sup>6-11</sup> que codifica el cotransportador de ClNa sensible a tiazidas [TSC

(*thiazide sensitive cotransporter*), NCC, NCCT o ENCC1] que se localiza en el túbulo contorneado distal.

En este trabajo, presentamos una nueva mutación del gen *SLC12A3* en un paciente con síndrome de Gitelman y condrocalcinosis.

## PACIENTE, MATERIAL Y MÉTODOS

### Caso clínico

Paciente varón que inició la sintomatología articular a los 18 años de edad, en forma de episodios agudos de inflamación monoarticular de grandes articulaciones de miembros superiores e inferiores, que cedían sin tratamiento ni secuelas en 24-48 horas, con una frecuencia trimestral. El cuadro articular se mantuvo estable durante tres años, al cabo de los cuales sufrió un episodio de inflamación migratoria de varias articulaciones, especialmente manifiesto en las rodillas, que se acompañó de fiebre y se prolongó durante varios días. Desde entonces, aumentó la frecuencia de las crisis hasta 10 ó 12 al año, así como la duración de las mismas. El número de articulaciones afectas en cada brote variaba, así como su distribución, respetando la columna y las pequeñas articulaciones de manos y pies. Fue tratado con diversos antiinflamatorios no esteroideos.

A los 33 años, fue remitido a nuestro hospital. La exploración física no evidenció deformidad ni limitación de la movilidad del raquis ni de las articulaciones periféricas. El hemograma y la VSG fueron normales, así como las cifras de creatinina, ácido úrico, calcio, fosfato, hierro y hormonas tiroideas. El factor reumatoide, los anticuerpos antinucleares y el HLA B-27 fueron negativos. El estudio radiológico mostró calcificaciones de los meniscos de ambas ro-

dillas (fig. 1), de la sínfisis del pubis, del cartílago hialino de las articulaciones coxofemorales y calcificaciones capsulares en la primera articulación metatarso-falángica de ambos pies (fig. 2). Se pautó tratamiento con colchicina e indometacina para los brotes articulares. A pesar de ello, no disminuyó la frecuencia ni la intensidad de los episodios de artritis. Se realizaron varias artrocentesis, obteniéndose líquidos de celularidad variable, ausencia de cristales y cultivos negativos.

A los 38 años de edad, se detectó hipomagnesemia (1,31 mg/dl). El estudio funcional renal realizado con ese motivo, mostró un aclaramiento de creatinina normal (124 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), hipopotasemia leve (2,98-3,46 mEq/l) y una excreción fraccional de potasio límite (14,1-16,2%). Se observó hipocalciuria (0,81 mg/kg/día) y pérdida renal de magnesio, al comprobarse una excreción urinaria de magnesio de 150,2 mg/día, en presencia de magnesemias reducidas (1,2-1,4 mg/dl). El paciente no mostró defecto de la capacidad de concentración (osmolalidad urinaria máxima: 906 mOsm/kg) ni de la capacidad de acidificación (pCO<sub>2</sub> urinaria en orina alcalina: 83,4 mmHg). Los niveles de renina estaban ligeramente elevados (5,1 ng/ml/hora) y los de aldosterona eran normales. Se realizó una sobrecarga hiposalina que mostró un defecto de dilución (osmolalidad urinaria



Fig. 1.—Imagen de condrocalcinosis del menisco de la rodilla izquierda.



Fig. 2.—Calcificación capsular de la articulación metatarso-falángica del primer dedo del pie izquierdo.

mínima: 139 mOsm/kg) a expensas de un defecto de la reabsorción tubular distal de cloro (64,4%) y de sodio (72,7%), así como una excreción fraccional de potasio elevada (20,1%).

Se inició tratamiento con sales de magnesio. Para elevar la magnesemia, se asoció calcitriol al tratamiento, con el objetivo de incrementar su absorción intestinal, con lo que se consiguió elevar la magnesemia a 1,6-1,65 mg/dl. Con este tratamiento, se obtuvo una disminución de la frecuencia de las crisis de inflamación, aunque persistió el dolor articular intenso, por lo que se prescribió tratamiento con cloquína.

