

## Implicaciones clínico-diagnósticas y avances sobre la genética y biología molecular de la cistinuria humana

Ferrán Rousaud<sup>1</sup>, Virginia Nunes<sup>2</sup>, Pedro Barceló<sup>1</sup>, Manuel Palacín<sup>3</sup>

### Introducción y breve reseña sobre la clínica, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad

La cistinuria es la enfermedad hereditaria más frecuente de las que afecta al transporte de aminoácidos (MIM 220100). Es una aminoacidopatología por defecto en el transporte tubular renal e intestinal de cistina y aminoácidos básicos (lisina, arginina y ornitina). Se transmite de forma horizontal como un rasgo autosómico recesivo<sup>1</sup>, con una prevalencia global de 1 en 7.000 nacidos vivos<sup>2</sup>.

Se caracteriza por una hiperexcreción urinaria de cistina y aminoácidos básicos. Desde el punto de vista clínico aproximadamente el 50% de los homocigotos afectados desarrollan cálculos renales de cistina con la consiguiente aparición de infecciones urinarias, cólicos nefríticos, obstrucción total o parcial de la vía urinaria y eventualmente pérdida total de la funcionalidad renal.

El diagnóstico se basa por un lado en los programas de screening neonatales, y por otro en la sospecha de la enfermedad en pacientes con historia litiasica de inicio en la infancia o juventud, con un índice de actividad litiasica importante, y con historia familiar de calculosis renal, fundamentalmente en hermanos. El simple análisis del sedimento urinario puede objetivar la característica presencia de cristales hexagonales de cistina. El test de nitroprusiato en orina, la determinación del patrón urinario de aminoácidos y el estudio cristalográfico de los cálculos conformarán el diagnóstico de la enfermedad.

El tratamiento del paciente cistinúrico puede ser médico o quirúrgico. Los objetivos del tratamiento médico son: en presencia de litiasis, prevenir su crecimiento y/o intentar su disolución; y en ausencia de litiasis, prevenir la for-

mación de la misma. La consecución de los objetivos terapéuticos dependerá de la disminución de la concentración urinaria de cistina (por incremento del volumen urinario y disminución de la excreción renal de cistina) y del aumento de la solubilidad de la misma (alcalinizando la orina o promoviendo enlaces covalentes con radicales sulfurados)<sup>3</sup>. Las diversas opciones terapéuticas se muestran en la tabla 1. El tratamiento médico ha de ser individualizado; habitualmente prescribimos una dieta exenta de sal<sup>4-6</sup>, acompañada con una ingesta de 4 a 5 litros de agua<sup>7-8</sup>, alcalinización urinaria<sup>9,12</sup> y alfa-mercaptopropionilglicina<sup>13,10</sup>. La D-penicilamina a pesar de ser un fármaco efectivo posee una elevada tasa de efectos secundarios que desaconsejan su uso<sup>20,22</sup>. Se han descrito resultados contradictorios con el uso de captopril<sup>25,26</sup>, L-glutamina<sup>20,35</sup>, N-acetil-cisteína<sup>35,36</sup> y vitamina C<sup>37,38</sup>. El tratamiento quirúrgico abarca desde la exéresis del cálculo por cirugía clásica hasta técnicas más modernas como la nefrolitotomía percutánea, la litotricia extracorpórea por ondas de choque o la instilación in situ de sustancias litolíticas como la N-acetil-cisteína a través de sondas de nefrostomía.

TABLA I

### OPCIONES TERAPEUTICAS EN EL TRATAMIENTO MEDICO DE LA CISTINURIA

- 
- Dieta hipoproteica (pobre en metionina).
  - Hidratación oral abundante.
  - Alcalinización urinaria.
  - D-penicilamina.
  - Alfa-mercaptopropionilglicina.
  - Captopril.
  - L-glutamina.
  - N-acetil-cisteína.
  - Vitamina C
  - Dieta asódica
- 

1. Servicio de Nefrología, Fundación Puigvert, Barcelona  
 2. Departamento de Genética Molecular, Hospital Durán y Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona  
 3. Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona

### Tipificación Geno-fenotípica actualizada a partir de la clasificación de Rosemberg (1966)

| Genotipo             | Tipo               | Transporte intestinal in vitro |      |      |      | Aminoaciduria |
|----------------------|--------------------|--------------------------------|------|------|------|---------------|
|                      |                    | Cist.                          | Lis. | Arg. | Orn. |               |
| Normal               |                    | P                              | P    | P    | P    | Normal        |
| Heterocigoto I       | N/I                |                                |      |      |      | Normal        |
| Heterocigoto II      | N/II               |                                |      |      |      | Aumentado +2  |
| Heterocigoto III     | N/III              |                                |      |      |      | Aumentado +1  |
| Homocigoto I         | I/I                | A                              | A    | A    | A    | Aumentado +4  |
| Homocigoto II        | II/II              | P                              | A    | A    | A    | Aumentado +4  |
| Homocigoto III       | III/III            | P                              | P    | P    | P    | Aumentado +4  |
| Heterocigotos dobles | I/I, I/III, II/III |                                |      |      |      | Aumentado +3  |

