

# Cuantificación de cistina en orina espontánea para la detección de cistinuria\*

*Quantitation of urinary cystine for the detection of cystinuria*

*Determinação quantitativa de cistina urinária para a detecção de cistinuria*

- Luz Mery Buitrago<sup>1a</sup>, Rigoberto Gómez Cruz<sup>2b</sup>, Carlos Olimpo Mendivil<sup>3c</sup>, Adis Ayala Fajardo<sup>1d</sup>, Jesús Alfredo Uribe Ardila<sup>4a</sup>

<sup>1</sup> M.Sc.en Biología.

<sup>2</sup> Químico.

<sup>3</sup> Doctor en Bioquímica Nutricional.

<sup>4</sup> M.Sc. en Biología.

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones en Bioquímica (CIBI), Universidad de Los Andes, Carrera 1 N° 18 A-10, Edificio M, Tercer piso, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>b</sup> Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>c</sup> Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>d</sup> Facultad de Ciencias y Educación. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, D.C., Colombia.

## Resumen

La cistinuria es un error innato del metabolismo ocasionado por un defecto en el transporte renal de arginina, ornitina, lisina y cistina. La acumulación de este último aminoácido de baja solubilidad ocasiona episodios de urolitiasis característicos de la enfermedad. En el presente estudio se estandarizó un método espectrofotométrico confiable y de fácil ejecución para la determinación cuantitativa de cistina en orina espontánea. Se realizó el análisis en 184 muestras, correspondientes a 104 controles y 80 pacientes con urolitiasis. Con el objeto de validar el método y posteriormente establecer un rango de excreción normal en la población colombiana se evaluaron los siguientes parámetros: exactitud, precisión, linealidad y límite de detección. La técnica mostró coeficientes de variación intra e inter ensayos inferiores al 10% y una excelente linealidad, con un coeficiente  $r^2$  entre concentraciones conocidas de cistina y absorbancia generada por el método de 0,998. Usando esta técnica se encontró un valor normal de excreción de 1,35 a 110,11 mg cistina/g creatinina. En cinco pacientes, de los 80 con nefrolitiasis, se hallaron valores elevados de cistina, compatibles con cistinuria. El método utilizado puede implementarse en cualquier laboratorio clínico para confirmar el diagnóstico de cistinuria e iniciar un tratamiento oportuno.

**Palabras clave:** cistina \* aminoaciduria \* cistinuria \* urolitiasis \* metabolismo \* cromatografía \* validación \* valores de referencia

## Summary

*Cystinuria is an inborn error of metabolism, caused by a defect in renal tubular transport of the following aminoacids: arginine, ornithine, lysine and cystine. Accumulation of the latter poorly soluble aminoacid leads to the development of kidney stones, characteristic of the disease. In this study, an easy and dependable spectrophotometric method for the quantitative determination of urinary cystine was standardized. The analysis was performed on 184 samples*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

from 104 controls and 80 patients with kidney stones. In order to validate the method and later establish a range of normal urinary cystine excretion in the Colombian population, the following parameters were evaluated: Accuracy, precision, linearity and lower limit of detection. The technique showed intra and inter assay coefficients of variation below 10%, and excellent linearity, with an R square ( $r^2$ ) coefficient between known cystine concentrations and absorbance generated by the method at 0.998. Using this technique, a normal urinary cystine excretion range of 1.35-110.11 mg cystine/g creatinine was found. Among the 80 patients with kidney stones, elevated urinary cystine levels were found in 5 of them, compatible with the presence of cystinuria. This method can be implemented in any clinical laboratory to confirm the diagnosis of cystinuria and provide opportune treatment.

**Keywords:** cystine \* aminoaciduria \* cystinuria \* kidney stones \* metabolism \* chromatography \* validation \* reference values

## Resumo

A cistinúria é um erro inato do metabolismo, causado por um defeito no transporte tubular renal de arginina, ornitina, lisina e cistina. A acumulação deste último aminoácido, pouco solúvel, provoca episódios de urolitíase, característicos da doença. No presente estudo, foi padronizado um método espectrofotométrico confiável e de fácil execução para a determinação quantitativa de cistina em urina espontânea. A análise foi realizada em 184 amostras de 104 controles e 80 pacientes com urolitíase. A fim de validar o método e, posteriormente, estabelecer um intervalo de excreção normal na população colombiana, foram avaliados os seguintes parâmetros: exatidão, precisão, linearidade e limite inferior de detecção. O método mostrou coeficientes de variação intra e inter ensaios inferiores a 10%, e excelente linearidade, com um coeficiente R quadrado ( $r^2$ ) entre concentrações conhecidas de cistina e absorvância gerada pelo método de 0,998. Com esta técnica, foi encontrado um valor normal de excreção de 1,35-110,11 mg cistina/g de creatinina. Entre os 80 pacientes com urolitíase, foram encontrados níveis elevados de cistina em cinco deles, compatíveis com a presença de cistinúria. Este método pode ser implementado em qualquer laboratório clínico para confirmar o diagnóstico de cistinúria e proporcionar um tratamento oportuno.

