

Base genética de la cistinuria, heterogeneidad genética.

La cistinuria es una aminoaciduria que se transmite de forma autosómica recesiva. Clínicamente se distinguen 3 formas de cistinuria, tipos I, II y III. Inicialmente identificamos un gen, implicado en el transporte de cistina y aminoácidos básicos, rBAT como responsable de esta enfermedad. Hasta la fecha se han identificado 22 mutaciones en rBAT responsables de cistinuria. Mediante estudios de mutaciones y ligamiento genético en familias con cistinuria hemos podido demostrar que la enfermedad es heterogénea. Sólo la cistinuria de tipo I se debe a mutaciones en rBAT, mientras otros genes serán responsables de los tipos II y III. Actualmente estamos realizando estudios de exclusión genética en familias tipo no I, que nos permitirán asignar las regiones cromosómicas en las que se encuentran el gen o los genes responsables de cistinuria tipo II y/o III, paso previo para poder aislar y caracterizar dichos genes.

Palabras clave: Cistinuria - rBAT - Heterogeneidad - Ligamiento genético - Mutaciones.

V. Nunes.*

La cistinuria es una enfermedad hereditaria que se manifiesta por un transporte defectivo de cistina y aminoácidos básicos (arginina, lisina y ornitina) y se transmite de forma autosómica recesiva (McKusick, 1990). Es una de las anomalías más frecuentes y presenta una incidencia igual en mujeres y hombres, de 1 en 7.000 nacimientos viables (Bergeron y Scriver, 1985). La cistina, dada su baja solubilidad, puede precipitar formando cristales tubulares y cálculos en el tracto urinario (Segal y Thier, 1989; Bergeron y Scriver, 1985). Por todo ello los enfermos de cistinuria son susceptibles a todas las complicaciones derivadas de los procesos litiasicos. Clínicamente se distinguen al menos 3 formas de cistinuria, tipos I, II y III (Rosenberg *et al.*, 1966).

Todos los homocigotos presentan hiperaminoaciduria y pueden formar cálculos. Los heterocigotos de tipo I presentan valores de aminoaciduria normales, mientras que los heterocigotos de tipos II y III muestran cistina-lisinuria. En contraposición a los homocigotos de tipo I y II, los de tipo III muestran un incremento de los valores de cistina en plasma después de una administración oral de cistina. Clásicamente y a falta de la identificación de la(s) base(s) molecular(es) de la enfermedad, se creía que los distintos tipos de cistinuria se debían a homocigosis de un alelo mutante en un único locus génico (McKusick, 1990). Inicialmente se clonó un cDNA denominado rBAT (*related to b⁰+ amino acid transporter*) procedente

*Departamento de Genética Molecular. Institut de Recerca Oncològica. Hospital Duran i Reynals. Barcelona.

de una librería de expresión de corteza renal de conejo, cuyo cRNA inducía en el oocito de *Xenopus laevis* transporte de aminoácidos básicos y neutros, incluida la cistina (Bertran *et al.* 1992b). Las características de este transportador eran similares a las del sistema $b^{0,+}$, descrito previamente de manera funcional en blastocistos de ratón (Van Winkle *et al.* 1988). Posteriormente se aisló el homólogo humano, en tres laboratorios simultáneamente. Los cDNA aislados se expresan en el intestino delgado e inducen transporte de alta afinidad, sodio-independiente de cistina, aminoácidos dibásicos y algunos neutros en oocitos de *Xenopus laevis* (Bertran *et al.*, 1992, 1993; Lee *et al.* 1993; Wells *et al.*, 1992). rBAT se expresa en las membranas en borde en cepillo en el segmento S3 y en el del intestino delgado (Furriols *et al.* 1993; Kanai *et al.* 1992). Estudios de la actividad de transporte promovida por rBAT, su distribución por tejidos y su patrón de expresión hacían pensar que rBAT podría ser un gen responsable de cistinuria.

