

Monitorización de los niveles de cistina. Aspectos técnicos de interés para el clínico

Judit Garcia-Villoria.

Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC. Servicio de Bioquímica y Genética Molecular. Hospital Clínico de Barcelona. IDIPABS. CIBERER.

RESUMEN

En este artículo se recoge una revisión sobre la monitorización de cistina intragranulocitaria (CISG) en 74 pacientes españoles durante los últimos 12 años y se realiza una comparación con otras poblaciones. Actualmente, se monitoriza la CISG en el 89 % de los pacientes con cistinosis pediátricos (PCP) y en el 59 % de los adultos (PCA). Estos datos se correlacionan con estudios previamente publicados que demuestran una menor adherencia al tratamiento en edad adulta. Se han analizado los niveles de CISG de 722 muestras pertenecientes a PCP y 472 de PCA. La media de valores de CISG es igual en ambas cohortes de pacientes, y aunque es superior a otras poblaciones, se podría justificar por la utilización de granulocitos en lugar de leucocitos totales. La frecuencia de monitorización es mayor en PCP que en PCA, pero se observa que, independientemente de la edad, el valor de CISG aumenta cuando hay una menor frecuencia de monitorización.

Solo el 24 % de los pacientes presentó una CISG indicativa de buen control terapéutico de forma estable, un porcentaje menor que en otras poblaciones. Además, el 58 % de los pacientes (mayoritariamente PCP) presentaban niveles fluctuantes de CISG, que podrían deberse a un mal rendimiento en el aislamiento de granulocitos (debido al envío de <6 mL de muestra y más de 24 horas de transporte), por no extraer la muestra a la hora exacta postratamiento, por una falta de adherencia al tratamiento o por una inadecuada administración de la medicación. Actualmente se están explorando nuevos biomarcadores complementarios a la CISG.

Palabras clave:

Cistinosis, cistina intragranulocitaria, cistina leucocitaria, cisteamina, monitorización de tratamiento.

Abreviaturas:

CISG: Cistina intragranulocitaria.

PCP: Pacientes con cistinosis pediátricos.

PCA: Pacientes con cistinosis adultos.

Correspondencia:

Judit García Villoria

Email: jugarcia@clinic.cat

INTRODUCCIÓN

La cistinosis es un trastorno genético autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen *CTNS*, localizado en el cromosoma 17p13. El gen *CTNS* codifica una proteína lisosomal de 367 aminoácidos llamada cistinosisina¹. La cistinosisina es una proteína transmembrana específica para el transporte de cistina desde el lisosoma al citoplasma celular. El defecto en la cistinosisina produce un acúmulo de cistina intralisosomal, que al tratarse de un aminoácido no hidrosoluble forma cristales dentro de todas las células del organismo, especialmente en el tejido renal y ocular, causando daños irreversibles²⁻⁴.

Se han descrito tres formas clínicas de cistinosis según la edad de inicio y la gravedad de los síntomas: cistinosis infantil (OMIM #219800), juvenil (OMIM#219900) y ocular no nefropática (OMIM #219750).

El diagnóstico de la cistinosis se realiza mediante la medición del contenido de cistina en leucocitos⁵⁻⁶, ya que es en el tipo celular donde inicialmente se acumula este aminoácido. Además, se comprueba si existen cristales de cistina corneales y, por último, se confirma el diagnóstico mediante el estudio mutacional en el gen *CTNS*. Hasta el momento se han descrito más de 140 mutaciones diferentes, la más prevalente en la región del norte de Europa y Norteamérica es la delección de 57kb, que incluye la región promotora del gen y los 10 primeros exones del gen *CTNS*⁷⁻¹⁰. En la población española, dicha mutación se detecta en un 34 % de los pacientes¹¹.

Existe un tratamiento efectivo para la cistinosis¹²⁻¹⁴. Consiste en altas dosis de cisteamina, que es un aminotiol que reacciona con la cistina produciendo desulfuro de cisteamina-cistina (figura I). Este nuevo compuesto puede ser transportado fuera de la membrana lisosomal por diferentes transportadores catiónicos, en especial el de lisina¹⁵⁻¹⁶. Si el tratamiento se inicia precozmente, retrasa el deterioro glomerular renal y mejora el crecimiento lineal. Por el contrario, si no se trata, la mortalidad y morbilidad son muy elevadas^{3,17,18}. También se requiere una aplicación tópica ocularmente para tratar los cristales de cistina de la córnea¹⁹.

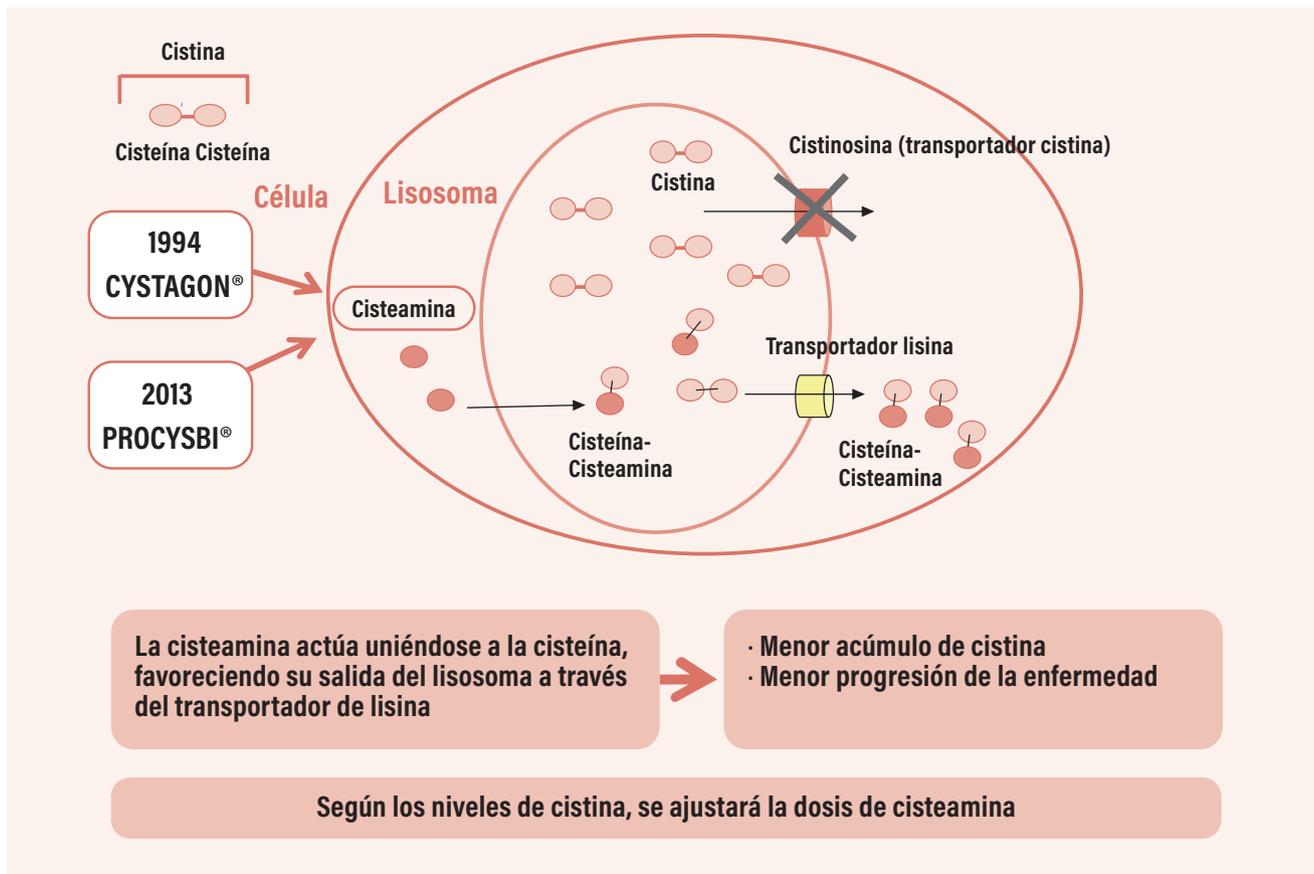
La cisteamina es un tratamiento de por vida que requiere una estricta posología^{17,20}, siendo necesario un régimen riguroso de seguimiento terapéutico para garantizar el cumplimiento y la eficacia, dado que la aparición y la gravedad de las complicaciones de la cistinosis dependen en gran medida del cumplimiento de la dosis óptima^{13,21-24}. En 1994 se aprobó la primera forma de cisteamina de liberación inmediata (Cystagon®), que ha sido la más comúnmente utilizada durante 30 años²⁵, requiriendo una dosis cada 6 horas. Posteriormente, se ha comercializado un forma de cisteamina de liberación retardada (Procysbi®, aprobado en 2013) que requiere una dosis cada 12 horas²⁶⁻³⁰.

