

# Cistinosis: diagnóstico mediante la determinación del contenido de cistina intraleucocitaria por chromatografía líquida de alta resolución

María Soledad Martínez Llamas<sup>a</sup>, Carmen M. Cabrera Morales<sup>a</sup>, Juan Antonio Bravo Soto<sup>b</sup>, Julia Cantón<sup>a</sup> y Susana Pedrinaci<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.

<sup>b</sup>Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

**FUNDAMENTO Y OBJETIVO:** La cistinosis es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por una acumulación de cistina en el interior de los lisosomas. Existen 3 formas de la enfermedad, la infantil, la juvenil y la ocular no nefropática, clasificadas según la gravedad de los síntomas y la edad de inicio. El conocimiento de las manifestaciones clínicas tempranas y el inicio de un tratamiento adecuado retrasan la evolución de la enfermedad y mejoran las condiciones generales. Por ello es necesario desarrollar un método diagnóstico sensible para la detección temprana y el tratamiento de la enfermedad.

**CASO CLÍNICO Y MÉTODOS:** Se determinó el contenido de cistina intraleucocitaria mediante chromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en una paciente de 42 años de edad que había recibido un trasplante renal y presentaba las características clínicas de la cistinosis intermedia. Se realizó asimismo el estudio molecular de posibles alteraciones estructurales en el gen de la cistinosina (*CTNS*), tanto en la paciente como en los miembros de la familia.

**RESULTADOS:** Mediante la determinación del contenido de cistina intraleucocitaria en la paciente y los miembros familiares, se encontró a 5 miembros de la familia heterocigotos para la enfermedad. Este resultado se confirmó posteriormente con el análisis molecular, que mostró la presencia de la delección de aproximadamente 65 kb en todos ellos. La paciente fue heterocigota para dicha delección, pero la segunda alteración no se determinó.

**CONCLUSIONES:** La determinación del contenido de cistina de leucocitos polimorfonucleares, que es un método útil de diagnóstico de cistinosis, permite detectar a los individuos heterocigotos.

**Palabras clave:** Cistinosis. Contenido intraleucocitario de cistina. HPLC. Método diagnóstico.

Cystinosis: diagnostic through the measurement of the leukocyte cystine content by HPLC

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Cystinosis is an autosomal recessive disorder characterized by an accumulation of intralysosomal cystine. Three disease forms exist, infantile, juvenile or late-onset, and ocular nonnephropathic cystinosis, delineated on the basis of severity of symptoms and age of onset. The knowledge of early clinic manifestations and the onset of the appropriate therapy delay the evolution of the disease and improve the general conditions. Therefore, it is necessary to develop a sensible diagnostic method for early detection and treatment of the disease.

**CLINICAL CASE AND METHODS:** The leukocyte cystine content was determined by HPLC in a 42 years old female patient after renal transplantation, and with the clinical characteristic complications of the intermediate cystinosis. Equally, the molecular characterization of the structural defects of the cystinosin (*CTNS*) gene was made in the patient and in all family members.

**RESULTS:** By measuring of the leukocyte cystine content in the patient and family members, we have determined 5 family members as heterozygous. This result was confirmed by molecular analysis that showed the ~65 kb deletion in the 5 family members. The patient was heterozygous for the ~65 kb deletion, and the second alteration was not determined.

**CONCLUSIONS:** We presented a useful diagnostic method, based in the determination of cystine content of polymorphonuclear leukocytes, which permits to detect the heterozygous individuals.

**Key words:** Cystinosis. Leukocyte cystine content. HPLC. Diagnostic method.

La cistinosis es un error congénito del metabolismo de la cistina que se hereda como un rasgo autosómico recesivo y presenta una incidencia de 1 caso por cada 100.000-200.000 nacimientos. Se caracteriza por la acumulación intralisosomal en determinados tejidos (riñón, córnea y músculo, entre otros) de cristales hexagonales de cistina que terminan por destruir las células y, como consecuencia, los tejidos, lo que da lugar a retraso en el crecimiento, raquitismo, insuficiencia renal, episodios agudos de acidosis y fotofobia<sup>1-3</sup>.

Se han descrito 3 formas de la enfermedad atendiendo a los síntomas y al contenido intralisosomal de cistina: la cistinosis nefropática clásica o infantil, que representa el 95% de los casos de cistinosis y es la más grave; la cistinosis intermedia o juvenil, que presenta las mismas características clínicas que la forma nefropática pero con una progresión de la enfermedad más lenta, y la forma ocular o no nefropática, también conocida como cistinosis del adulto<sup>4</sup>.