Para demostrar nuestra hipótesis, debíamos encontrar mutaciones al analizar rBAT en muestras de individuos con cistinuria, al compararlos con individuos sin la enfermedad. Dado que únicamente conocíamos el cDNA de rBAT, no podíamos analizar directamente el DNA de los individuos afectados, por lo tanto teníamos que analizar el RNA. Los tejidos donde se expresa rBAT (riñón e intestino) eran de difícil obtención. Como alternativa a este problema optamos por la transcripción ilegítima a partir de células linfoblastoides (Chelly *et al.* 1989). La transcripción ilegítima postula que todo mRNA se expresa en toda célula aunque en proporciones muy escasas. Así pues, si disponemos de un método que permita amplificar esas pocas moléculas de mRNA de interés, como es la PCR, podremos analizarlo. Establecimos líneas celulares inmortales procedentes de cinco pacientes con cistinuria. Se aisló el RNA y se generó el cDNA correspondiente mediante transcriptasa reversa. Utilizando primeros específicos correspondientes al cDNA de rBAT que solapaban toda la región codificante, se generaron fragmentos de un tamaño apropiado que fueron analizados mediante SSCA (*single strand conformation analysis*) (Orita *et al.*, 1989; Calonge *et al.*, 1994). Todos los fragmentos anómalos fueron secuenciados en paralelo con un control normal. Identificamos seis mutaciones diferentes. R181Q, M467K, M467T, P615T, T652R y L678P en rBAT que cosegregaban con el fenotipo cistinuria (Calonge *et al.*, 1994). De entre las mutaciones identificadas, M467T resultó ser la más frecuente, encontrándose en 6 de los 36 cro-

mosomas independientes analizados. El análisis funcional en oocitos de *Xenopus laevis*, de esta mutación, mostró que M467T disminuye en un 80 % la actividad de transporte de cistina y aminoácidos básicos. Probando definitivamente que rBAT es un gen responsable de cistinuria (Calonge *et al.*, 1994).

El siguiente paso fue comprobar si rBAT era el único gen responsable de cistinuria, o si por el contrario, la cistinuria es una enfermedad genéticamente heterogénea. Para ello realizamos estudios de ligamiento genético (*linkage*) en un grupo de familias de cistinuria, previamente fenotipadas en base a sus valores de aminoaciduria en orina, empleando marcadores microsatélites (D2S119 y D2S177) y marcadores intragénicos de rBAT (polimorfismos y mutaciones específicas). El ligamiento fue positivo sólo para las familias de tipo I/I y negativo para las familias de tipos I/III y III/III (Calonge *et al.*, 1995). De esta forma quedó demostrado que rBAT era un gen responsable de cistinuria tipo I y que otro gen o genes lo serían de los tipos II y III de cistinuria, y que por consiguiente la cistinuria es una enfermedad genéticamente heterogénea. Por otra parte, el hecho de que sólo se encuentren mutaciones en rBAT en cromosomas de tipo I (Calonge *et al.*, 1994; Pras *et al.*, 1995; Gasparini *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1995; Horsford *et al.*, 1995; Bisceglia *et al.*, en preparación) es otra evidencia directa de la heterogeneidad existente en la cistinuria.

Utilizando diferentes estrategias: I) análisis de librerías genómicas construidas a partir de un YAC (*yeast artificial chromosome*) que contenía rBAT; y II) generación de fragmentos genómicos mediante PCR de gran tamaño, utilizando primero derivados de cDNA de rBAT, hemos podido establecer la estructura genómica de rBAT (Puroy *et al.*, en preparación). El gen abarca 45 kb de DNA y está formado por 10 exones, con tamaños comprendidos entre 120 y 438 pares de bases (pb) y 9 intrones con tamaños entre 500 y 13.000 pb. La localización cromosómica de rBAT, sobre el brazo corto del cromosoma 2, había sido previamente establecida (Lee *et al.*, 1991; Calonge *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1994).