**Palavras-chave:** cistina \* aminoacidúria \* cistinúria \* urolitíase \* metabolismo \* cromatografia \* validação \* valores de referência

## Introducción

Las aminoacidurias son errores innatos del metabolismo que se caracterizan por defectos en la reabsorción tubular de aminoácidos debido a mutaciones en proteínas de membrana involucradas en su transporte. La cistinuria es una aminoaciduria con patrón de herencia autosómico recesivo que tiene una frecuencia promedio en la población de 1 en 7.000 nacimientos (1) y es causada por defectos en la reabsorción renal e intestinal de cistina y de los aminoácidos básicos arginina, ornitina y lisina (2).

Se trata entonces de un defecto ocasionado por alteraciones en el sistema de transporte denominado  $b^{0,+}$  (3), conformado por las proteínas de membrana rBAT y  $b^{0,+}AT$ . La glicoproteína rBAT es codificada por el gen *SLC3A1*, localizado en el cromosoma 2p16.3-21 (4) y la proteína  $b^{0,+}AT$  por el gen *SLC7A9*, cuyo locus está en el cromosoma 19q12-13 (5). El sistema de transporte  $b^{0,+}$  se expresa en la membrana apical de las células epiteliales del túbulo contorneado proximal de la nefrona y tiene como función regular el movimiento de aminoácidos al interior o exterior de la célula; específicamente permite la entrada de cistina y aminoácidos básicos desde el lumen hacia el interior de las células renales acoplado a la

salida de aminoácidos neutros. En el caso particular de la cistinuria, las mutaciones en los genes *SLC3A1* y *SLC7A9* ocasionan el defecto en este sistema de transporte lo cual conlleva a una reducción en la reabsorción apical de los aminoácidos básicos y cistina y la subsecuente acumulación de estos en el lumen del túbulo renal (6) (7).

La cistina se caracteriza por su limitada solubilidad en un pH ácido, por lo cual un aumento anormal en la concentración de este aminoácido conlleva a la formación de cristales hexagonales (8) en el tubo colector (donde se acidifica la orina), o a la nefrolitiasis, rasgos patognomónicos de los pacientes cistinúricos (9) (10).

La base del diagnóstico de la cistinuria es la elevación en orina de cistina, lisina, arginina y ornitina. Sin embargo, la cuantificación de cistina reviste especial importancia, dado que el aumento anormal de los demás aminoácidos es compatible con un grupo de desórdenes metabólicos denominado hiper dibásico aminoacidurias (11), mientras que el aumento de cistina en orina es inequívocamente indicativo de cistinuria. Para la cuantificación de cistina se han propuesto la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) (12), cromatografía de intercambio iónico (13) y electroforesis (14); sin embargo, estas metodologías resultan dispen-

diosas, complejas, costosas y no siempre están disponibles en los laboratorios clínicos. Por ello, en este estudio se utilizó una modificación del método cuantitativo (15), que resulta de fácil ejecución y bajo costo y puede ser empleada en el laboratorio clínico para la detección de pacientes con cistinuria, más aún cuando ella puede ser la causa de 1-2% de las urolitiasis en adultos (16) y el 6-10% de las urolitiasis en niños (17-20).

El esquema básico de detección de cistina urinaria se realizó con una prueba cualitativa conocida como *test* de Brand (cianuro-nitroprusiato) que se fundamenta en que la cistina es reducida a cisteína cuando el cianuro sódico reacciona con la orina alcalinizada, para posteriormente producir un color magenta característico en presencia de nitroprusiato sódico (21). Sin embargo, esta prueba cualitativa es susceptible a interferencias por homocistina u otras moléculas azufradas en la orina (22) (23). Por ello, para la detección cualitativa del aminoácido cistina se realizó también una segunda prueba de cromatografía en papel, siguiendo el protocolo previamente descrito (24). Finalmente, para realizar una determinación cuantitativa que pueda ser usada para diagnosticar cistinuria, la cuantificación de cistina fue llevada a cabo por espectrofotometría empleando una adaptación del método colorimétrico de cianuro-nitroprusiato de sodio modificado (15) y usando como factor de corrección para la dilución de orina la relación cistina/creatinina.

En la actualidad no existen reportes sobre valores de excreción de cistina en orina espontánea para la población colombiana, por ello a partir de los resultados obtenidos en la cuantificación de este aminoácido en controles y pacientes con urolitiasis se establecieron valores de referencia de cistina en orina para la población sana.

## Materiales y Métodos

### PACIENTES

Se analizaron 184 individuos, 81 de género femenino y 103 de género masculino, con un rango de edad entre 2 días y 63 años. Ciento cuatro correspondían a individuos sanos (sin antecedentes de litiasis o problemas renales) y 80 a pacientes en seguimiento por urolitiasis. Las muestras de orina fueron procesadas en el Centro de Investigaciones en Bioquímica de la Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia, previo registro del consentimiento informado.

Las muestras de orina fueron recolectadas, de preferencia en la primera micción espontánea en la mañana y fueron preservadas en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el ensayo. Las orinas debían tener más de 20 mg/dL de creatinina, ya que orinas demasiado diluidas pueden resultar en errores de interpretación (25). Sin embargo, no se excluyó ninguna muestra por este criterio. La determinación de creatinina en orina fue establecida siguiendo el método de Jaffé (26).