El gen responsable de la cistinosis (*CTNS*) codifica la proteína cistinosina, que mapea en la región cromosómica 17p13<sup>5</sup>. El gen contiene 12 exones (23 kb de ADN genómico)<sup>6</sup> que originan una proteína transportadora de 367 aminoácidos y 7 dominios transmembrana, con unas propiedades cinéticas similares a otros transportadores lisosomales<sup>7</sup>. Todas las formas de cistinosis tienen afectados ambos alelos del gen *CTNS*; la delección de aproximadamente 65 kb que abarca los exones 1-10 es la más frecuente y puede aparecer de forma homocigota o heterocigota en el 75% de los individuos afectados de origen europeo<sup>8</sup>.

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la determinación del contenido intraleucocitario de cistina a partir de los leucocitos polimorfonucleares obtenidos de sangre periférica<sup>9</sup>. Habitualmente estas determinaciones se han llevado a cabo con el empleo de análisis específicos y sensibles que implican la utilización de la proteína de unión a cistina de origen bacteriano y dilución isotópica<sup>10,11</sup>, mediante

Correspondencia: Dra. C.M. Cabrera.  
Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de las Nieves.  
Avda. de las Fuerzas Armadas, 2. 18014 Granada. España.  
Correo electrónico: mcbrm@fundacionhnv.org

Recibido el 19-9-2003; aceptado para su publicación el 13-1-2004.

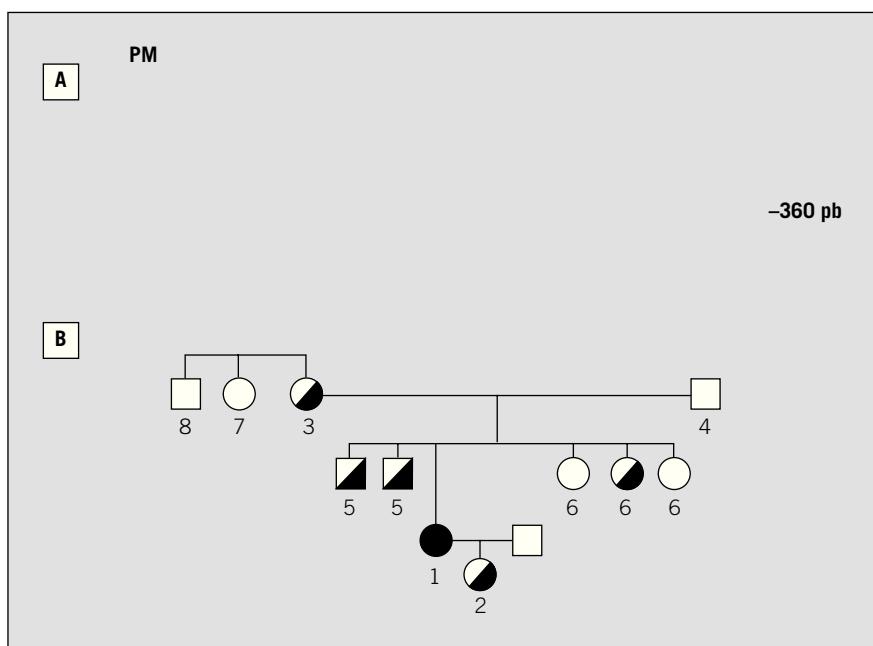


Fig. 1. Análisis por reacción en cadena de la polimerasa de los puntos de rotura de la delección de aproximadamente 65 kb en los miembros de la familia (A) y segregación de dicha delección en los miembros de la familia de la paciente (B). 1: paciente; 2: hija; 3: madre; 4: padre; 5: hermano; 6: hermana; 7: tío; 8: tíos; PM: peso molecular.

el uso de la cromatografía de intercambio iónico<sup>12</sup>, o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)<sup>13</sup>.

En el presente trabajo exponemos un método de cuantificación del contenido intraleucocitario de cistina medida por HPLC con ligeras modificaciones de los métodos descritos con anterioridad<sup>9,13</sup>. Se ha empleado este método en el diagnóstico de una paciente que presentó la forma intermedia de la enfermedad e igualmente en el estudio familiar para la determinación de portadores sanos heterocigotos.