Una vez conocida la estructura genómica ha sido posible analizar toda la región codificante, al igual que las regiones de unión intrón/exón en cromosomas con cistinuria de tipo I. Hemos analizado un total de 54 cromosomas tipo I (26 pacientes, entre españoles e italianos) y hemos podido caracterizar el 57 % de los cromosomas. La mutación más frecuente continúa siendo M467T (26 %). Sólo otras dos mutaciones E268K y E483X se han encontrado en 2 cromosomas cada una, lo que supone una fre-

cuencia de 3,7 %. Trece mutaciones restantes han aparecido una única vez en 13 cromosomas no relacionados. Curiosamente, analizando por separado los datos de cromosomas españoles e italianos, se observa que en cromosomas de origen español, la única mutación encontrada es M467T, presente en 6 de un total de 19 cromosomas (31 %), frente a un 73 % de cromosomas a los que se les ha podido encontrar la mutación responsable del fenotipo cistinuria, en el caso de la población italiana (Bisceglia *et al.*, manuscrito en preparación). Estos resultados sugieren que existe un diferente sustrato genético en ambas poblaciones y que muy posiblemente existe una mutación mayoritaria en cromosomas cistinúricos españoles, aún por determinar. En este sentido, continuamos la búsqueda de mutaciones en regiones aún no analizadas, tales como, región promotora y zonas intrónicas más internas del gen rBAT, a la vez que analizamos la posible existencia de deleciones que hayan podido pasar desapercibidas con los métodos empleados hasta ahora. Paralelamente, estamos realizando estudios de exclusión génica, en familias con cistinuria tipo II/II y III/III, utilizando marcadores microsátélites distribuidos a lo largo de los diferentes cromosomas. El resultado obtenido nos permitirá asignar las regiones cromosómicas en las que se encuentran el gen o los genes responsables de cistinuria tipo II y/o III, paso previo para poder aislar y caracterizar dichos genes.

Cystinuria is an autosomal recessive aminoaciduria. Clinically three types of cystinuria have been described, types I, II and III. Initially we identified a gene involved in the transport of cystine and dibasic amino acids, rBAT as responsible for the disease. Since now 22 different cystinuria causing mutations have been identified in the rBAT gene. Mutational and linkage studies on cystinuria families allowed us to demonstrate that cystinuria is a heterogeneous disease. Only type I cystinuria is due to mutations in the rBAT gene whereas other genes will be responsible for the other types. We are currently performing exclusion mapping in non type I cystinuria families. The results obtained will allow us to determine the chromosomal regions where those genes are located as the first step towards the isolation and characterization of the other cystinuria genes.

Keywords: Cystinuria - rBaT - Heterogeneity - Genetic linkage - Mutations.