## ANÁLISIS DEL DNA

El DNA genómico se extrajo de la sangre del paciente utilizando el kit QIAamp DNA Blood (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los exones junto con las regiones intrónicas flanqueantes del gen *SLC12A3* se amplificaron mediante PCR utilizando parejas de cebadores generadas a partir de las secuencias de los intrones<sup>6,9</sup>. Los productos amplificados se secuenciaron mediante el método de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos utilizando un analizador automático de DNA ABI Prism modelo 3700 (Applied Biosystems). La mutación se confirmó al secuenciar varios productos de

PCR amplificados de manera independiente a partir del DNA genómico.

## RESULTADOS

El análisis mediante secuenciación automática de los fragmentos amplificados por PCR mostró la presencia de una nueva mutación en el gen *SCL12A3*. Esta mutación consiste en el cambio de una G a una A en el extremo 5' del intrón 7 (en la posición +1 relativa al exón 6), es decir, en el sitio donador del «splicing» del RNA (fig. 3). El paciente es portador homocigótico de la mutación. El resultado de dicha mutación sería un «splicing» distinto que daría lugar a un RNA maduro defectuoso, y por tanto, a una proteína TSC anómala. No se descubrieron mutaciones en los demás fragmentos amplificados mediante PCR.

## DISCUSIÓN

Nuestro paciente debutó en la adolescencia con una clínica articular en ausencia de síntomas renales. Sólo se pudo sospechar, años después, que padecía un síndrome de Gitelman cuando se detectó la hipomagnesemia. Los exámenes complementarios realizados a continuación, mostraron todos las características bioquímicas y de alteración de la fun-

ción renal propias del síndrome como hipopotasemia, hipocalciuria, incremento de la eliminación urinaria de magnesio, niveles de renina ligeramente elevados, defecto de dilución y reducción moderada de la reabsorción de ClNa tubular distal renal.

En 1979, Bauer y cols., notificaron un paciente con condrocalcinosis e hipomagnesemia<sup>12</sup>. Posteriormente, se publicaron varios casos esporádicos de «síndrome de Bartter»<sup>13-17</sup> o, simplemente, de hipomagnesemia e hipopotasemia<sup>18,19</sup> con condrocalcinosis. A partir de 1996, los nuevos casos de condrocalcinosis e hipomagnesemia ya aparecen publicados con el término de síndrome de Gitelman<sup>20-22</sup>. Recientemente, Caló y cols., han revisado los mecanismos patogénicos por lo que la hipomagnesemia favorece la aparición de condrocalcinosis<sup>23</sup>.

En la figura 4 se representa el modelo celular del túbulo distal que explica la fisiopatología de esta tubulopatía. La alteración de la función del cotransportador de ClNa sensible a tiazidas (TSC) produce una reducción de la reabsorción tubular de cloro y sodio en el nefrón distal (#1 en la fig. 4), originando una pérdida de sal y de agua, con la consiguiente hipovolemia. La reducción del volumen vascular activa el sistema renina-angiotensina, promoviendo un incremento de las concentraciones de renina y de aldosterona. Esta, favorece en el ducto colector cortical un incremento de la reabsorción de sodio en la membrana apical y una activación de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa en la membrana basolateral (#2 en la fig. 4). El incremento de la concentración de aldosterona estimula la H<sup>+</sup>-ATPasa de los ductos colectores corticales y medulares, causando un aumento de la secreción de H<sup>+</sup> en la membrana apical. Al tiempo, la excreción urinaria de potasio se acrecienta debido al incremento de la actividad, en la membrana basolateral, de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa (#2 en la fig. 4). Todo ello, favorece la aparición de alcalosis hipopotasémica. El bajo contenido intracelular de sodio eleva la reabsorción tubular de calcio mediante la activación del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> basolateral (#3 en la fig. 4), produciendo hipocalciuria. La magnesuria se incrementa al activarse el intercambiador Mg<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> (#4 en la fig. 4), dada la existencia de un potencial negativo transepitelial, lo que conduce a la aparición de hipomagnesemia<sup>24</sup>.