### ANÁLISIS CUALITATIVO MEDIANTE LA PRUEBA DE BRAND

Todas las muestras fueron sometidas a la reacción de cianuro nitroprusiato o *test* de Brand, con el fin de valorar cualitativamente la presencia de grupos sulfhidrilos. Para este fin se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de cianuro de sodio al 5% (NaCN) (Merck CAT # 106437) a 250  $\mu\text{L}$  de orina y posteriormente se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amonio concentrado (AldrichCAT #221228) y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente se mezclaron con 25  $\mu\text{L}$  de nitroprusiato de sodio al 5% (FisherScientificCAT # ICN15206180). La prueba se consideró positiva cuando al final de la incubación las muestras presentaron una coloración magenta a la observación directa y negativa si no la desarrollaban.

### ANÁLISIS CUALITATIVO POR CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

La caracterización cromatográfica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Efron (24) para el cual se utilizaron los siguientes reactivos: Patrón: 12,6 mg de cistina, 8,8 mg de citrulina, 9,0 mg de tirosina, 3,8 mg de glicina, 4,5 mg de alanina, 5,7 mg de valina, 8,2 mg de fenilalanina, 9,1 mg de lisina, 10,5 mg de histidina, 7,3 mg de glutamina, 6,0 mg de treonina, 5,8 mg de prolina, 7,5 mg de metionina, 6,5 mg de leucina, todos los reactivos disueltos en agua desionizada a un volumen final de 50 mL. Para la fase móvil se mezclaron 60 mL de butanol, 15 mL de ácido acético y 25 mL de agua; y para el revelado se utilizaron 0,375 g de ninhidrina y 0,015 g de isatina disueltos en 150 mL de acetona. Se empleó como sustrato fijo papel Whatmann No. 1 de  $25 \times 42$  cm y el tiempo de corrida fue de 18 a 20 horas.

### DETERMINACIÓN DE CISTINA EN ORINA

Se empleó el método del cianuro-nitroprusiato de sodio modificado (15) de la siguiente manera: a 300  $\mu\text{L}$  de orina se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de *buffer* fosfato salino (PBS) al 10% pH 7,4; posteriormente se mezclaron 90  $\mu\text{L}$  de cianuro de sodio al 10% (NaCN) (Merck CAT # 106437) a cada una de las muestras; este último no se adicionó al blanco. Luego se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalizada la incubación se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de nitroprusiato de sodio al 20% (FisherScientificCAT # ICN15206180); dentro de los tres segundos después de su adición se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Biomate (ThermoElectron Corporation, Waltham, MA, Estados Unidos). La concentración de cistina de cada muestra se expresó en términos de mg de cistina por gramo de creatinina.

### CURVA DE CALIBRACIÓN DE CISTINA

La curva de calibración se efectuó a partir de una solución madre de cistina de 20 mg/dL en HCl 0,1M, y me-

diante diluciones en serie se prepararon patrones en un rango de concentración de 0,625 a 20 mg/dL que fueron procesados de igual manera que las muestras. Cada punto de la curva de calibración se procesó por duplicado.

#### VALIDACIÓN DEL MÉTODO

##### Medidas de exactitud

Se realizó un experimento de recuperación agregando a 300  $\mu$ L de una muestra control (con una concentración de cistina previamente cuantificada de 1,34 mg/dL), de forma independiente los siguientes volúmenes: 3, 6, 9 y 12  $\mu$ L respectivamente de una solución con una concentración de 4 mg/mL de cistina. Estas muestras se procesaron por triplicado de igual manera que en el procedimiento anteriormente descrito para las muestras de participantes y con el objeto de calcular el porcentaje de recuperación se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{100 \times (\text{concentración recuperada})}{\text{concentración nominal}}$$

$$\text{Concentración nominal} = \frac{C \times V \text{ del estándar} + (C \times V \text{ de la muestra})}{(V \text{ del estándar} + V \text{ de la muestra})}$$

##### Medidas de precisión

Para estimar el error aleatorio relacionado del método se determinaron la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación porcentual (CV%). Para la determinación de este parámetro se tuvo en cuenta la precisión intermedia (variación en diferentes días) y la repetibilidad del método (variabilidad en la misma ejecución analítica). Los ensayos se realizaron con seis niveles de concentración de cistina reportados en la curva de calibración; dos muestras diferentes de individuos control y dos de los pacientes afectados fueron también procesadas por triplicado.

##### Linealidad

Se evaluó la consistencia en las mediciones de seis soluciones con un rango de concentración de 0,625 a 20 mg/dL de cistina.

##### Límite inferior de detección (LID)

Se determinó el límite inferior de detección mediante la ecuación  $LID = 3s/m$ , donde s es la desviación estándar y m es la pendiente de la recta procedente de la curva de calibración realizada para evaluar la linealidad ( $y=0,1039x + 0,0325$ ).

##### Análisis estadístico

La correlación entre las variables se calculó utilizando el coeficiente de correlación lineal de Pearson y un valor de  $p$  a dos colas  $<0,01$  fue considerado signifi-

cado. Para la evaluación del porcentaje de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica se utilizó el análisis de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Todos los análisis se realizaron en el paquete Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), v.17.

## Resultados

De los 80 pacientes en seguimiento por urolitiasis 5 mostraron resultado positivo para la prueba de Brand, indicando la posible presencia de aminoácidos azufrados en orina. En la cromatografía en papel se observó una banda que indica un aumento de los aminoácidos cistina, lisina, arginina y ornitina en el paciente 45 ( $R_f=0,15$ , Figura 1, carril 3) que comigra con el patrón de aminoácidos ( $R_f=0,15$ , Figura 1, carril 7).