BENESTAN RETARD

FICHA TÉCNICA de BENESTAN® y BENESTAN® Retard. 1. NOMBRE DEL MEDICAMENTO. BENESTAN® BENESTAN® Retard. 2. COMPOSICIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA. Por comprimido BENESTAN® Principio activo: Alluzosina (DCI) clorhidrato, 2,5 mg. Lactosa y otros excipientes, c.s. 3. FORMA FARMACÉUTICA. BENESTAN®. Comprimidos recubiertos. BENESTAN® Retard. Comprimidos recubiertos de liberación sostenida. 4. DATOS CLÍNICOS. 4.1. Indicaciones terapéuticas. Tratamiento sintomático de la obstrucción urinaria debida a la hipertrofia benigna de la próstata, sobre todo en los casos donde la cirugía, por una u otra razón, debe retrasarse. 4.2. Posología y forma de administración. BENESTAN®. La dosis inicial es de 1 comprimido que se tomará antes de acostarse. La posología media recomendada es de 1 comprimido, 3 veces al día. Estas dosis pueden aumentarse en función de la respuesta clínica, hasta un máximo de 4 comprimidos por día. BENESTAN® Retard. La posología es de un comprimido mañana y noche comenzando el tratamiento por la noche. El comprimido debe ser ingerido sin ser masticado. Casos particulares: En pacientes mayores o en los sometidos a un tratamiento antihipertensor, se iniciará el tratamiento con BENESTAN®, 2,5 mg, a la posología de un comprimido mañana y noche, comenzando el tratamiento por la noche. En función de la tolerancia y de la respuesta clínica, se cambiará a BENESTAN® Retard, 5 mg, a la dosis máxima de un comprimido dos veces al día. (Ver apartado 4.4. Advertencias y precauciones especiales de empleo). Como precaución, en pacientes con insuficiencia renal se recomienda iniciar el tratamiento con BENESTAN®, 2,5 mg, a la posología de dos comprimidos al día y, en función de la tolerancia y de la respuesta clínica, pasar a un comprimido de BENESTAN® Retard, 5 mg, dos veces al día. En pacientes con insuficiencia hepática leve a moderada, se recomienda comenzar la terapia con una dosis de un comprimido de BENESTAN®, 2,5 mg, al día y que ésta se incremente a dos comprimidos de BENESTAN®, 2,5 mg, al día en función de la respuesta clínica. 4.3. Contraindicaciones. Hipersensibilidad al producto. Antecedentes de hipertensión ortostática. Asociación con otros alfa-1-bloqueantes. Insuficiencia hepática severa. 4.4. Advertencias y precauciones especiales de empleo. Advertencias: -En ciertos sujetos especialmente al principio del tratamiento y en los sometidos a un tratamiento antihipertensor, puede aparecer una hipotensión ortostática en las horas siguientes a la toma del medicamento, eventualmente acompañada de los síntomas siguientes: sensaciones vertiginosas, fatiga, sudores. En este caso el enfermo deberá colocarse en decúbito hasta la desaparición completa de los síntomas. Estos fenómenos son transitorios y en general no impiden la continuación del tratamiento adaptando la posología (ver apartado 4.2. Posología y forma de administración). El enfermo deberá ser informado de la posibilidad de aparición de estos incidentes. -BENESTAN®, 2,5 mg, contiene lactosa. Se han descrito casos de intolerancia a este componente en niños y adolescentes. Aunque la cantidad presente en el preparado no es, probablemente, suficiente para desencadenar los síntomas de intolerancia, deberá tenerse en cuenta en caso de que aparecieran diarreas. Precauciones de empleo: -Alluzosina debe ser administrada con precaución a los pacientes tratados con antihipertensores. (Ver apartado 4.5. Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción). -Se debe controlar regularmente la presión arterial, en particular al comienzo del tratamiento. 4.5. Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción. Debe evitarse el tratamiento simultáneo con otros alfa-1-bloqueantes. (Ver apartado 4.3. Contraindicaciones). Se debe tener precaución: -En los pacientes tratados concomitantemente con antagonistas de calcio debido al riesgo de hipotensión. -Con los anestésicos generales: la anestesia general de un paciente tratado con alluzosina, tiene el riesgo de producir una inestabilidad de la presión arterial. En el voluntario sano, no se ha observado ninguna interacción farmacocinética o farmacodinámica entre alluzosina y warfarina, digoxina, hidroclorotiazida, atenolol. 4.6. Embarazo y lactancia. No procede. 4.7. Efectos sobre la capacidad para conducir y utilizar maquinaria. No se ha constatado ningún efecto hasta el momento. Sin embargo, la posibilidad de una hipotensión debe ser considerada. 4.8. Reacciones adversas. Durante la experiencia adquirida con Alluzosina se han descrito algunas veces los efectos siguientes: tendencias lipotímicas y más raramente trastornos digestivos menores, cefalea, erupción cutánea, prurito, taquicardia, palpitaciones, dolor torácico, síncope, hipotensión ortostática, vasodilatación periférica. 4.9. Sobredosificación. En caso de sobredosificación, se aplicará un tratamiento clásico de hipotensión en medio hospitalario (llenado vascular, vasopresores). El antídoto más apropiado parece ser un vasoconstrictor que actúe directamente sobre la fibra muscular vascular. Deben tomarse precauciones en caso de complicaciones cardíacas o cerebro-vasculares. Debido a su fijación proteica elevada, alluzosina es difícilmente dializable. Debe administrarse carbón vegetal activo después de un eventual lavado gástrico. 5. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS. 5.1. Propiedades farmacodinámicas. Alluzosina es un derivado de la quinazolina, activo por vía oral. Es un antagonista selectivo de los receptores alfa-1 adrenergicos post-sinápticos. Los estudios de farmacología realizados in vitro han confirmado la especificidad de alluzosina por los receptores alfa-1 situados a nivel del trigono vesical, de la uretra y de la próstata. Los estudios in vivo en el animal indican que alluzosina disminuye las presiones uretrales y por tanto, la resistencia al flujo miccional. En clínica, en la hipertrofia benigna de la próstata, la aparición e intensidad de las manifestaciones funcionales urinarias están relacionadas no solamente con el volumen prostático sino también con el tono nervioso simpático que, por estimulación de los receptores alfa-1 adrenergicos post-sinápticos, provoca un incremento de la tensión de las fibras musculares lisas de las vías urinarias inferiores en general y del tejido estromal prostático en particular. Un ensayo de farmacología clínica, controlado frente a placebo, ha demostrado que el caudal urinario máximo aumentó de forma significativa desde las primeras tomas de alluzosina. Alluzosina posee además una actividad antihipertensiva moderada. 5.2. Propiedades farmacocinéticas. Alluzosina se absorbe bien con una biodisponibilidad media del 64%. Cuando se utilizan dosis terapéuticas, la cinética es lineal. Se fija a las proteínas plasmáticas en un 90%; 68,2% a la albúmina sérica humana y 52,8% a la alfa-globulina sérica humana. Alluzosina se metaboliza y excreta principalmente por la bilis y las heces. Ninguno de los metabolitos encontrados en el hombre posee actividad farmacodinámica. Este perfil farmacocinético no se modifica por la ingestión simultánea de alimentos. En los sujetos mayores de 75 años, la absorción de alluzosina es más rápida y las concentraciones máximas más elevadas. La biodisponibilidad puede estar aumentada y en ciertos pacientes, puede observarse una reducción del volumen de distribución. La vida media de eliminación permanece inalterada. En los pacientes con insuficiencia renal, sometidos o no a diálisis, el volumen de distribución y el «clearance» de alluzosina aumentan, debido a una elevación de la fracción libre. La insuficiencia renal