#### Caso clínico y métodos

Se trata de una mujer de 42 años de edad, con talla muy por debajo de la normalidad (137 cm), signos radiológicos de raquitismo, fotofobia moderada, disminución de la agudeza visual, hipotiroidismo e insuficiencia renal crónica, que requirió hemodiálisis durante 1 año antes de que se le trasplantara un riñón de donante cadáver en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Para la determinación del contenido de cistina intraleucocitaria se obtuvieron 20 ml de sangre periférica (PBL) tratada con EDTA (0,3 mol). Los leucocitos polimorfonucleares se aislaron por centrifugación en gradiante con dextrano seguida de la lisis hipotónica de los glóbulos rojos. Posteriormente los leucocitos polimorfonucleares se lisaron con SDS (dodecil sulfato sódico) al 0,01%. Los valores de cistina se determinaron por cromatografía HPLC (Beckman System Gold 126 AA) y se cuantificaron (en nmol/ml) por detección espectrofotométrica; la concentración final de cistina se expresó en nmol/mg de proteína. Los valores de 0,2 nmol/mg de proteína se sitúan en el rango de sensibilidad de la técnica, que aparecen en individuos sanos; los valores superiores a 0,2 nmol/mg de proteína se observan en portadores heterocigotos (asintomáticos), y los valores de 3-6 nmol/mg proteína aparecen en la forma intermedia.

La caracterización molecular de las alteraciones en el gen *CTNS* se realizó a partir del ADN extraído de las muestras de sangre periférica. Se procedió al estudio de las delecciones de aproximadamente 65 kb (que abarca los exones del 1 al 10) y de 9,5-16 kb (que comprende los exones del 1 al 3) por reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores utilizados en la amplificación de la delección mayor de aproximadamente 65 kb (65A-65A.2) y de la pequeña (P11.1-P11.2) fueron los siguientes: 65A 5'-CCGGAGTCTACAGGGCACAG; 65A.2 5'-GGCCATGTAGCTCTCACC-

TC; P11.1 5'-AAGGGCAGAAATGAGGTTGGA; P11.2 5'-AAGGGCAGCAAGGCACACTCGT. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa fueron las siguientes: desnaturización inicial de 94 °C/5 min; 30 ciclos de 94 °C/1 min, 58 °C/1 min y 72 °C/1 min; con una extensión final de 72 °C/5 min. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. En el estudio de la heterocigosis de la delección de aproximadamente 65 kb se amplificó el microsatélite D17S829<sup>5,14,15</sup>.

#### Resultados

Los valores de cistina intraleucocitaria determinados por HPLC en la paciente del estudio y en todos los miembros familiares se recogen en la tabla 1. El valor determinado en la paciente, de 4,5 nmol/mg de proteína, nos confirmó que se trataba de la forma intermedia de cistinosis, cuyos síntomas se pusieron ya de manifiesto tras el fracaso renal que sufrió y el posterior trasplante renal por el cual se solicitó el estudio. De entre los familiares, 5 presentaron valores correspondientes a portadores heterocigotos sin ningún síntoma de la enfermedad (tabla 1).

Para la caracterización de la delección de aproximadamente 65 kb que abarca la mayor parte del gen<sup>14</sup>, se utilizó la pareja de cebadores 65A y 65A.2, que amplifican los puntos de la rotura con aparición de un fragmento de 360 pb (fig. 1A, tabla 1). En la figura 1B se reconstruye en un árbol la segregación de esta delección. La delección menor de 9-14 kb resultó estar ausente en todos los miembros de la familia (tabla 1).

En el estudio de heterocigosis de la delección de aproximadamente 65 kb se amplificó el microsatélite D17S829, que se encuentra localizado dentro de la región que se pierde con esta delección (tabla 1). La paciente resultó ser heterocigota para la delección de aproximadamente 65 kb y, por tanto, dado que por el contenido intraleucocitario de cistina se trataba de una forma intermedia de cistinosis, debía de existir otra alteración en el segundo alelo del gen *CTNS*. Sin embargo, no se llevó a cabo la caracterización de esta segunda alteración.

En todos los miembros de la familia que resultaron heterocigotos en función de la determinación del contenido intraleucocitario de cistina se confirmó posteriormente la condición de portadores por análisis molecular, ya que todos ellos presentaron la delección de aproximadamente 65 kb (tabla 1, fig. 1A y B).