#### EXACTITUD DE LA PRUEBA CUANTITATIVA

La prueba presentó una exactitud igual o superior al 78%, en un rango de 78-95% y con un promedio de recuperación de 85,6% indicando que en términos

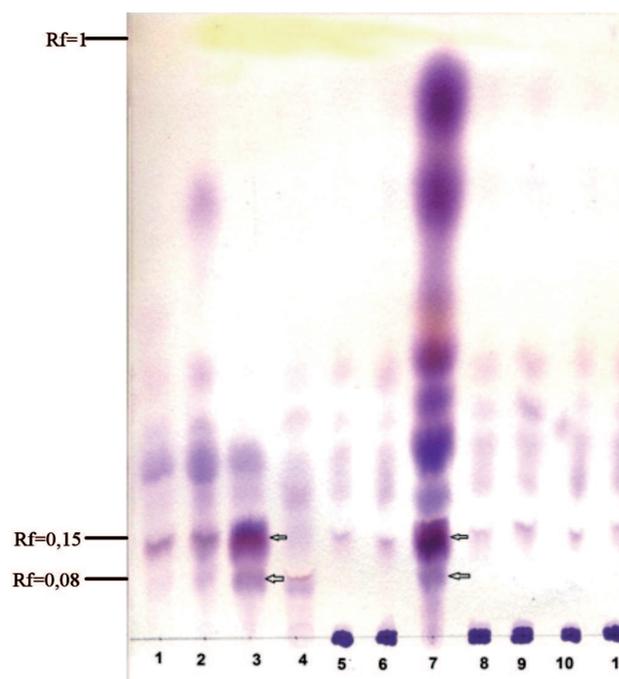


Figura 1. Cromatografía en papel de muestras de orina y sangre. Carriles 1, 4, 8, 10, 11. Controles normales de orina. Carril 2. Muestra de orina con aumento de metionina. Carril 3. Muestra de orina de paciente en seguimiento por sospecha de cistinuria, banda de cistina característica  $R_f = 0,08$  (primera flecha negra de abajo hacia arriba). La separación de aminoácidos muestra un patrón de excreción anormal donde comigran arginina, lisina y ornitina (segunda flecha negra de abajo hacia arriba) característica de estos pacientes, comparado con controles normales. Carriles 5, 6 y 9. Control normal de plasma. Carril 7. Patrón o estándar total de aminoácidos ubicado en la parte central del cromatograma, el cual muestra patrón característico de cistina  $R_f = 0,08$ .

generales los resultados de concentración de cistina obtenidos a partir del método son confiables (Tabla I).

Tabla I. Exactitud del ensayo en la medición de cistina.

Concentración conocida de cistina (mg/dL)	5,28	9,15	12,95	16,67
Valor obtenido (mg/dL)	5,03	7,97	10,11	13,71
Recuperación (%)	95,13	87,10	78,06	82,25

**PRECISIÓN**

La precisión intermedia del método se evaluó al comparar los resultados de siete mediciones de absorbancia en seis diferentes concentraciones de cistina en ensayos inter días. La menor desviación estándar obtenida para la curva de calibración fue de 0,006 mg/dL y la mayor de 0,06 mg/dL de cistina. El coeficiente de variación tuvo un valor mínimo de 3,25% y un CV mayor de 10% únicamente para las concentraciones de 20 mg/dL y 0,625 mg/dL. Al comparar la precisión del método en los controles y los individuos afectados por cistinuria, las desviaciones estándar mínimas fueron de 0,840 y 9,88 mg de cistina/g de creatinina respectivamente, en ambos casos para un CV menor al 5%, lo que indica que el método tiene una precisión apropiada (Tabla II).

La menor desviación estándar obtenida para la curva de calibración fue de 0,004 y la mayor de 0,03 mg/dL de cistina. El coeficiente de variación tuvo un valor mínimo de 0,38% (para la concentración de 10 mg/dL) y un CV máximo de 5,48% (para la concentración de 0,625 mg/dL). La desviación estándar obtenida para controles y afectados

fue de 0,86 y 32,7 mg de cistina/g de creatinina respectivamente, en ambos casos para un coeficiente de variación cercano al 5% (Tabla III).

**LÍMITE DE DETECCIÓN**

De acuerdo a la ecuación referida en la sección de métodos, la concentración mínima detectable de cistina en orina fue 0,917 mg/dL (Tabla IV).

**LINEALIDAD**

La curva de calibración de cistina a una longitud de onda de 520 nm mostró linealidad con un rango de concentraciones de 0,625 a 20 mg/dL, valores por arriba de este rango mostraron pérdida de linealidad (dato no mostrado). El coeficiente R cuadrado ( $r^2$ ) entre concentración y absorbancia para concentraciones de 0,625 a 20 mg/dL fue 0,9982 (Figura 2).

**VALORES DE REFERENCIA**

Los valores de referencia para el grupo control fueron 1,35-110,11 mg de cistina/g de creatinina (Tabla V). Este estudio también halló 5 individuos afectados por cistinuria, con edades entre 2 y 63 años. La distribución de los datos para el grupo control (n=104) mostró un valor medio aproximado de excreción de 34,3 mg de cistina/gramo de creatinina en comparación con el grupo de pacientes afectados por cistinuria (n=5) que presentaron un valor medio aproximado de 686 mg de cistina/g de creatinina (Tabla V, Figura 2). El grupo afectado presen-

Tabla II. Precisión intermedia del método espectrofotométrico.