crónica, incluso severa (tañamiento de creatinina entre 15 y 40 ml/min), no se agrava por alluzosina. La vida media de eliminación se encuentra prolongada en los pacientes que presentan una insuficiencia hepática severa. Los valores de la C_{max} se multiplican por dos, el área bajo la curva se multiplica por tres. La biodisponibilidad se ve aumentada con respecto a la de los voluntarios sanos. En caso de insuficiencia cardíaca crónica, el perfil farmacocinético de alluzosina no se modifica. BENESTAN® Retard, 5 mg, proporciona una concentración plasmática máxima sobre las 3 horas después de la administración, mientras que con BENESTAN®, 2,5 mg, ésta se obtiene alrededor de 1 hora. La semi-vida aparente de eliminación de BENESTAN® Retard, 5 mg, es de 8 horas, mientras que la de BENESTAN®, 2,5 mg, es de 3 a 5 horas. La biodisponibilidad de BENESTAN® Retard, 5 mg está disminuida aproximadamente en un 15% de media en comparación a la de BENESTAN®, 2,5 mg. 5.3. Datos preclínicos sobre seguridad. La seguridad de alluzosina ha sido evaluada en los diferentes aspectos de la toxicología experimental, a saber: la toxicología general, la reproducción, la mutagenésis y la carcinogénesis. Se estudiaron cuatro especies animales, la rata, el ratón, el conejo y el perro. Al término del conjunto de los estudios de seguridad, el producto se caracteriza por una baja toxicidad después de la administración única (bajo forma de principio activo y de producto terminado). En los estudios de toxicidad a dosis repetidas, la tolerancia fue satisfactoria, cualquiera que fueran su duración o las especies concernidas (1 a 12 meses en el perro, 1 a 6 meses en la rata). Los efectos indeseables que reflejan a menudo efectos farmacodinámicos exagerados (sedación, postura, ptosis palpebral, etc.) aparecen a la posología de 250 mg/kg/día (rata) y de 80 mg/kg/día (perro) y corresponden a tasas sanguíneas elevadas (hasta 1.000 veces los valores determinados en el hombre). Incluso a estas dosis importantes, los fenómenos observados, particularmente la fosfolipidosis pulmonar, no son susceptibles de ser extrapolados al hombre. El producto no induce efecto embriotóxico y/o teratogénico. No se modifican las características de la fertilidad, del parto y de la lactancia. El producto posee, en cambio, un débil poder sensibilizante. Finalmente alluzosina está desprovista de potencialidad mutagénica o cancerígena. En estas condiciones, los estudios toxicológicos extensivos resaltan la importancia de la escala posológica empleada en el animal (hasta 1.000 veces la posología humana) y no ponen en evidencia efectos secundarios particulares. 6. DATOS FARMACÉUTICOS. 6.1. Relación de excipientes. BENESTAN®. Núcleo: Lactosa, 61 mg, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, carboximetilamón sódico, estearato de magnesio. Recubrimiento: Metilhidroxipropil celulosa, polietilenglicol 400, dióxido de titanio. BENESTAN® Retard. Núcleo: Celulosa microcristalina polivinilpirrolidona fosfato dicálcico dihidratado, estearato de magnesio, aceite de ricino hidrogenado. Recubrimiento: Metilhidroxipropil celulosa, propilenglicol, dióxido de titanio, óxido de hierro. 6.2. Incompatibilidades. No se conoce ninguna incompatibilidad. 6.3. Período de validez. BENESTAN® Tres años. BENESTAN® Retard 18 meses. 6.4. Precauciones especiales de conservación. Ninguna hasta el momento. 6.5. Naturaleza y contenido del recipiente. BENESTAN® • 60 y 90 comprimidos en blíster (PVC-Alumina). PVP (IVA-4) 3 168 y 4 501 pts. BENESTAN® Retard. • 60 comprimidos en blíster (PVC-Alumina). PVP (IVA-4) 5 080 pts. 6.6. Instrucciones de uso/manipulación. No procede. 6.7. Nombre o razón social y domicilio permanente o sede social del titular de la autorización. LABORATORIOS ALCONGA, S.A. Alcalá, 434-436 28027 MADRID. Licencia SYNTHELABO.