La cuantificación del contenido de cistina intraleucocitaria es muy importante no solo para el diagnóstico, sino también para la monitorización del tratamiento, ya que el trata-

miento con cisteamina disminuye el acúmulo de cistina intralisosomal. Se han descrito diferentes métodos para la valoración de cistina intraleucocitaria, antiguamente el más utilizado era el ensayo de la proteína de unión a cistina (CBP), que era altamente sensible y específico³¹. Sin embargo, al tratarse de un ensayo radiométrico, durante los últimos años se han desarrollado nuevos métodos, principalmente mediante espectrometría de masas en tándem, que han demostrado tener una gran sensibilidad y especificidad³²⁻³⁴. Además, existen diferentes métodos según el tipo celular utilizado (granulocitos o leucocitos totales). En el año 1987, Smolin y colaboradores³⁵ propusieron que el uso de granulocitos en lugar de preparaciones de leucocitos mixtos era mejor porque la acumulación de cistina tiene lugar principalmente en las células sanguíneas fagocíticas y mejoraba así la detección de heterocigotos. Sin embargo, solo una minoría de los laboratorios valora la cistina en granulocitos debido a las dificultades en el aislamiento de estos.

En el presente estudio se analizan los resultados obtenidos de la monitorización de cistina intragranulocitaria en pacientes españoles con cistinosis desde que se implementó la metodología por espectrometría de masas en tándem hace 12 años.

Figura I. Tratamiento de cistinosis con cisteamina.



La cistina son dos cisteínas. Al tratarse con cisteamina, esta se une a la cisteína para poder salir del lisosoma al citoplasma a través del transportador de lisina. En consecuencia, se reduce el acúmulo de cistina intralisosomal.

MONITORIZACIÓN DE CISTINA INTRAGRANULOCITARIA DURANTE 12 AÑOS EN ESPAÑA

Metodología de monitorización de tratamiento

En España, el diagnóstico bioquímico de cistinosis, así como la monitorización del tratamiento con cisteamina en pacientes afectos de cistinosis, se realiza mediante la valoración de cistina intragranulocitaria (CISG) en un único centro: la Sección de Errores Congénitos del Metabolismo-IBC del Hospital Clínico de Barcelona. Antiguamente se utilizaba el método radiométrico de CBP, que era la metodología *gold-standard* en su momento, pero era una metodología radiométrica y presentaba muchos problemas, en especial para obtener los reactivos necesarios, lo que dificultaba un seguimiento a corto plazo. Por ello, en el año 2008 nuestro grupo desarrolló una nueva metodología mediante espectrometría de masas en tándem (UHPL-MS/MS), obteniendo una gran sensibilidad, especificidad y reproducibilidad³³, lo que ha permitido obtener resultados en un periodo más corto de tiempo durante los últimos 14 años.

En este artículo se expone una revisión de los resultados de CISG obtenidos con esta nueva metodología durante 12 años (desde el año 2009 al 2021) para la monitorización de tratamiento en pacientes españoles con cistinosis. La muestra de elección para dicha metodología fue el aislamiento de granulocitos a partir de una muestra de sangre total recogida sobre heparina. Las

condiciones de obtención de la muestra se especifican en la figura II. No se precisa ayuno, y es fundamental remarcar que se requiere un volumen de muestra de entre 6 y 10 mL sangre en heparina de litio o sódica, y que llegue al laboratorio a temperatura ambiente antes de las 24 horas posextracción. Estas son las condiciones óptimas para poder obtener un buen rendimiento en el proceso de aislamiento de granulocitos. Dado que este proceso de aislamiento conlleva mucho tiempo y delicadeza, se concentran las muestras de controles de tratamiento en la última semana de cada mes para poder coordinar mejor el trabajo en el laboratorio.

Para la correcta monitorización, se requiere extraer la muestra a un tiempo postratamiento determinado (figura II). En el caso de la administración de cisteamina de liberación inmediata, se debe extraer la muestra a las 6 horas postratamiento, que es cuando los niveles de cistina llegan al nivel basal tras el efecto de la cisteamina. En cambio, con la formulación de cisteamina de liberación lenta, debido a su cinética, la muestra se ha de obtener a los 30 min postratamiento.

Con esta nueva metodología, el rango de referencia es <0,5 nmol de ½ cistina/mg de proteína³³, lo cual es similar a otras metodologías^{32,34,36}. Los pacientes, al diagnóstico y con anterioridad al tratamiento, suelen presentar niveles más elevados de 2 nmol ½ cistina/mg de proteína. De acuerdo con lo publicado, el objetivo terapéutico de los pacientes en tratamiento es llegar a una

Figura II. Valoración de cistina intragranulocitaria. Requisitos para la toma de muestra de pacientes con cistinosis en tratamiento.