Curva de calibración	Concentración de cistina (mg/dL)					
	20	10	5	2,5	1,25	0,625
Promedio	2,08	1,15	0,63	0,31	0,14	0,06
Desviación estándar	0,06	0,04	0,02	0,01	0,006	0,006
Coeficiente de variación %	3,25	3,77	4,26	3,38	4,76	10
Muestras de orina						
	Promedio			DE		CV(%)
Controles (Individuo 138)	47,8			0,840		1,75
Afectados por cistinuria (Individuo 45)	831,2			9,88		1,18

Tabla III. Repetibilidad del método espectrofotométrico

Curva de calibración	Concentración mg/dL					
	20	10	5	2,5	1,25	0,625
Promedio dos mediciones	2,11	1,104	0,649	0,35	0,202	0,129
Desviación estándar (s)	0,03	0,004	0,01	0,01	0,004	0,01
Coeficiente de variación (%)	1,44	0,38	1,53	3,23	2,10	5,48
Muestras de orina						
	Población		Promedio	DE	CV(%)	
Control	Muestra 1 individuo 116		12,1	0,86	7,11	
Afectados	Muestra 1 individuo 45		754,5	32,7	4,33	

Tabla IV. Límite de detección de la técnica a diferentes concentraciones de cistina. Los datos mostrados en  $Y_i$  indican la absorbancia obtenida a 520 nm para cada una de las concentraciones.  $\hat{Y}_i$  hace referencia al valor calculado por la regresión lineal ( $y=0,1039x + 0,0325$ ). SB: Señal del blanco. LD: Límite de detección.

Concentración (mg/dL)	$Y_i$	$\hat{Y}_i$	$Y_i - \hat{Y}_i$	$(Y_i - \hat{Y}_i)^2$
0,625	0,067	0,097	-0,030	0,0009
1,25	0,138	0,162	-0,024	0,00057
2,5	0,294	0,292	0,002	0,000004
5	0,593	0,552	0,041	0,001681
10	1,109	1,071	0,037	0,001369
20	2,083	2,110	-0,028	0,000784
			$\Sigma$	0,0053
			SB	0,0318
			LD	0,917

Tabla V. Estadísticos descriptivos de cistina urinaria en el grupo control y el afectado por cistinuria.

	Grupo control (n=104)				Grupo afectado por cistinuria (n=5)			
	Edad (años)	Creatinina (mg/dL)	Cistina (mg/dL)	Cistina (mg/g creatinina)	Edad (años)	Creatinina (mg/dL)	Cistina (mg/dL)	Cistina (mg/g creatinina)
Media	9,4	79,2	2,45	34,33	30,9	41,8	24,7	686,4
Mediana	6,6	63,8	2,18	28,77	25,8	38,7	25,7	672,6
DE	10,3	51	1,99	25	22,5	23,9	4,2	302,6
Mínimo	0,04	9,3	0,07	1,35	1,96	16,9	20,2	386,9
Máximo	55,4	275	11,4	110,11	63	66,5	28,9	1134,1

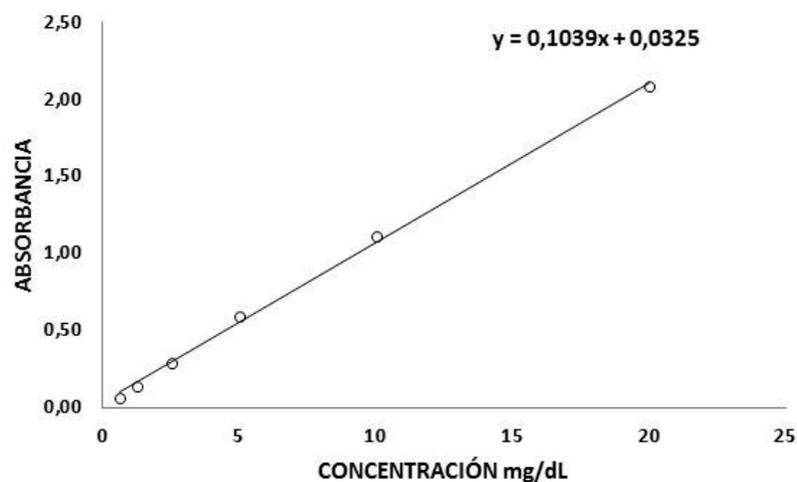


Figura 2. Curva de calibración para cistina. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 520 nm.

tó una dispersión más alta con respecto a los controles. En el grupo control se hallaron cuatro valores atípicos con concentraciones de 95,3; 92,0; 110,1 y 95,5 mg de cistina/g de creatinina (Figura 3). No se encontró una distribución normal o gaussiana para el grupo control ni para el grupo afectado (Figura 4). Para establecer si podría utilizarse la concentración de cistina en orina sin necesidad de ajustar por creatinina urinaria, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables cistina y cistina/g creatinina, la cual resultó ser

de 0,628 lo cual indica que las dos variables no reflejan exactamente la misma información, y que es preferible emplear el valor ajustado por creatinina urinaria.