Bibliografía.

1. Bergeron, M., Scriver, C.R. **Pathophysiology of renal hyperaminoacidurias and glucosuria.** *En: The kidney: Physiology and Pathophysiology.* Seldin, D.W., Giebisch, G. editores, Raven Press, New York, 1985.
2. Bertran, J., Werner, A., Moore, M.L., Stange, G., Markovich, D., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Palacín, M., Murer, H. **Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral aminoacids.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5.601-5.605, 1992.
3. Bertran, J., Werner, A., Chillarón, J., Nunes, V., Biber, J., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Murer, H., Palacín, M. **Expression cloning of a human renal cDNA that induces high affinity transport of L-cystine shared with dibasic amino acids in *Xenopus* oocytes.** *J. Biol. Chem.* 268: 14.842-14.849, 1993.
4. Calonge, J., Gasparini, P., Chillarón, J., Chillón, M., Gallucci, M., Rousaud, F., Zelante, L., Testar, X., Dallapiccola, B., Di Silverio, F., Barceló, P., Estivill, X., Zorzano, A., Nunes, V., Palacín, M. **Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in transport of cystine.** *Nature Genetics* 6: 420-426, 1994.
5. Calonge, M.J., Nadal, M., Calvano, S., Testar, X., Zelante, L., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Palacín, M., Nunes, V. **Assignment of the gene responsible for cystinuria (rBAT) and of markers D2S119 and D2S177 to 2p16 by fluorescence in situ hybridization.** *Human Genet.* 95: 633-636, 1995.
6. Calonge, M.J., Volpini, V., Bisceglia, L., Rousaud, F., DeSanctis, L., Brescia, E., Zelante, L., Testar, X., Zorzano, A., Estivill, X., Gasparini, P., Nunes, V., Palacín, M. **Genetic heterogeneity in cystinuria: the rBAT gene is linked to type I but not to type III cystinuria.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9.667-9.671, 1995.
7. Chelly, J., Concorde, J.P., Kaplan, J.C., Khan, A. **Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2.617-2.621, 1989.
8. Furiols, M., Chillarón, J., Mora, C., Castelló, A., Bertran, J., Camps, M., Testar, X., Vilaró, S., Zorzano, A., Palacín, M. **rBAT, related to L-cystine transport is localized to the microvilli of proximal straight tubules and its expression is regulated in kidney by development.** *J. Biol. Chem.* 268: 27.060-27.068, 1993.
9. Gasparini, P., Calonge, M.J., Bisceglia, L., Purroy, J., Diazani, I., Natarangelo, A., Rousaud, F., Gallucci, M., Testar, X., Ponzone, A., Estivill, X., Zorzano, A., Palacín, M., Nunes, V., Zelante, L. **Molecular genetics of cystinuria: identification of 4 new mutations and 7 polymorphisms and evidence for genetic heterogeneity.** *Am. J. Hum. Genet.* 57: 781-788, 1995.
10. Horsford, J., Raelson, J., Saadi, I., Hediger, M., Goodyer, P., Rozen, R. **Analysis of the D2H gene (SLC3A1) in cystinuria patients from Quebec reveals 3 novel mutations and 2 polymorphisms.** *Am. J. Hum. Genet.* 57: A215 (poster nº 1.239), 1995.
11. Kanai, Y., Stelzner, M.G., Lee, W.S., Wells, R.G., Brown, D., Hediger, M.A. **Expression of mRNA (D2) encoding a protein involved in amino acid transport in S3 proximal tubule.** *Am. J. Physiol.* 263: F1.087-F1.093, 1992.
12. Lee, W.S., Wells, R.G., Sabbag, R.V., Mohandas, T.K., Hediger, M.A. **Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic, and neutral amino acid transport.** *J. Clin. Invest.* 91: 1.959-1.963, 1993.
13. McKusick, V.A. **Cystinuria**, *En: Medelian Inheritance in Man.* Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. 9th edition. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London, pp. 1.128-1.129, 1990.
14. Miyamoto, K., Katai, K., Tatsumi, S., Sone, K., Segawa, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Takada, K., Morita, K., Kanayama, H., Kagawa, S., Takeda, E. **Mutations in the basic amino acid transporter gene associated with cystinuria.** *Biochem. J.* 310: 951-955, 1995.
15. Orita, M., Suzuki, Y., Skiya, T., Hayashi, K. **Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.** *Genomics* 5: 874-879, 1989.
16. Pras, E., Raben, N., Golomb, E., Arber, N., Akesentjevich, I., Schapiro, J.M., Harel, D., Katz, G., Liberman, U., Pras, M., Kastner, D.L. **Mutations in the SLC3A1 Transporter gene in Cystinuria.** *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1.297-1.303, 1995.
17. Pras, E., Arber, N., Akesentjevich, I., Katz, G., Schapiro, J.M., Posen, L., Gruberg, L., Harel, D., Liberman, U., Weissenbach, J., Pras, M., Kastner, D.L. **Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p.** *Nature Genetics* 6: 415-419, 1994.
18. Rosenberg, L.E., Downing, S., Durant, J.L., Segal, S. **Cystinuria biochemically distinct.** *J. Clin. Invest.* 45: 365-371, 1966.
19. Segal, S., Thier, S.O. **Cystinuria**, *En: The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, Scriver, C.H., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. McGraw-Hill, New York, pp. 2.479-2.496, 1989.
20. Van Winkle, L.J., Campione, A.L., Gorman, M.J. **Na⁺-independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by a shared system and by processes which distinguish between these substrates.** *J. Biol. Chem.* 263: 3.150-3.163, 1988.
21. Wells, R.G., Hediger, M.A. **Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5.596-5.600, 1992.
22. Yan, N., Moscovitz, R., Gerber, I.D., Mathew, S., Murthy, V.V.S.S., Tate, S., Udenfriend, S. **Characterization of the promoter region of the gene for the rat neutral and basic amino acid transporter and chromosomal localization of the human gene.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7.548-7.552, 1994.