Puesto que, del 85 al 90% del sodio ya se ha reabsorbido en el túbulo proximal y en el asa de Henle, la pérdida de sodio en el síndrome de Gitelman es discreta y, por ello, la clínica es menos evidente que en el síndrome de Bartter. Por esta razón, muchos casos del primero, se reconocen en la edad adulta, aunque existen pacientes diagnosti-

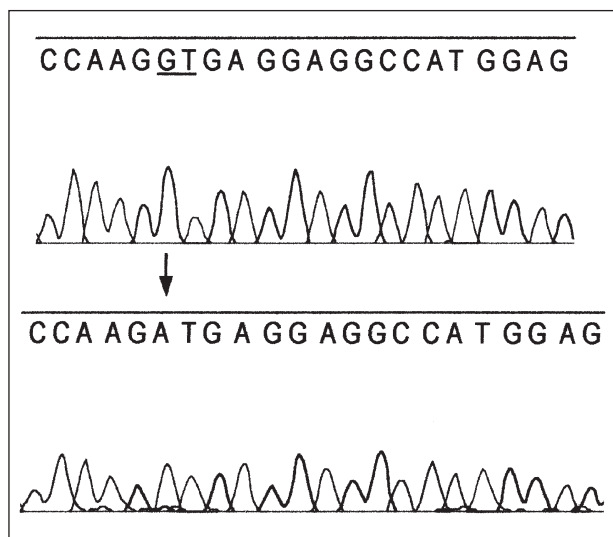


Fig. 3.—Mutación en el gen *SCL12A3* identificada en el intrón 7 del paciente. Se muestra la secuencia parcial de la hebra de DNA con sentido de un individuo sano (arriba) y del paciente afecto (abajo). La flecha indica el cambio de la G del sitio donador de «splicing» (GT) a una A.

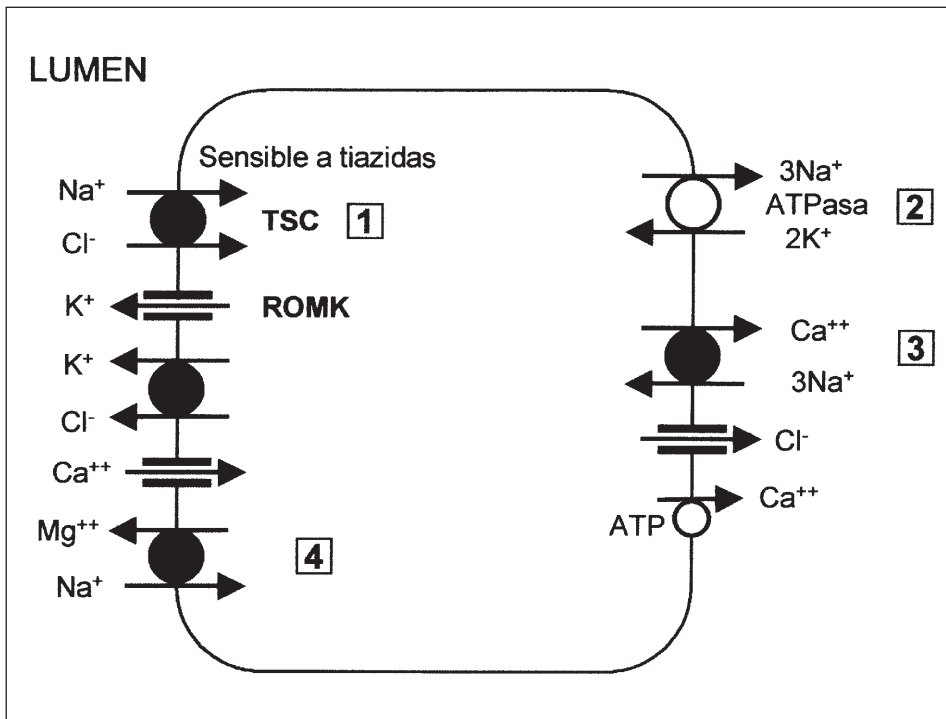


Fig. 4.—Modelo celular del túbulo contorneado distal. Los distintos pasos que están afectados en el síndrome de Gitelman, se citan en la discusión del texto.

cados en la edad pediátrica<sup>25</sup>. La poliuria y el retraso de crecimiento están ausentes o son moderados. La ausencia de polihidramnios o de prematuridad son básicos en la diferenciación con el síndrome de Bartter clásico<sup>3</sup>. Además, en el síndrome de Gitelman puede existir una eliminación urinaria normal de prostaglandina  $E_2$ <sup>26</sup>.

Respecto a la función renal, se comprueba una disminución del umbral tubular renal para la reabsorción de magnesio sin afectación del  $TmMg^2$ . Estos datos son compatibles con el hecho de que la mayoría del magnesio filtrado es reabsorbido en la rama ascendente gruesa del asa de Henle y de que el túbulo distal sólo reabsorbe alrededor del 5% del magnesio filtrado<sup>27</sup>. Los mecanismos de concentración y de acidificación están intactos. En la sobrecarga hiposalina la reabsorción distal de cloro y de sodio está reducida<sup>28</sup>.