La toma de muestra se ha de realizar a diferentes tiempos postratamiento según si se administra cisteamina de liberación rápida o retardada. No se requiere estar en ayunas. La muestra de 6 a 10 mL de sangre se ha de recoger en un tubo de heparina de litio y ha de llegar al laboratorio antes de las 24 horas posextracción, donde se aíslan los granulocitos, se valoran las proteínas para normalizar los resultados y se cuantifica la concentración de cistina intragranulocitaria.

concentración de cistina $\leq 1^{37}$. Los niveles de cistina >1 , y en especial >2 , serían indicativos de un mal control terapéutico.

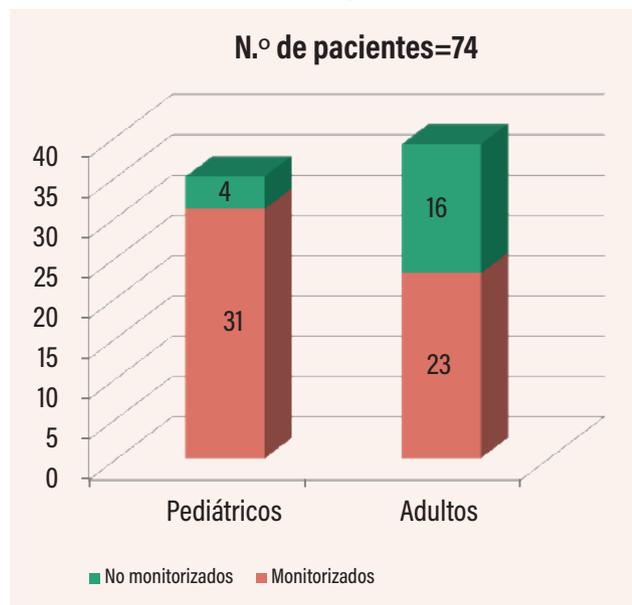
Pacientes con cistinosis monitorizados en España durante 12 años

En nuestro centro se ha realizado el diagnóstico bioquímico de cistinosis en 94 pacientes, y de la mayoría de ellos, también se ha obtenido el diagnóstico genético.

De los 94 pacientes con cistinosis, durante los últimos 12 años se ha monitorizado la cistina intragranulocitaria en 74 de ellos, de los cuales 35 (47 %) se encuentran en edad pediátrica (13 de sexo femenino y 22 del sexo masculino) y 39 (53 %) son pacientes adultos (22 mujeres y 17 hombres). De los 74 pacientes, al inicio del estudio todos recibían la cisteamina de liberación inmediata, pero actualmente son 65 los pacientes tratados con dicha formulación de cisteamina y 9 con cisteamina de liberación retardada.

En el periodo de este estudio, del año 2009 hasta el 2021, se ha dejado de monitorizar a 20 pacientes (4 pediátricos y 16 adultos). Por lo tanto, actualmente podemos considerar que se controlan los niveles de CISG en el 89 % de los pacientes cistinóticos pediátricos (PCP) y en el 59 % de los pacientes cistinóticos adultos (PCA), figura III. Esta discontinuidad en la monitorización podría deberse a una baja adherencia al tratamiento u otras causas que desconocemos.

Figura III. Pacientes españoles con cistinosis monitorizados mediante cistina intragranulocitaria en 12 años.

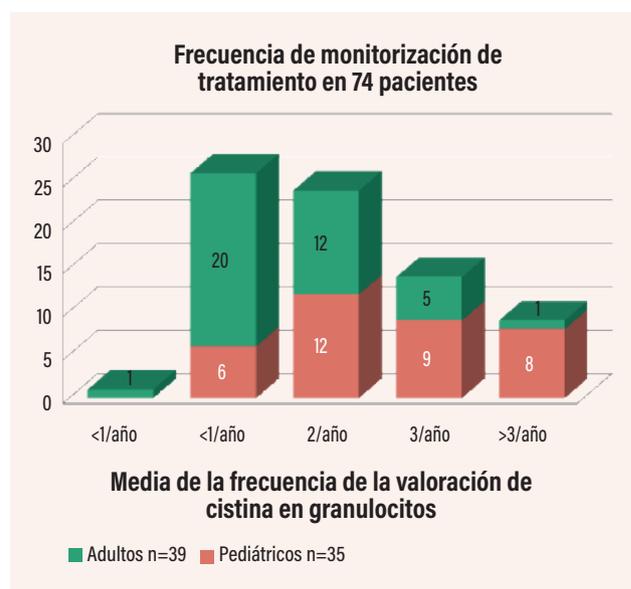


Durante 12 años se ha monitorizado a 74 pacientes. Se muestra el número de pacientes de edad pediátrica y adulta de los cuales se ha perdido el seguimiento y de los que se sigue realizando la monitorización de tratamiento mediante la valoración de cistina intragranulocitaria.

Frecuencia de monitorización de cistina durante los últimos 12 años en España

En la figura IV se muestra el número de pacientes a los que se les controlan los niveles de CISG según la frecuencia de monitorización (entre <1 y >3 veces al año). En los PCP la frecuencia de monitorización de CISG es mayor que en los PCA. En la edad pediátrica, el 83 % de los pacientes se monitorizan entre 2 y más de 3 veces al año, siendo lo más frecuente la monitorización bianual. En la edad adulta, el 82 % de los pacientes con cistinosis se monitorizan entre 1 y 2 veces al año, siendo la más frecuente la monitorización anual.

Figura IV. Frecuencia de monitorización de cistina intragranulocitaria en pacientes españoles con cistinosis.

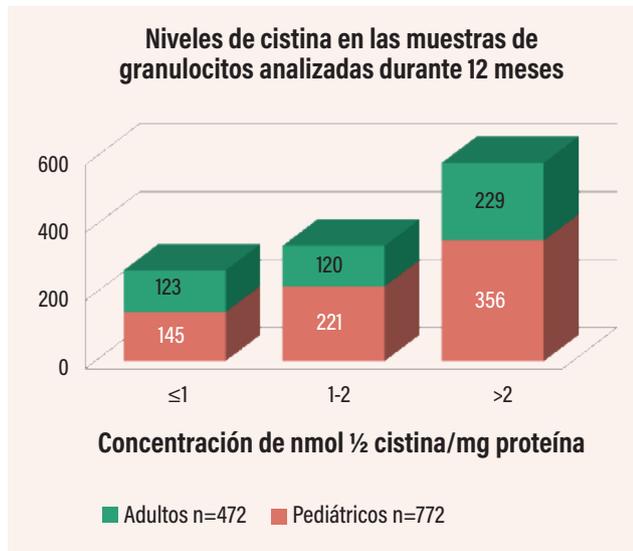


Se detalla el número de pacientes pediátricos y adultos con cistinosis según la frecuencia anual de monitorización mediante la valoración de cistina intragranulocitaria.