#### Discusión

En el presente trabajo se expone un método diagnóstico de una rara enfermedad autosómica recesiva como es la cistinosis, utilizando para ello la determinación del contenido intraleucocitario de cistina mediante cromatografía HPLC y cuantificación por espectrofotometría a partir de leucocitos polimorfonucleares, a diferencia

TABLA 1

Estudio familiar de los valores de cistina intraleucocitaria y caracterización molecular de las delecciones de ~65 kb y 9-14 kb

<sup>a</sup> Miembros de la familia	1	2	3	4	5	5	6	6	6	7	8
D17S829	263	244	257	257	257	257	257	257	257	242	242
	—	244	257	263	257	257	263	257	263	267	242
<sup>b</sup> Delección de ~65 kb	+	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—
<sup>c</sup> Delección de ~9-14 kb	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Contenido de cistina (nmol/mg proteína)	4,5	1,5	0,3	0,2	0,4	0,6	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2

<sup>a</sup>1: paciente; 2: hija; 3: madre; 4: padre; 5: hermano; 6: hermana; 7: tío; 8: tíos.

<sup>b,c</sup>(+) presencia o (—) ausencia de la delección de ~65 kb y 9-14 kb, respectivamente.

de la determinación por HPLC y cuantificación por fluorescencia que emplea leucocitos totales<sup>13</sup>. El empleo de leucocitos polimorfonucleares aumenta la sensibilidad de la detección de portadores heterocigotos de la enfermedad<sup>9</sup>. Se trata por tanto de un método relativamente sencillo que no requiere la etapa previa de congelación de los leucocitos totales a -80 °C y el posterior tratamiento con N-etilmaleimida<sup>13</sup>, y que permite al mismo tiempo, al emplear leucocitos polimorfonucleares y no totales, la detección de los portadores heterocigotos, dato que posteriormente se confirmó por técnicas moleculares<sup>16</sup>.

La paciente del estudio presentó unos valores de cistina intraleucocitaria (4,5 nmol/mg de proteína) compatibles con una forma intermedia de la enfermedad. Cuando se realizó posteriormente la caracterización molecular, se halló la delección de aproximadamente 65 kb en uno de los alelos del gen *CTNS*. Sin embargo, el estudio molecular de la segunda alteración no se determinó. Gracias al empleo del marcador D17S829, pudimos constatar que se trataba de un delección heterocigota. Probablemente la segunda alteración desconocida es una mutación puntual (*missense*) que no afecta a la viabilidad de la proteína. Ello explicaría que la paciente presente cierto grado de actividad de la proteína, responsable de la forma intermedia<sup>17</sup>, ya que en la cistinosis nefropática o infantil el fenotipo grave se corresponde con un deterioro intenso de la función génica de ambos alelos que implica alteraciones de la región promotora, secuencia líder y dominios transmembrana y no transmembrana<sup>18-20</sup>. Igualmente explicaría que los familiares de la paciente, que son heterocigotos y por tanto portadores de la delección de aproximadamente 65 kb (tabla 1), retengan la función génica normal del alelo no afectado y por ello no padecen la enfermedad, aunque se detecta por tener unos valores de cistina intraleucocitaria superiores a 0,2 nmol/mg de proteína. Ya que el reconocimiento de las manifestaciones clínicas tempranas y el inicio de un tratamiento adecuado<sup>21,22</sup> retrasan la evolución de la enfermedad en el caso de la forma infantil, que es la más frecuente,