**FIGURA 1.** Esquema actualizado de los tres tipos de cistinuria inicialmente descritos por Rosemberg en 1966. Cist: cistina. Lis: lisina. Arg: arginina. Orn: ornitina. P: transporte intestinal in vitro presente; A: transporte intestinal in vitro ausente. A excepción de los sujetos no afectados de cistinuria y los heterocigotos tipo I, el resto (heterocigotos tipos II y III, homocigotos tipos I, II, III y dobles heterocigotos) presentarán una excreción de aminoácidos elevada; los signos + seguido de un número se refiere a la intensidad cuantitativa de dicha elevación; es decir los homocigotos de cualquier tipo presentarán el patrón de aminoácidos más alterado, seguido en menor intensidad por los dobles heterocigotos, los heterocigotos tipo II y los heterocigotos tipo I.

En 1993 aún no se conocía el gen causante, ni la ubicación cromosómica del locus de la enfermedad en el genoma.

#### Antecedentes sobre las generalidades y genética de la cistinuria humana

La primera referencia de la enfermedad data de 1810 a raíz de las observaciones de Wollaston el cual describió la existencia y propiedades físicoquímicas de un nuevo tipo de cálculo vesical que denominó "óxido cístico"<sup>39</sup>. Posteriormente, Berzelius le dio el nombre de cistina adoptando erróneamente del griego la raíz "Kystis" (vejiga)<sup>40</sup>. En 1824 Stromeyer describe la cristaluria cistínica<sup>41</sup>. Von Udranszky en 1889<sup>42</sup> y Garrod en 1908<sup>40</sup> encuentran cadaverina y putrescina (productos de la decarboxilación de lisina y arginina) en orina y heces de pacientes cistinúricos, indicando una excesiva excreción de éstos aminoácidos. Yeh y cols, demostraron con técnicas de ensayo microbiológico una hiperexcreción urinaria de cistina, lisina y arginina<sup>43</sup>. Stein, utilizando técnicas de cromatografía confirmó lo anterior añadiendo ornitina a la lista de aminoácidos afectados<sup>44</sup>. Milne en 1961, demostró un defecto en la absorción intestinal de aminoácidos básicos y cistina<sup>45</sup>; Thier y cols, confirmaron éste hallazgo mediante estudios de transporte intestinal in vitro, con tejido biopsico de intestino delgado<sup>46,47</sup>.

En 1817, ocho años después de la primera referencia de Wollaston, Marcet, observa la incidencia familiar de esta enfermedad<sup>48</sup>. Garrod también aprecia este detalle así como la naturaleza crónica de la misma<sup>40</sup>. Pero no es hasta 1955 en que Harris y cols<sup>49,51</sup> analizando los pedi-

grees de los pacientes afectados y basándose en la cuantificación urinaria de aminoácidos concluyen que la cistinuria es una enfermedad hereditaria que se transmite con un rasgo autosómico recesivo, clasificándola en dos tipos fenotípicos, el tipo recesivo y el incompletamente recesivo. Mas tarde, en 1966, Rosemberg y cols<sup>52</sup> realizan la descripción fenotípica mas completa y la que de hecho ha perdurado hasta la actualidad. A diferencia de Harris, Rosemberg define tres tipos fenotípicos distintos (tipos I, II y III), para ello analiza el patrón de excreción de aminoácidos en heterocigotos obligados, la respuesta plasmática a la sobrecarga oral de cistina y la actividad de transporte intestinal in vitro de cistina, lisina y arginina en muestras de tejido biopsico. Fig 1.

Los homocigotos de los tipos I, II y III presentan una excreción urinaria de cistina y aminoácidos básicos patológica y bajo este punto de vista son clínicamente indistinguibles entre sí.

Los homocigotos del tipo I presentan una ausencia de transporte intestinal in vitro de los cuatro aminoácidos, no observando respuesta plasmática tras la sobrecarga oral de cistina, los heterocigotos tienen un patrón de excreción de aminoácidos normal.

En el tipo II los homocigotos muestran un patrón de transporte intestinal in vitro de aminoácidos básicos patológica pero resta conservada el transporte de cistina, en éste tipo tampoco hay respuesta tras la sobrecarga oral, y los heterocigotos presentan una cistin-lisinuria moderada (aunque en algunos casos están afectados los cuatro aminoácidos).

Los homocigotos del tipo III presentan un transporte intestinal in vitro de los cuatro aminoácidos, se objetiva un aumento plasmático tras la sobrecarga oral; y los hete-

rocigotos presentan un patrón urinario levemente patológico y cuantitativamente menor al presentado por el tipo II.