Alcance de los niveles de cistina intragranulocitaria indicativos de buen control terapéutico en pacientes españoles

Durante 12 años de este estudio se ha analizado la CISG para la monitorización de tratamiento en 1194 muestras de granulocitos aislados provenientes de 74 pacientes; 722 muestras pertenecían a PCP, y 472, a PCA. En la figura V se muestra que solo el 20 % de las muestras de PCP y el 26 % de las de PCA (22 % del total de muestras) se hallaron en un nivel indicativo de un buen control terapéutico ($R1$ nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg de proteína). El 28 % de las muestras se hallaron entre 1 y 2 nmol $\frac{1}{2}$ cistina/mg de proteína (31 % de muestras pediátricas y 25 % de adultas). Finalmente, el 48 % de las muestras presentaban unos niveles de CISG >2 (49 % de muestras de PCP y 48 % de muestras de PCA).

Figura V. Niveles de cistina obtenidos en las muestras analizadas de pacientes españoles con cistinosis en 12 años.

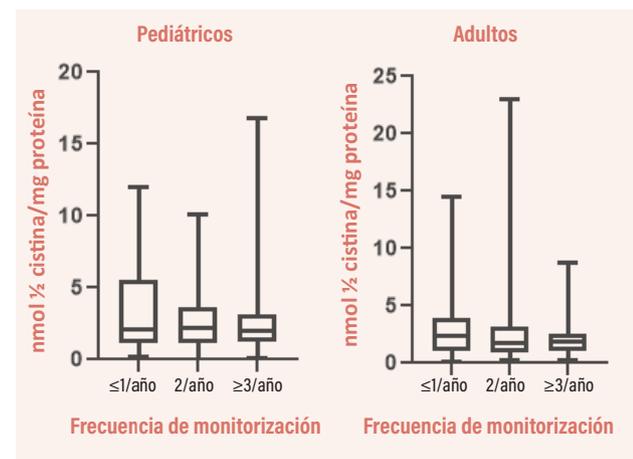


Se han analizado un total de 1194 muestras de pacientes con cistinosis en los últimos 12 años, entre las que 722 corresponden a los pacientes pediátricos y 472 a los pacientes adultos. Se observa la distribución de las muestras en las que se obtienen unos niveles adecuados postratamiento (≤1), niveles próximos a la diana terapéutica y niveles elevados indicativos de un mal control terapéutico.

La media de los 1194 valores obtenidos fue de 2 nmol 1/2 cistina/mg de proteína, tanto para la población pediátrica como para la adulta, pero cabe destacar que solo se realiza el seguimiento del 59 % de pacientes adultos, por lo que no se encuentra representada la mayoría de la población adulta.

Si comparamos la media de los niveles de CISG según la frecuencia de monitorización (figura VI), se observa que cuando hay una frecuencia de monitorización menor, la media de los valores de CISG sube a 3 nmol 1/2 cistina/mg proteína.

Figura VI. Valores de cistina intragranulocitaria según la frecuencia de monitorización anual.



Se representan todos los valores de cistina intragranulocitaria según la frecuencia de monitorización durante un año. Se observa la media de valores por cada frecuencia, siendo la más elevada la de los pacientes adultos que se monitorizan con una frecuencia anual o menor.

Estabilidad de los niveles de cistina en los pacientes españoles

Al evaluar si los niveles de CISG cuantificados eran estables intraindividualmente en los pacientes con cistinosis a lo largo del tratamiento (figura VII), se observó que solo el 20 % de PCP y el 28 % de PCA (24 % del total de pacientes) presentaron niveles próximos a la diana terapéutica de forma estable. El 9 % de PCP y el 26 % de pacientes PCA (18 % del total de pacientes) presentaron siempre niveles estables pero elevados e indicativos de un mal control terapéutico. Sin embargo, el 58 % de los pacientes (71 % PCP y 46 % PCA) mostraron niveles fluctuantes, es decir, en algunos controles presentaron niveles óptimos de cistina, mientras que en otras muestras control del mismo paciente se observaron niveles elevados.

Número de nuevos diagnósticos de cistinosis en la población española

Durante 12 años también se han estudiado los niveles de CISG en 100 pacientes con sospecha diagnóstica de cistinosis. El número de pacientes analizados con sospecha de cistinosis ha sido estable durante estos años, con una media de 8 pacientes por año. De estos pacientes, se ha alcanzado el diagnóstico en 25 de ellos (19 PCP y 6 PCA), lo que supone una media de 2 pacientes diagnosticados por año.

Incidencias habituales en la monitorización de cistina intragranulocitaria

En el periodo de este estudio, se han recibido unas 45 muestras (4 % de las muestras totales) en las que no se pudo llevar a cabo la valoración de la CISG debido a alguna incidencia. En 13 muestras (29 % de las incidencias) no se pudo realizar una correcta separación de granulocitos por el largo tiempo transcurrido (>24 h) desde la extracción hasta su llegada al laboratorio; 12 muestras (27 % de las incidencias) llegaron con un volumen muy insuficiente, <3 mL; 11 muestras (24 % de las incidencias) fueron incorrectas por no recogerlas sobre heparina; y 9 muestras llegaron coaguladas (20 % de las incidencias).

DISCUSIÓN Y COMPARATIVA CON OTROS PAÍSES

Este es el primer estudio publicado con una cohorte grande de pacientes afectados de cistinosis en España. A nivel nacional, en los últimos 30 años se ha realizado el diagnóstico bioquímico de 94 pacientes con cistinosis mediante la valoración de CISG. En Alemania se ha descrito una corte similar de unos 130 pacientes³⁸.

Se conoce que la medición cistina intraleucocitaria no solo es útil para el diagnóstico, sino también para la monitorización del tratamiento, ya que proporciona una visión indirecta de la adherencia al tratamiento con cisteamina. El objetivo terapéutico es permanecer en unos niveles R1 nmol 1/2 de cistina/mg de proteína³⁷.

En este trabajo se han analizado los datos obtenidos durante 12 años de la valoración de CISG en pacientes españoles con cistinosis, tanto en edad pediátrica como en edad adulta, con el fin de estudiar las posibles diferencias entre estos dos grupos de pacientes en cuanto a la monitorización de CISG y, en consecuencia, en cuanto a la adherencia al tratamiento con cisteamina. Este estudio pone de manifiesto la situación real en España, puesto que todas las determinaciones de cistina se centralizan en un único laboratorio.