Para la obtención de la curva ROC se emplearon los valores de excreción de cistina/g de creatinina del grupo control y del grupo afectado por cistinuria. El análisis ROC mostró una sensibilidad del 100%, y una especificidad del 100% para un punto de corte de 248,5 mg de cistina/g de creatinina. El área bajo la curva ROC (estadístico C) fue 1, el máximo valor posible exigible para

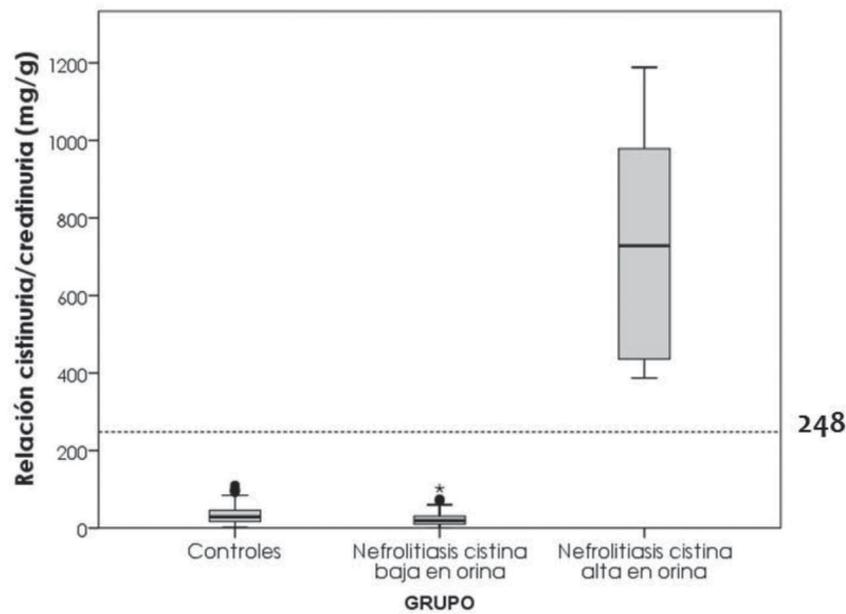


Figura 3. Diagrama de cajas correspondiente a individuos controles, con nefrolitiasis no cistinúricos y cistinúricos. Los pacientes con cálculos renales presentaron una clara diferenciación en la excreción urinaria de cistina. La dispersión de los datos de los urolitiásicos con cistina baja en orina es semejante a la del grupo control, lo cual indicó que esos individuos tuvieron una excreción normal de este aminoácido. El ancho de la caja correspondiente a los cistinúricos muestra que los datos son más dispersos comparados con el grupo control. La línea punteada muestra el punto de corte diagnóstico propuesto: 248 mg de cistina/g de creatinina.

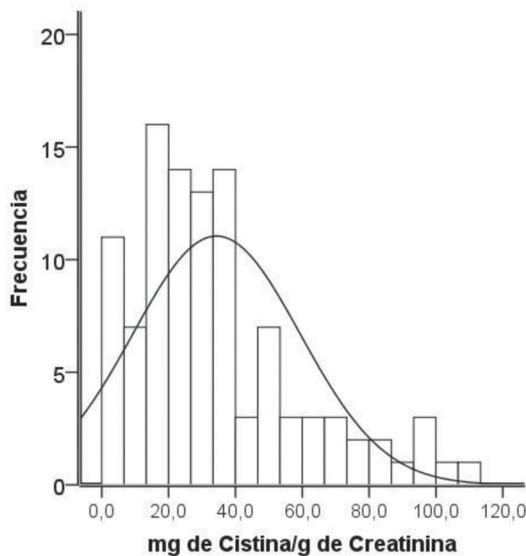


Figura 4. Histograma de frecuencia de la variable mg cistina/g de creatinina urinaria en el grupo control. Se muestra una distribución asimétrica de los valores de excreción de cistina.

una prueba diagnóstica. Para realizar una validación externa de la prueba estandarizada se analizó por HPLC una muestra de orina de un individuo del grupo afectado, el cual mostró un valor de 813  $\mu\text{mol}$  de cistina/L correspondiente a 390,7 mg de cistina/g de creatinina; por el método utilizado en este estudio la concentración en esta muestra fue 383,3 mg cistina/g de creatinina.

## Discusión y Conclusiones

La estandarización de una técnica confiable y de fácil manejo para la cuantificación de cistina en orina es una contribución importante a la detección oportuna de la cistinuria (21) (27) (28). Este estudio estandarizó una prueba colorimétrica cuantitativa de fácil ejecución, rápida y económica con relación a otras técnicas como HPLC, cromatografía de intercambio iónico o electroforesis. Otras ventajas del método son la utilización de un menor volumen urinario y que no requiere necesariamente la recolección de muestras de orinas de 24 horas como sí lo exigen otras pruebas (29).

A pesar de las limitaciones inherentes a una técnica puramente cualitativa, la utilización del *test* de Brand (30) permitió tener indicios de la presencia de aminoacidurias en algunos participantes con urolitiasis y confirmar que las muestras correspondientes a los individuos control eran negativas. La exactitud de la técnica cuantitativa propuesta es aceptable al conseguir un porcentaje promedio de recuperación de 85,6%. En términos de precisión intermedia, el coeficiente de variación fue alrededor del 5% para los estándares de calibración y las muestras. Esto indicó un mínimo error aleatorio del método, exceptuando el valor del estándar de 0,625 mg/dL el cual fue de 10%, que aun así, es aceptable para este tipo de experimentos.