En 1996<sup>6</sup> Simón y cols., demostraron que mutaciones con pérdida de función en el gen *SLC12A3* están asociadas con el síndrome de Gitelman. Este gen se localiza en el cromosoma 16q13 y está constituido por 26 exones. La proteína codificada por el gen *SLC12A3*, TSC, es un cotransportador de ClNa que consiste en doce dominios de transmembrana con los extremos amino y carboxilo intracelulares<sup>6</sup>. Distintos tipos de mutaciones se han descrito en el gen *SLC12A3* incluyendo mutaciones puntuales sin

sentido, con cambio de sentido, supresiones, inserciones y mutaciones que alteran el «splicing» del RNA<sup>6,9,29-31</sup>. La mutación que encontramos en el gen *SLC12A3* de nuestro paciente no ha sido descrita hasta ahora en la literatura. Esta mutación cambia el sitio donador del «splicing» del RNA en el intrón 7, GU, a AU (fig. 3). El efecto de la mutación sería un cambio en el «splicing» que resultaría en un RNA maduro defectuoso, y por tanto, en una proteína TSC anómala, probablemente, con pérdida de función.

### Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a Hilaria Gómez Acosta por su asistencia en las extracciones de sangre y del DNA, así como al paciente y a su familia, por su colaboración. FCM y VGN recibieron financiación de la Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS; proyecto 1/2002/40) y de la Sociedad Canaria de Pediatría (Sección de Tenerife).

### BIBLIOGRAFÍA

1. Gitelman HJ, Welt LG: A new familial disorder characterized by hipokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 79: 221-235, 1996.

2. Rodríguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M: Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol* 1: 465-172, 1987.
3. Rodríguez-Soriano J: Bartter and related syndromes: the puzzle is almost resolved. *Pediatr Nephrol* 12: 315-327, 1998.
4. Gesek FA, Friedman PA: Mechanism of calcium transport stimulated by chlorothiazide in mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest* 90: 429-438, 1992.
5. Sutton RAL, Marichak V, Halebe A, Wilkins GE: Bartter's syndrome: evidence suggesting a distal tubular defect in a hypocalciuric variant of the syndrome. *Miner Electrolyte Metab* 18: 43-51, 1992.
6. Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gáinza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP: Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genet* 12: 24-30, 1996.
7. Pollak MR, Delaney VB, Graham RM, Hebert SC: Gitelman's syndrome (Bartter's variant) maps to the thiazide-sensitive cotransporter gene locus on chromosome 16q13 in a large kindred. *J Am Soc Nephrol* 7: 2244-2248, 1996.
8. Lemmink HH, Van den Heuvel LPWJ, Van Dijk HA, Merckx GFM, Smilde TJ, Taschner PEM, Monnens LAH, Hebert SC, Knoers NVAM: Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families. *Pediatr Nephrol* 10: 403-407, 1996.
9. Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, Colussi G, De Fusco M, Sereni F, Ballabio A, Casari G: Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome. *Am J Hum Genet* 59: 1019-1026, 1996.
10. Karolyi L, Ziegler A, Pollak M, Fischbach M, Grzeschik KH, Koch MC, Seyberth HW: Gitelman's syndrome is genetically distinct from other forms of Bartter's syndrome. *Pediatr Nephrol* 10: 551-554, 1996.
11. Chang H, Tashiro K, Hirai M, Ikeda K, Kurokawa K, Fujita T: Identification of a cDNA encoding a thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter from the human and its mRNA expression in various tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 324-328, 1996.
12. Bauer FM, Glasson P, Vallotton MB, Courvoisier B: Bartter's syndrome, chondrocalcinosis and hypomagnesemia. *Schweiz Med Wochenschr* 109: 1251-1256, 1979.
13. Durlach J: Bartter's syndrome, chondrocalcinosis and hypomagnesemia. *Schweiz Med Wochenschr* 110: 993-994, 1980.
14. Salvarini C, Rossi F, Macchioni PL, Baricchi R, Capozzoli N, Castellani S, Ghirelli L, Veneziani M, Scarti L, Portioli I: Bartter's syndrome and chondrocalcinosis: a possible role for hypomagnesemia in the deposition of calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals. *Clin Exp Rheumatol* 7: 415-420, 1989.
15. De Heide LJ, Birkenhager JC: Bartter's syndrome, hypomagnesaemia and chondrocalcinosis. *Neth J Med* 39: 148-152, 1991.
16. Remy M, Bonnet C, Castellarin M, Arnaud M, Bertin P, Treves R, Desproges-Gotteron R: Joint chondrocalcinosis-Bartter's syndrome: a rare association. *Ann Med Intern (Paris)* 144: 492-493, 1993.
17. Muñoz-Fernández S, Pantoja L, Martín Mola E, De Miguel E, Gijón Baños J: Chondrocalcinosis associated with Bartter's syndrome and hypomagnesemia. *J Rheumatol* 21: 1782-1783, 1994.
18. Zarco P, Jaller JJ, Rapado A, Herrero-Beaumont G, Traba ML, Grant C, Piedra C, Fernández del Vallado P: Estudios metabólicos en dos casos de chondrocalcinosis con hipomagnesemia. *Rev Clin Exp* 185: 77-81, 1989.
19. Smilde TJ, Haverman JF, Schipper P, Hermus AR, Van Liebergen FJ, Jansen JL, Kloppenborg PW, Koolen MI: Familial hypokalemia/hypomagnesemia and chondrocalcinosis. *J Rheumatol* 21: 1515-1519, 1994.
20. Hisakawa N, Yasuoka N, Itoh H, Takao T, Jinnouchi C, Nishiya K, Hashimoto K: A case of Gitelman's syndrome with chondrocalcinosis. *Endocr J* 45: 261-27, 1998.
21. Punzi L, Calo L, Schiavon F, Pianon M, Rosada M, Todesco S: Chondrocalcinosis is a feature of Gitelman's variant of Bartter's syndrome. A new look at the hypomagnesemia associated with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Rev Rhum Engl Ed* 65: 571-574, 1998.
22. Gascón A, Cobeta-García JC, Iglesias E: Gitelman syndrome and chondrocalcinosis. *Nephrol Dial Transplant* 14: 515, 1999.
23. Caló L, Punzi L, Semplicini A: Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in Bartter's and Gitelman's syndrome: review of the pathogenetic mechanisms. *Am J Nephrol* 20: 347-350, 2000.
24. Bhandari S, Turney JH: The molecular basis of hypokalaemic alkalosis: Bartter's and Gitelman's syndromes. *Nephron* 80: 373-379, 1998.
25. Vidal Company A, Ruiz Cano R, Gutiérrez Junquera C, Lillo Lillo M, Onsurbe Ramírez I: Variabilidad fenotípica del síndrome de Gitelman. *An Esp Pediatr* 52: 285-288, 2000.
26. Luthy C, Bettinelli A, Iselin S, Metta MG, Basilico E, Oetliker OH, Bianchetti MG: Normal prostaglandinuria E<sub>2</sub> in Gitelman's syndrome, the hypocalciuric variant of Bartter's syndrome. *Am J Kidney Dis* 25: 824-828, 1995.
27. De Rouffignac C, Quamme G: Renal magnesium handling and its hormonal control. *Physiol Rev* 74: 305-322, 1994.
28. Ariceta Iraola G, Rodríguez Soriano J, Vallo Boado A: Tubulopatías hipomagnesémicas. En: García Nieto V, Santos F (eds.). *Nefrología Pediátrica*. Madrid: Aula Médica, pp. 73-80, 2000.
29. Lemmink HH, Knoers NV, Karolyi L, Van Dijk H, Niaudet P, Antignac C, Guay-Woodford LM, Goddard PR, Carel JC, Hermes A, Seyberth HW, Monnens LA, Van den Heuvel LP: Novel mutations in the thiazide-sensitive NaCl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain. *Kidney Int* 54: 720-30, 1998.
30. Takeuchi K, Kure S, Kato T, Taniyama Y, Takahashi N, Ikeda Y, Abe T, Narisawa K, Muramatsu Y, Abe K: Association of a mutation in thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter with familial Gitelman's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4496-4499, 1996.
31. Yahata K, Tanaka I, Kotani M, Mukoyama M, Ogawa Y, Goto M, Nakagawa M, Sugawara A, Tanaka K, Shimatsu A, Nakao K: Identification of a novel R642C mutation in Na/Cl cotransporter with Gitelman's syndrome. *Am J Kidney Dis* 34: 845-53, 1999.