De los 94 pacientes españoles diagnosticados, durante 12 años se ha realizado la valoración de CISG en 74 de ellos. En los últimos años se ha perdido el seguimiento del 41 % de los PCA y del 11 % de los PCP, reflejándose así una menor adherencia al tratamiento en edad adulta. Por lo tanto, según nuestros datos, se está monitorizando al 89 % de los PCP y el 59 % de los PCA. Estos datos se correlacionan con la encuesta realizada en España en el año 2015 sobre la adherencia al tratamiento, en la que se evidenció que el 89 % de los pacientes menores de 11 años tenían un buen cumplimiento terapéutico, mientras que en adultos solo sucedía en el 56 % de los pacientes¹³. Se demuestra así que existe una correlación entre la monitorización de CISG y la adherencia al tratamiento en nuestra población. En otro estudio realizado en Francia también observaron que la adherencia al tratamiento disminuye en la adolescencia y en los pacientes adultos³⁹. Se ha estimado que solo un tercio de los pacientes son capaces de seguir estrictamente el tratamiento¹².

En cuanto a la frecuencia de monitorización, destaca que en los PCA se observa una menor frecuencia de monitorización en comparación con los PCP (figura IV). Si se comparan nuestros datos con otra cohorte de 300 pacientes alemanes publicada⁴⁰, en Alemania el 42 % de los pacientes se controlan 4 veces al año, siendo el 12 % de los pacientes de nuestra cohorte. El 38 % de los pacientes alemanes se controlan 3 veces al año, mientras que en pacientes españoles esto sucede en el 19 %. Un 11 % y 5 % de los pacientes reportados se monitorizan 2 veces y 1 vez al año respectivamente, mientras que en España el 32 % se controla 2 veces al año, y el 35 %, una vez al año. Los pacientes que se controlan con una frecuencia de <1 vez al año son el 4 % en Alemania y el 1 % en España.

En el mismo estudio también reportan⁴⁰ que los pacientes que se monitorizan con menos frecuencia obtie-

nen unos valores más elevados de cistina, que se podría justificar porque con un mayor tiempo de falta de seguimiento puede haber un menor ajuste de la medicación. Si se calcula en nuestra población la media de los valores de CISG según la frecuencia de monitorización, esta es de 2 cuando la frecuencia de monitorización es >2 veces al año, mientras que en los pacientes monitorizados R1 vez al año, la media de los valores de CISG incrementa a 3, no observándose diferencia entre pacientes adultos y pediátricos (figura VI). Quizás si se valorara el 41 % de pacientes adultos que no se están monitorizando, la media de valores de CISG en adultos sería mayor, dada la menor adherencia al tratamiento en edad adulta^{13,39}.

De las 1194 muestras en las que se ha valorado la CISG durante este periodo de tiempo (2009-2021), solo el 22 % del total (20 % de muestras de PCP y 26 % de muestras de PCA) mostraron niveles de CISG óptimos (R1 nmol ½ cistina/mg de proteína), figura V. En otro estudio con una cohorte de 300 pacientes se presentaban valores dentro del rango terapéutico en el 36 % de las muestras⁴⁰, siendo un porcentaje algo más elevado que en nuestra población. En nuestra cohorte, alrededor del 50 % de muestras tanto de PCP como de PCA presentaron niveles >2 nmol ½ cistina/mg de proteína. El resto de las muestras, un 31 % y 25 % de PCP y PCA respectivamente, mostraron niveles entre 1 y 2 nmol ½ cistina/mg de proteína (figura V). Destaca que el porcentaje es muy similar tanto en edad pediátrica como en edad adulta.

Al comparar los niveles de cistina en edad pediátrica y en adultos, ambas poblaciones presentan una media de 2 nmol ½ cistina/mg proteína, lo cual representa una media ligeramente más elevada que en otros países⁴¹, tal como se refleja en la tabla I. Sin embargo, los datos que se reportan pertenecen a pacientes que han iniciado el tratamiento antes de los dos años de vida. En un estudio publicado en el año 2020 sí se diferencia entre población pediátrica y adulta, y en este caso la media de valores de cistina intraleucocitaria se muestra más elevada en adolescentes y adultos que en pediátricos, siendo de 0,7-0,95 y 0,6 respectivamente⁴⁰. En nuestra población no se aprecia esa diferencia entre PCP y PCA, probablemente debido a que el 41 % de los adultos no están en seguimiento. En un estudio publicado en paralelo de granulocitos *versus* leucocitos mixtos, se confirma que los valores son más elevados en la población de granulocitos³⁶, lo que se correlacionaría con que nuestras medias de resultados

Tabla I. Comparativa de la media de valores de cistina intraleucocitaria en pacientes con cistinosis en tratamiento en diferentes países.

PAÍS (N.º PACIENTES)	ESPAÑA ** (N=74)	REINO UNIDO * (N=151)	FRANCIA * (N=90)	ALEMANIA Y AUSTRIA * (N=84)	ITALIA Y ESPAÑA * (N=47)	BÉLGICA Y HOLANDA (N=41)	TURQUÍA (N=40)
Media valores nmol ½ cistina/mg proteína)	2	1,4	1,7	1,4	1,2	1,4	1,8
Tipo muestra	Granulocitos	Leucocitos totales	Leucocitos totales	Leucocitos totales	Leucocitos totales	Leucocitos totales	Leucocitos totales

*Datos obtenidos de la publicación⁴⁰ y son pacientes que han iniciado tratamiento antes de los 2 años de vida. En el caso de la cohorte de este estudio**, son todos los pacientes, independientemente del año de inicio del tratamiento.

sean superiores a los publicados con la valoración de leucocitos totales.

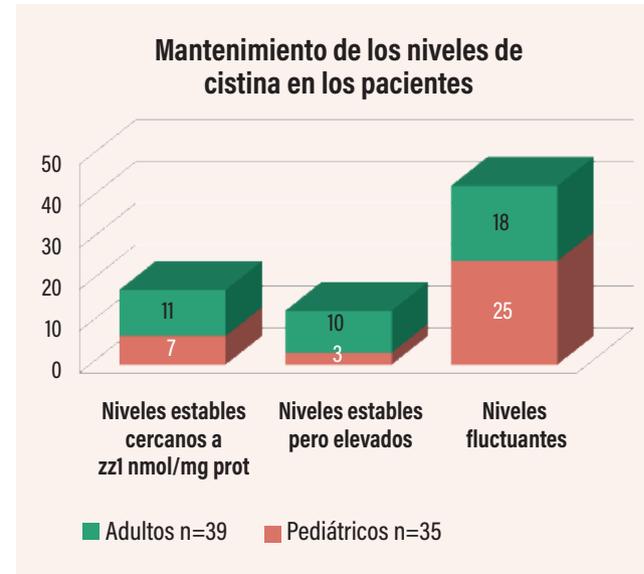
Haciendo una reflexión sobre si es mejor determinar la cistina en leucocitos totales o en granulocitos, se conoce que la extracción de granulocitos presenta una mayor dificultad de toma de muestra y de almacenamiento, ya que se requiere extraer los granulocitos antes de las 24 horas posextracción^{33,42,43}. Sin embargo, en 1970, Schulman y colaboradores⁴³ demostraron que la acumulación de cistina en los leucocitos cistinóticos se localizaba principalmente en células sanguíneas fagocíticas más que en los linfocitos. Un estudio comparativo de la valoración de cistina en granulocitos y leucocitos mixtos demostró una mayor sensibilidad utilizando granulocitos⁴⁴; sus resultados fueron equiparables a los de Smolin y colaboradores³⁵, que encontraron una menor cantidad de cistina en los leucocitos mixtos, en comparación con los granulocitos, tanto en heterocigotos (en un paciente no tratado) como en pacientes en tratamiento con cisteamina. El resultado del contenido de cistina intracelular de los controles sanos no difería entre los leucocitos totales y los granulocitos, posiblemente porque las concentraciones de cistina son bajas en las personas sanas. Esto explicaría que los valores de referencia con nuestra metodología sean similares a los métodos que utilizan leucocitos totales.