La variación intraensayo fue inferior al 5% para la curva de calibración y al 10% para las muestras, indicando que la medición es repetible. La diferencia de

los resultados entre patrones y muestras pudo obedecer a diferencias en el manejo o almacenamiento de las muestras, pero la repetibilidad puede ser aún mejor en condiciones óptimas de colección y manejo. La prueba cuantitativa propuesta es también lineal en un amplio rango de concentraciones. La linealidad sólo se perdió en muestras con una concentración extremadamente alta de cistina (superiores a 386 mg de cistina/g de creatinina). Para aplicar el método propuesto a muestras que presenten concentraciones superiores a este valor, es recomendable diluir las muestras y corregir la concentración hallada, empleando el factor de dilución. La concentración mínima de cistina que pudo ser detectada con fiabilidad por el método fue de 0,917 mg/dL, un valor muy inferior al promedio de 2,45 mg/dL que se encontró en individuos normales, lo que sugiere que el método tiene una sensibilidad apropiada para detectar orinas con bajas concentraciones del analito. Por otro lado, la comparación entre el resultado conseguido con la técnica propuesta y el obtenido externamente con cromatografía de intercambio catiónico de una muestra urinaria perteneciente a un individuo afectado, mostró un porcentaje de discordancia de 1,8%, lo cual brinda indicios positivos sobre la validez externa de la técnica.

Una vez estandarizada la técnica se propusieron intervalos de referencia, hallando concentraciones entre 1,35 y 110,1 mg de cistina/g de creatinina en el grupo control y 386,9–1134,1 mg de cistina/g de creatinina en individuos afectados. Al interpretar estos valores de referencia es importante tener en cuenta, sin embargo, que en el grupo control se detectaron cuatro datos atípicos, correspondientes a 92,0; 95,3; 95,5 y 110,1 mg de cistina/g de creatinina; teniendo en cuenta que sus muestras no presentaron interferencias con otros metabolitos, que fueron negativas en el *test* de Brand y que no se documentaron errores en su manipulación, podría tratarse de individuos heterocigotos para una mutación causante de cistinuria. De los 80 pacientes con urolitiasis, 5 presentaron concentraciones de cistina urinaria compatibles con cistinuria, una prevalencia de 6% comparable a la reportada en otros estudios (17) (29). Las concentraciones establecidas indicaron que los afectados llegan a excretar como mínimo tres veces más que un individuo sano, lo cual constituyó un hallazgo relevante dado que la diferenciación clara entre estos dos grupos de individuos permite establecer un diagnóstico correcto. Los valores absolutos aquí reportados en unidades de mg cistina/g de creatinina son comparables con los informados por otros autores (7) (30).

El establecimiento de valores de referencia permite adaptar los valores de una prueba a una técnica y población en particular (31), pero en este caso particular es sumamente importante debido a que en Colombia sólo existen reportes aislados, uno de dos pacientes cistinúricos en 1976 (32), y otro de 3 pacientes con cistinuria detectados entre 1987 y 1992 (33). En estos casos el

diagnóstico bioquímico se realizó en laboratorios que no estaban en Colombia. El objetivo de expresar los intervalos de referencia como mg de cistina por gramo de creatinina busca ajustar para el nivel de dilución de la orina que cambia aguda y drásticamente con el estado de hidratación del paciente (15) (34). Se consideró que esto hace la prueba propuesta más exacta que aquellas en que se colecta el volumen urinario en 24 h, ya que en la vida real es frecuente que el paciente cometa errores técnicos en la recolección de este tipo de muestras.

De acuerdo con el análisis ROC el punto de corte seleccionado para diagnóstico (248 mg cistina/g de creatinina) mostró un poder discriminante de 100%, con sensibilidad y especificidad en el mismo valor. Este valor es comparable con lo reportado en los estudios iniciales de pacientes con cistinuria (35) que informaron concentraciones de cistina superiores a los 250 mg/g de creatinina en cistinúricos homocigotos.

En conclusión, el método espectrofotométrico propuesto para cuantificación de cistina en orina y detección de cistinuria es reproducible, exacto y sensible. Los valores de excreción normal de cistina para la población colombiana no son mayores a los 110 mg/g de creatinina, y un buen punto de corte por encima del cual se puede diagnosticar cistinuria es 248 mg de cistina/g de creatinina.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Doctora María del Pilar Delgado Pefafán (Investigadora Asociada del Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical), al Grupo de Investigación BBMP de la Universidad de los Andes, al Dr. Charles Marques Lourenço (Especialista Unidad de Neurogenética, División de Genética Médica, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil) y a los pacientes por su colaboración.

#### CORRESPONDENCIA

M. SC. JESÚS ALFREDO URIBE ARDILA  
Centro de Investigaciones en Bioquímica (CIBI)  
Universidad de Los Andes  
Carrera 1 N° 18ª - 10, Edificio M, Tercer piso  
BOGOTÁ D.C., Colombia  
Tel: +57-1 339 4949 - Ext.:\*2780  
E-mail: jeuribe@uniandes.edu.co

#### Referencias bibliográficas

1. Raghuvver TS, Garg U, Graf WD. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. *Am Fam Physician* 2006; 73: 1981-90.
2. Dent CE, Rose GA. Amino acid metabolism in cistinuria. *Q J Med* 1951; 20: 205-19.
3. Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signaling in animal cells. *Biochem J* 2003; 373: 1-18.