es necesario desarrollar un método rápido de detección de la enfermedad, como el que se presenta en este trabajo. De esta forma es posible realizar un consejo genético o un diagnóstico prenatal<sup>23-25</sup> y determinaciones seriadas de cistina intraleucocitaria en el paciente para ajustar la dosis de cisteamina (Cystagon®)<sup>26</sup> y así poder conseguir unos valores inferiores a 1 nmol/mg de proteína. Esto es lo que se observó en el caso de nuestra paciente, a quien posteriormente al diagnóstico se le hicieron determinaciones seriadas de cistina intraleucocitaria hasta ajustar la dosis de cisteamina, con lo que se pudo evitar complicaciones secundarias debidas a depósitos posteriores de cistina. El empleo de esta técnica de determinación del contenido de cistina por HPLC a partir de leucocitos polimorfonucleares en lugar de leucocitos totales permite aumentar la sensibilidad de la técnica<sup>13</sup>, como lo demuestra el hecho de que todos los miembros de la familia de la paciente portadores heterocigotos fueron confirmados posteriormente por diagnóstico molecular.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med* 2002;347:111-21.
- Pintos G. Cistinosis: de los cristales de cistina a la cistinosina. *Nefrología* 2003;23:60-70.
- Kalatzis V, Antignac C. Cystinosis: from gene to disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1883-6.
- Mancini GM, Havelaar AC, Verheijen FW. Lysosomal transport disorders. *J Inher Metab Dis* 2000;23:278-92.
- Cystinosis Collaborative Research Group. The linkage of the gene for cystinosis to markers on the short arm of chromosome 17. *Nat Genet* 1995;10:246-8.
- Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore SA, et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet* 1998;18:319-24.
- Kalatzis V, Cherqui S, Antignac C, Gasnier B. Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H<sup>+</sup>-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J* 2001;20:5940-9.
- Kiehntopf M, Schickel J, Gonze B, Koch HG, Superti-Furga A, Steinmann B, et al. Analysis of the *CTNS* gene in patients of German and Swiss origin with nephropathic cystinosis. *Hum Mutat* 2002;20:237.
- Smolin LA, Clark KF, Schneider JA. An improved method for heterozygote detection of cystinosis, using polymorphonuclear leukocytes. *Am J Hum Genet* 1987;41:266-75.
- Oshima RG, Willis RC, Furlong CE, Schneider JA. Binding assays for amino acids: the utilization of a cystine binding protein from *Escherichia coli* for the determination of acidic-soluble cystine in small physiological samples. *J Biol Chem* 1974;249:6033-9.
- Smith ML, Furlong CE, Greene AA, Schneider JA. Cystine: binding protein assay. *Methods Enzymol* 1987;143:144-8. Disponible en: <http://www.medicine.ucsd.edu/cystinosis>
- Lee PLY. Single-column system for accelerated amino acid analysis of physiological fluids using five lithium buffers. *Biochem Med* 1974;10:107-21.
- De Graaf-Hess A, Trijbels F, Blom H. New method for determining cystine in leukocytes and fibroblasts. *Clin Chem* 1999;45:2224-8.
- Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drout N, Vignal A, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152-4.
- McDowell G, Isogai T, Tanigami A, Hazelwood S, Ledebetter D, Polymeropoulos MH, et al. Fine mapping of the cystinosis gene using an integrated genetic and physical map of a region within human chromosome band 17p13. *Biochem Mol Med* 1996;58:135-41.
- Forestier L, Genevieve J, Attard M, Cherqui S, Lewis C, Van't Hoff W, et al. Molecular characterization of CTNS deletions in nephropathic cystinosis: development of a PCR-based detection assay. *Am J Hum Genet* 1999;65:353-9.
- Attard M, Jean G, Forestier L, Cherqui S, Van't Hoff W, Broyer M, et al. Severity of phenotype in cystinosis varies with mutations in the *CTNS* gene: predicted effect on the model of cystinosis. *Hum Mol Genet* 1999;8:2507-14.
- Shotelersuk V, Larson D, Anikster Y, McDowell G, Lemons R, Bernardini I, et al. *CTNS* mutations in an American-based population of cystinosis patients. *Am J Hum Genet* 1998;63:1352-62.
- Phornphutkul C, Anikster Y, Huizing M, Braun P, Brodie C, Chou JY, et al. The promoter of a lysosomal membrane transporter gene, *CTNS*, binds SP-1, shares sequences with the promoter of an adjacent gene, *CARKL*, and causes cystinosis if mutated in a critical region. *Am J Hum Genet* 2001;69:712-21.
- Anikster Y, Shotelersuk V, Gahl WA. *CTNS* mutations in patients with cystinosis. *Hum Mutat* 1999;14:454-8.
- Gahl WA, Kuehl EM, Iwata F, Lindblad A, Kaiser-Kupfer MI. Corneal crystals in nephropathic cystinosis: natural history and treatment with cysteamine eyedrops. *Mol Genet Metab* 2000;71:100-20.
- Dureau P, Broyer M, Dufier JL. Evolution of ocular manifestations in nephropathic cystinosis: a long-term study of a population treated with cysteamine. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2003;40:142-6.
- Schneider JA, Verroust FM, Kroll WA, Garvin AJ, Horger EO III, Wong VG, et al. Prenatal diagnosis of cystinosis. *N Engl J Med* 1974;290:878-82.
- Smith ML, Pellett OL, Cass MM, Kennaway NG, Buist NR, Buckmaster J, et al. Prenatal diagnosis of cystinosis utilizing chorionic villus sampling. *Prenat Diagn* 1987;7:23-6.
- Smith ML, Clark KF, Davis SE, Greene AA, Marcusson EG, Chen YU, et al. Diagnosis of cystinosis with use of placenta. *N Engl J Med* 1989;321:397-8.
- Markello TC, Bernardini IM, Gahl WA. Improved renal function in children with cystinosis treated with cysteamine. *N Engl J Med* 1993;328:1157-62.