En nuestro centro se realizó un estudio comparativo entre granulocitos y leucocitos totales en un total de 6 pacientes, que enviaron a la vez doble muestra para realizar la metodología con los dos tipos celulares. Sin embargo, no se observó una buena correlación. Se necesitaría un mayor número de pacientes por duplicado para obtener resultados concluyentes antes de realizar el cambio a leucocitos mixtos a fin de mejorar las complicaciones del aislamiento de granulocitos, aunque nuestro laboratorio tiene mucha experiencia en este proceso.

Otros grupos han desarrollado nuevas metodologías para la extracción de granulocitos utilizando inmunomagnetismo, cuyo objetivo es evitar la necesidad de separar inmediatamente los granulocitos y continuar así con el estudio en este tipo celular, que es el más adecuado³⁶.

Si analizamos la estabilidad de los niveles de CISG intraindividualmente, por un lado observamos que el 58 % de los pacientes (71 % PCP y 46 % PCA) presentaban niveles fluctuantes, es decir, en algunas muestras se hallan valores indicativos de buen control terapéutico (figura VII). Esto estaría de acuerdo con las fluctuaciones a nivel individual observadas por Linden y colaboradores⁴⁰, que también hallan muchas fluctuaciones a nivel individual. Por otro lado, hay una serie de pacientes, el 8 % de PCP y el 25 % de PCA (18 % del total), que presentan siempre niveles elevados de forma estable. Finalmente, solo el 24 % de los pacientes (24 % PCP y 28 % PCA) presentan niveles cercanos a la diana terapéutica de forma continuada (figura VII). El porcentaje de pacientes bien controlados es inferior al publicado por otros estudios.

Figura VII. Mantenimiento de los niveles de cistina intraindividual en los pacientes españoles con cistinosis.



Se muestra el número de pacientes que presentan unos niveles estables de cistina intragranulocitaria indicativos de buen control terapéutico, niveles estables pero indicativos de un mal control de tratamiento, así como el número de pacientes que presentan valores muy fluctuantes. Se muestran los resultados tanto en la población pediátrica como en la adulta.

En un estudio publicado con 15 pacientes diagnosticados antes de los 6 años y tratados con cisteamina de liberación retardada, el porcentaje de pacientes bien controlados con los niveles de cistina en leucocitos totales fue aumentando durante los 18 meses del estudio de 20 a 77 %³⁰. Cabe destacar que es una de las cohortes de pacientes con menor edad publicada y con un tratamiento muy temprano, lo que favorece el buen control terapéutico. En otro estudio alemán de 67 pacientes se describe que el 69 % de ellos presentan niveles R1 nmol ½ cistina/mg proteína⁴⁶. Aunque estos investigadores destacaban que, en comparación con los resultados internacionales^{41,47}, esta cohorte tuvo un control terapéutico general excepcional y que, a nivel individual, sí se observaban fluctuaciones.

Conviene destacar que todos los trabajos con los que se compara nuestro estudio valoran la cistina en leucocitos totales, y no en granulocitos. En un estudio de pacientes de Alemania, Bélgica y Holanda en el que se empleó una nueva metodología para extraer los granulocitos con imanes, se reportó que el 43 % de los 61 pacientes estudiados se hallaban en niveles óptimos, e iría más en línea con el 36 % publicado por Linden y colaboradores⁴⁰.

La fluctuación de los niveles observados y el menor porcentaje de pacientes con niveles de CISG dentro de la diana terapéutica en nuestra población podría deberse al mal cumplimiento terapéutico, a una inadecuada administración del fármaco o a no extraer la muestra en las horas postratamiento adecuadas. Sin embargo, también podría deberse al poco volumen de muestra que llega al laboratorio (<6 mL); a menudo nos llega un volumen de muestra de entre 3 y 6 mL, la mayoría muestras pediátri-

cas, y se prosigue con el estudio por petición del clínico para evitar una nueva extracción, pero esto afecta al rendimiento del aislamiento de granulocitos, en especial si los pacientes presentan leucopenia, pudiendo influir en la valoración final de CISG y en la comparabilidad entre las diferentes muestras. Esto podría verse reflejado, ya que en el caso de los PCA que suelen enviar un volumen de muestra más adecuado se presentan niveles más estables (figura VII). Por ello, es fundamental poner de manifiesto la importancia de que llegue un volumen mínimo de 6 mL de muestra sobre heparina, para obtener una correcta separación de granulocitos.

Finalmente, se han postulado nuevos biomarcadores para la monitorización de tratamiento debido a que los neutrófilos, las principales células que acumulan cistina en la sangre, tienen una vida muy corta (24 horas)⁴⁸. La medición de cistina en los glóbulos blancos representa solo un periodo muy corto de cumplimiento o eficacia terapéutica⁴², y en el caso de futuras modalidades de tratamiento, como la terapia génica basada en células madre hematopoyéticas, podrían necesitarse otros marcadores.

Los biomarcadores de la activación de los macrófagos son candidatos prometedores para la monitorización, ya que reflejan la inflamación mediada por los macrófagos en la cistinosis. Entre ellos, se ha demostrado que la actividad de la quitotriosidasa en plasma se observa elevada en aquellos pacientes que presentan unos niveles de cistina >2, demostrando ser un buen marcador predictor de niveles de cistina elevados, y además se correlaciona significativamente con las complicaciones extrarrenales⁴⁹. Sin embargo, existe alguna limitación, debido a que hay una variante en el exón 10 del gen que codifica la quitotriosidasa que es común en la población general y que causa una disminución de su actividad⁴⁹.

Además, los expertos franceses propusieron la interpretación simultánea de cistina en leucocitos y los niveles plasmáticos de cisteamina para adaptar la dosis de tratamiento⁵⁰. Esto se corrobora en otro estudio, donde la disminución de las concentraciones plasmáticas de cisteamina se correlacionaron con la reducción de las concentraciones de cistina en los glóbulos blancos^{30,49}.