4. Calonge MJ, Gasparini P, Chillarón J, Chillón M, Gallucci M, Rousaud F, *et al.* Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. *Nat Genet* 1994; 6: 420-5.
5. Feliubadaló L, Font M, Purroy J, Rousaud F, Estivill X, Nunes V. International Cystinuria Consortium. Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo, +AT) of rBAT. *Nat Genet* 1999; 23: 52-7.
6. Rousaud F, Palacín M, Nunes V. Cistinuria. *Nefrología* 2003; 23 (Suppl 1): 52-9.
7. Rodríguez LM, Lapeña S. Cistinuria. Revisión teórica. *Bol Pediatr* 1997; 37: 73-7.
8. Fender J, Willis MS, Fedoriv Y. Urine crystals a 1-year-old male. *Labmedicine* 2010; 41: 388-92.
9. Biyani CS, Cartledge JJ. Cystinuria—diagnosis and management. *EAU-EBU Update Series* 2006; 4: 175-83.
10. Joly D, Rieu P, Méjean A, Gagnadoux MF, Daudon M, Jungers P. Treatment of cystinuria. *Pediatr Nephrol* 1999; 13: 945-50.
11. Kihara H, Valente M, Porter MT, Fluharty AL. Hyperdibasicaminoaciduria in a mentally retarded homozygote with a peculiar response to phenothiazines. *Pediatrics* 1973; 51: 223-9.
12. Bayer E, Grom E, Kaltenecker B, Uhmman R. Separation of amino acids by high performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1976; 48: 1106-9.
13. Moore S, Spackman DH, Stein WH. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal Chem* 1958; 30: 1185-90.
14. Holmgren G, Jeppson JO, Samuelson G. High-voltage electrophoresis in urinary amino acid screening. *Scand J Clin Lab Invest* 1970; 26: 313-8.
15. Wu JT, Wilson LW, Christensen S. Conversion of a qualitative screening test to a quantitative measurement of urinary cystine and homocystine. *Ann Clin Lab Sci* 1992; 22: 18-29.
16. Rutchik SD, Resnick MI. Cystine calculi. Diagnosis and management. *Urol Clin North Am* 1997; 24: 163-71.
17. Vicente C. Tubulopatías. *Bol Pediatr* 2010; 50: 62-5.
18. Mandel NS, Mandel GS. Urinary tract stone disease in the United States veteran population. II. Geographical analysis of variations in composition. *J Urol* 1989; 142: 1516-21.
19. Milliner DS, Murphy ME. Urolithiasis in pediatric patients. *Mayo Clin Proc* 1993; 68: 241-8.
20. Polinsky MS, Kaiser BA, Baluarte HJ. Urolithiasis in childhood. *Pediatr Clin North Am* 1987; 34: 683-710.
21. Orts JA, Zúñiga A, Martínez de la Cára, Salmerón J. Actualización de la cistinuria: aspectos clínicos, bioquímicos y genéticos. *An Med Intern* 2003; 20: 317-26.
22. Brand E, Harris MM, Bildon S. Cystinuria: Excretion of a cystine complex which decomposes in the urine with the liberation of free cystine. *J Biol Chem* 1930; 86: 315-59.
23. Finocchiaro R, D'Eufemia P, Celli M, Zaccagnini M, Viozzi L, Troiani P, *et al.* Usefulness of cyanide-nitroprusside test in detecting incomplete recessive heterozygotes for cystinuria: a standardized dilution procedure. *Urol Res* 1998; 26: 401-5.
24. Efron ML, Young D, Moser HW, Maccready RA. A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of amino acid metabolism. A technic using whole blood or urine collected on filter paper. *N Engl J Med* 1964; 270: 1378-83.
25. España M, Benavides J, Uribe A. El rol de la creatinuria en los estudios de tamizaje para errores innatos del metabolismo: un estudio retrospectivo. En: *Memorias del XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas*; 2010 Oct 5-8; Armenia, Colombia. p. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas; 2010. p. 67.
26. Jaffe M. Über den Niederschlagwelchen Pikrinsäure in normalen Harnerzeugt und ubereine neue Reaction des Kreatinins. *Z Physiol Chem* 1886; 10: 391-400.
27. Dello L. Cystinuria. En: *Orphanet Encyclopedia*. Disponible en: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-cystinuria.pdf>. (Fecha de acceso: 1 de octubre de 2012).
28. Shekarriz B, Stoller ML. Cystinuria and other noncalcareous calculi. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002; 31: 951-77.
29. Guerra A, Petrarulo M, Schianchi T, Allegri F, Meschi T, Bruno M, *et al.* A simple quantitative test for screening cystinuria. *Labmedicine* 2002; 33: 214-7.
30. Cabrera-Morales CM. Cistinuria: diagnóstico y aproximación terapéutica. *An Sist Sanit Navar* 2011; 34: 453-61.
31. Bishop M, Fody E, Schoeff L. *Clinical chemistry, principles, procedures, correlations*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
32. Manga A, de Manga L. Nefrolitiasis cistinúrica. *Acta Med Colomb* 1976; 1: 191-4.
33. Barrera LA. Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia durante dos décadas. *Rev Acad Colomb Cienc* 2009; 33: 377-94.
34. Benavides S, Fornaguera J. Un método simple para la recolección, extracción y medición de catecolaminas en orina de adultos mayores. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41: 541-52.
35. Harris H, Mittwoch U, Robson EB, Warren FL. The pattern of amino-acid excretion in cystinuria. *Ann Hum Genet* 1955; 19: 196-208.

**Aceptado para su publicación el 29 de noviembre de 2013**