CONCLUSIONES

El hecho de tener centralizada la determinación de cistina para el control de tratamiento de la cistinosis en un único centro ha permitido llevar a cabo un análisis exhaustivo de los datos de los últimos 12 años. La monitorización de cistina intragranulocitaria se correlaciona con las encuestas de adherencia al tratamiento realizadas previamente en nuestra población, demostrando una menor adherencia al tratamiento en edad adulta. No se observan diferencias en los niveles de cistina intragranulocitaria entre los pacientes con cistinosis pediátricos y los de edad adulta. La media de los valores es más elevada que en otras poblaciones, pero esto se podría justificar

por la utilización de granulocitos en lugar de leucocitos totales. Sí que se observa una menor frecuencia de monitorización en los pacientes adultos y una mayor fluctuación de los niveles de cistina en pacientes pediátricos, por lo que es importante asegurar que las condiciones de la toma de muestra sean las correctas en cuanto a volumen (>6 mL) y tiempo postratamiento transcurrido, aparte de controlar la adecuada administración de cisteamina.

En nuestra población solo el 24 % de los pacientes presentan niveles indicativos de un buen control terapéutico, un porcentaje inferior al de otras poblaciones. Se está trabajando para ampliar nuevos biomarcadores que puedan ayudar a adecuar mejor la dosis del tratamiento, como es la actividad de quitotriosidasa y la cisteamina en plasma.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los técnicos del laboratorio implicados en este estudio su excelente trabajo y dedicación durante estos años: Patricia Alcalà, Carles Zaragoza, Cristina Cutillas, Sabine Richard, Montse Fernández, Cristina Fernández, Tatiana Collado, Judit Pérez. Y, asimismo, a los facultativos implicados, Dra. Sonia Pajares, Dra. Ribes y Dr. Bali Morales por su apoyo, trabajo y dedicación.

También quiero extender mi reconocimiento a todos los clínicos que diagnostican y realizan el seguimiento de los pacientes con cistinosis por confiar en nuestro laboratorio y por compartir el seguimiento de los casos. A Ana Güell, Laura Acuna y Elisa Giner por ayudarnos siempre a transmitir la información a los hospitales de las condiciones especiales para la recogida de la muestra y por tratar de mejorar los circuitos para la monitorización de la cistina.

Por último, y lo más importante, quiero agradecer a las familias por su esfuerzo y comprensión para realizar dicho seguimiento y a la Asociación Cistinosis España.

Conflicto de intereses

Ninguno.

Bibliografía

1. Town M, Jean G, Cherqui S, Attard M, Forestier L, Whitmore S A et al. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet.* 1998; 18 (4): 319-324.
2. Thoene JG, Lemons RM. Cystine accumulation in cystinotic fibroblasts from free and protein-linked cystine but not cysteine. *Biochem J.* 1982; 208:823-30.
3. Gahl WA, Thoene JG, Schneider JA. Cystinosis. *N Engl J Med.* 2002; 347:111-21.
4. Mahoney CP, Striker GE. Early development of the renal lesions in infantile cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2000;15:50-6.
5. Schneider JA, Bradley K, Seegmiller JE. Increased cystine in leukocytes from individuals homozygous and heterozygous for cystinosis. *Science.* 1967;157:1321-2.
6. Emma F, Nesterova G, Langman C, Labbé A, Cherqui S, Goodyer P, et al. Nephropathic cystinosis: An international consensus document. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29 Suppl 4:iv87-94.
7. Anikster Y, Lucero C, Touchman JW, Huizing M, McDowell G, Shotelersuk V, et al. Identification and detection of the common 65-kb deletion breakpoint in the nephropathic cystinosis gene (CTNS). *Mol Genet Metab.* 1999; 66:111-6.
8. David D, Berlingerio SP, Elmonem MA, Arcolino FO, Soliman N, van den Heuvel B, et al. Molecular basis of cystinosis: geographic distribution, functional consequences of mutations in the CTNS gene, and potential for repair. *Nephron.* 2019; 141:133-46.
9. Freed KA, Blangero J, Howard T, Johnson MP, Curran JE, Garcia YR, et al. The 57 kb deletion in cystinosis patients extends into TRPV1 causing dysregulation of transcription in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Genet.* 2011; 48:563-6.
10. 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(5):1352-62.
11. Macías Vidal J, Rodés M, Hernández-Pérez JM, Vilaseca MA, Coll MJ. Analysis of the CTNS gene in 32 cystinosis patients from Spain. *Clin Genet.* 2009;76:486-9.
12. Kleta R, Bernardini I, Ueda M, Varade WS, Phornphutkul C, Krasnewich D, et al. Long-term follow-up of well-treated nephropathic cystinosis patients. *J Pediatr.* 2004;145(4):555-560.
13. Ariceta G (A), Lara E, Camacho JA, Oppenheimer F, Vara J, Santos F, et al. Cysteamine (Cystagon®) adherence in patients with cystinosis in Spain: successful in children and a challenge in adolescents and adults. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(3):475-80.
14. Ariceta G, Giordano V, Santos F. Effects of long-term cysteamine treatment in patients with cystinosis. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(4):571-578.
15. Liu B, Du H, Rutkowski R, Gartner A, Wang X: LAAT-1 is the lysosomal lysine/arginine transporter that maintains amino acid homeostasis. *Science.* 2012; 337: 351-354.
16. Jézégou A, Llinares E, Anne C, Kieffer-Jaquino S, O'Regan S, Aupetit J, et al. Heptahelical protein PQLC2 is a lysosomal cationic amino acid exporter underlying the action of cysteamine in cystinosis therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: E3434-E3443.
17. Gahl W, Balog JZ, Kleta R. Nephropathic cystinosis in adults: natural history and effects of oral cysteamine therapy. *Ann Inter Med.* 2007;147:242-50.
18. Topaloglu R, Gültekingil-Keser A, Gülhan B, Ozaltin F, Demir H, Ciftci T, et al. Cystinosis beyond kidneys: gastrointestinal system and muscle involvement. *BMC Gastroenterol.* 2020 20:242.
19. Castro-Balado A, Mondelo-García C, Varela-Rey I, Moreda-Vizcaino B, Sierra-Sanchez JF, Rodriguez-Ares MT, et al. Recent research in ocular cystinosis: drug delivery systems, cysteamine detection methods and future perspectives. *Pharmaceutics.* 2020; 12:1177.
20. Wilmer MJ, Schoeber JP, van den Heuvel L, Levchenko EN. Cystinosis: practical tools for diagnosis and treatment. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:205-15.
21. Geelen JM, Monnens LAH, Levchenko E. Follow-up and treatment of adults with cystinosis in the Netherlands. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1766-70.
22. Watson AR, Harden PN, Ferris ME, Kerr PG, Mahan JD, Ramzy MF. International Society of Nephrology; International Pediatric Nephrology Association. Transition from pediatric to adult renal services: a consensus statement by the International Society of Nephrology (ISN) and the International Pediatric Nephrology Association (IPNA). *Kidney Int.* 2011;80:704-7.
23. Nesterova G, Williams C, Bernardini I, Gahl WA. Cystinosis: renal glomerular and renal tubular function in relation to compliance with cystine-depleting therapy. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(6):945-51
24. Ariceta G (B), Camacho JA, Fernández-Obispo M, Fernández-Polo A, Gamez J, García-Villoria J, et al. Cystinosis in adult and adolescent patients: Recommendations for the comprehensive care of cystinosis. *Nefrologia.* 2015;35(3):304-21.
25. Schneider JA, Clark KF, Greene AA, Reisch JS, Markello TC, Gahl WA, et al. Recent advances in the treatment of cystinosis. *J Inheret Metab Dis.* 1995;18(4):387-97.
26. Dohil R, Rioux P. Pharmacokinetic studies of cysteamine bitartrate delayed-release. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2013;2(2):178-185.
27. Langman CB, Greenbaum LA, Grimm P, Sarwal M, Niaudet P, Deschenes G, et al. Quality of life is improved and kidney function preserved in patients with nephropathic cystinosis treated for 2 years with delayed-release cysteamine bitartrate. *J Pediatr.* 2014;165(528-33):e1.
28. Veys KR, Besouw MT, Pinxten AM, van Dyck M, Casteels I, Levchenko EN. Cystinosis: a new perspective. *Acta Clin Belg.* 2016;71(3):131-137.
29. Ahlenstiel-Grunow T, Kanzelmeyer N, Froede K, Kreuzer M, Drube J, Lerch C, et al. Switching from immediate- to extended-release cysteamine in nephropathic cystinosis patients: a retrospective real-life single-center study. *Pediatric Nephrol.* 2017; 32:91-7.
30. Vaisbich MH, Caires Ferreira J, Price H, Young KD, Sile S, Checchi G, Langman CB. Cysteamine bitartrate delayed-release capsules control leukocyte cystine levels and promote statural growth and kidney health in an open-label study of treatment-naïve patients <6 years of age with nephropathic cystinosis. *JIMD Rep.* 2021;63(1):66-79.
31. Oshima RG, Willis RC, Furlong CE and Schneider JA. The utilization of a cystine binding protein from *Escherichia coli* for the determination of acid-soluble cystine in small physiological samples. *J Biol Chem.* 1974; 249: 6033-6039.
32. Chabli A, Aupetit J, Raehm M, Ricquier D, Chadeaux-Vecchiemans B. Measurement of cystine in granulocytes using liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2007; 40: 692-698.
33. García-Villoria J, Hernández-Pérez JM, Arias A, Ribes A. Improvement of the cystine measurement in granulocytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2013;46(3):271-4.
 34. Johana Maria Guevara Morales, Olga Yaneth Echeverri Peña. Implementation of an intraleukocitary cystine quantification method for diagnosis of cistinosis. *Nefrologia (Engl Ed).* 2020;40(1):99-103.
 35. Smolin LA, Clark KF, Schneider JA. An improvement method for heterozygote detection of Cystinosis using polymorphonuclear leucocytes. *Am J Hum Genet.* 1987; 41:266-275.
 36. Gertsman I, Johnson WS, Nishikawa C, Gangoiti JA, Holmes B, Barshop BA. Diagnosis and Monitoring of Cystinosis Using Immunomagnetically Purified Granulocytes. *Clin Chem.* 2016;62(5):766-72.
 37. Brodin-Sartorius A, Tête MJ, Niaudet P, Antignac C, Guest G, Ottolenghi C, et al. Cysteamine therapy delays the progression of nephropathic cystinosis in late adolescents and adults. *Kidney Int.* 2012;81:179-89.
 38. Hohenfellner K, Deerberg-Wittram J. Coordinated, cost-effective care for rare disease: the cystinosis outpatient consultation program at RoMed. *NEJM Catal Innov Care Deliv.* 2020; 1. doi: 10.1056/CAT.19.1116
 39. Gaillard S, Roche L, Lemoine S, Deschênes G, Morin D, Vianey-Saban C, et al. Adherence to cysteamine in nephropathic cystinosis: A unique electronic monitoring experience for a better understanding. A prospective cohort study: CrYSTobs. *Pediatr Nephrol.* 2021;36(3):581-589.
 40. Linden S, Klank S, Harms E, Grüneberg M, Park JH, Marquardt T. Cystinosis: Therapy adherence and metabolic monitoring in patients treated with immediate-release cysteamine. *Mol Genet Metab Rep.* 2020;24:100620.
 41. Emma F, Van't Hoff W, Hohenfellner K, Topaloglu R, Greco M, Ariceta G, et al. An international cohort study spanning five decades assessed outcomes of nephropathic cystinosis. *Kidney Int.* 2021; 100:1112-23.
 42. Meredith C Fidler, Jon A Gangoiti, Jerry A Schneider, Bruce A Barshop. Time before isolating cystinotic leukocytes affects reliability of cystine determination. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(12):2465-6.
 43. Elmonem MA, Makar SH, van den Heuvel L, Abdelaziz H, Abdelrahman SM, Bossuyt X, et al. Clinical utility of chitotriosidase enzyme activity in nephropathic cystinosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2014; 9: 155.
 44. Schulman JD, Wong VG, Kuwabara KH, Bradley KH, Seegmiller JE. Intracellular cystine content of leukocyte populations in cystinosis. *Arch Intern Med.* 1970;125:660-4.
 45. Levchenko E, de Graaf-Hess A, Wilmer M, van den Heuvel L, Monnens L, Blom H. Comparison of cystine determination in mixed leukocytes vs polymorphonuclear leukocytes for diagnosis of cystinosis and monitoring of cysteamine therapy. *Clin Chem.* 2004;50(9):1686-8.
 46. O'Connell N, Oh J, Arbeiter K, Büscher A, Haffner D, Kaufeld J, et al. Patients With Infantile Nephropathic Cystinosis in Germany and Austria: A Retrospective Cohort Study. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:864554.
 47. Bertholet-Thomas A, Berthiller J, Tasic V, Kassai B, Otukesh H, Greco M, et al. Worldwide view of nephropathic cystinosis: results from a survey from 30 countries. *BMC Nephrol.* 2017; 18:210.
 48. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JAM, Koenderman L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol.* 2013; 94: 595-601.
 49. Veys KRP, Elmonem MA, Dyck MV, Janssen MC, Cornelissen EAM, Hohenfellner K, et al. Chitotriosidase as a Novel Biomarker for Therapeutic Monitoring of Nephropathic Cystinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2020; 31:1092-106.
 50. Bouazza N, Tréluyer JM, Ottolenghi C, Urien S, Deschenes G, Ricquier D, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of cysteamine in nephropathic cystinosis patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:86.