Posteriormente se han descrito casos de pacientes que se diagnostican como cistinúricos por presentar un patrón de excreción de aminoácidos compatible y litiasis renal de cistina pero que fenotípicamente no son homocigotos. se trata de dobles heterocigotos o heterocigotos compuestos (tipos III y I/III)<sup>53,54</sup>; éste tipo de pacientes se comportan desde el punto de vista clínico como verdaderos homocigotos aunque su patrón de excreción de aminoácidos patológico es cuantitativamente menor que el presentado por los homocigotos y mayor que los heterocigotos tipos II y III<sup>53,55</sup> (Rousaud F. datos no publicados).

Sobre la base de lo anterior, Segal y Thier<sup>56</sup> postulan que la clasificación fenotípica es más exacta si se utiliza el patrón urinario de aminoácidos junto con los estudios con tejido intestinal obtenidos por biopsia. Dada la poca practicidad que implica la utilización de material de biopsia, Goodyer y cols<sup>55</sup> proponen que la suma de los valores de los cuatro aminoácidos implicados (expresados por gramo de creatinina) logra una mejor discriminación fenotípica en todos los grupos a excepción de los heterocigotos tipo II y los dobles heterocigotos tipo III cuyos valores se solapan.

## Genética y cistinuria humana. Estado actual

En 1994 nuestro grupo multidisciplinar de investigación de Barcelona y Foggia (Italia) describe y caracteriza por vez primera el gen causante de la cistinuria humana<sup>57</sup>:

La hipótesis de trabajo inicial se fundamentó en lo siguiente: el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática de células de mamífero es usualizada por una amplia diversidad de transportadores<sup>58</sup>. Gracias a la biología molecular ha sido posible iniciar los estudios de éstos transportadores aunque todavía falta por identificar a muchos de ellos.

Recientemente se han identificado cuatro familias de proteínas transportadoras de aminoácidos<sup>59</sup>: una de estas familias es compuesta por dos proteínas, rBAT y 4F2hc, estas proteínas serían componentes de los sistemas de transportadores de aminoácidos tipo b<sup>0</sup>+ (rBAT: relute b<sup>0</sup>+ urino acid transport), inicialmente descrito por Van Winkle<sup>60</sup> y tipo i+ L (4F2hc)<sup>61,62</sup>. En el epitelio del lóbulo renal y de la mucosa intestinal existe un flujo vectorial de diferentes grupos de aminoácidos, disponiendo para ello de una serie de transportadores específicos<sup>63</sup>: entre éstos se encuentra un sistema de alta afinidad para el transporte compartido de cistina, aminoácidos básicos y aminoácidos neutros<sup>64-66</sup>. Este transporte de alta afinidad se ha localizado en riñón en la pars recta del túbulo proximal<sup>67,68</sup>. A partir de estos datos nos planteamos la hipótesis de que este transporte de alta afinidad fuera el responsable de la cistinuria humana.

En 1992 logramos expresar en oocitos de *Xenopus laevis* actividad b<sup>0</sup>+ de transporte de aminoácidos a partir de mRNA de riñón de conejo<sup>69</sup>. Posteriormente se clonó por expresión funcional el cDNA de rBAT de conejo<sup>70</sup>: así como el de rata<sup>71</sup>. Finalmente logramos aislar de una librería de expresión de corteza renal humana el cDNA de rBAT humano<sup>72</sup>, objetivando que rBAT inducía en oocitos de *Xenopus* transporte sodio independiente de cistina, aminoácidos básicos y ciertos aminoácidos zwitteriónicos a través del sistema de transporte b<sup>0</sup>+. Esta proteína (rBAT) es una N-glicoproteína de membrana<sup>73,80</sup> que se localiza en el borde en cecpi 110 de la pars recta del túbulo proximal del riñón<sup>74</sup>, que se expresa en riñón e intestino delgado en forma de dos transcritos (2.3 Kb Y4 Kh) que corresponden a la utilización de dos señales de poliadenilación<sup>75</sup>. Paralelamente se observó que el mRNA de rBAT en intestino inducía también el sistema de transporte b<sup>0</sup>+ en oocitos de *Xenopus*<sup>82</sup>. Mas recientemente hemos demostrado que rBAT actuaría como un intercambiador obligatorio, reabsorbiendo aminoácidos básicos y cistina en contra de un flujo inverso de aminoácidos neutros, es decir a través de un mecanismo de transporte por difusión heterointercambiable con aminoácidos neutros<sup>83</sup>.

Consideramos pues que por el tipo de transporte que induce rBAT, su expresión en riñón e intestino y su específica localización en renal, hacen de rBAT un gen responsable de cistinuria humana.

Para investigar el papel de rBAT como gen causante de cistinuria, iniciamos la búsqueda de mutaciones en rBAT de pacientes cistinúricos.

Encontramos y caracterizamos seis mutaciones que ocasionan el cambio de un aminoácido en la secuencia de una proteína (missense mutaciones Fig. 2. Se comprobó que la mutación más frecuente, la M467T, reducía en oocitos de *Xenopus*, la actividad de transporte asociada con rBAT, demostrando que el gen rBAT era causante de cistinuria<sup>84</sup>.

Posteriormente se han descrito otras mutaciones en el gen rBAT<sup>85-87</sup>. Prus y cols<sup>88</sup> describen cuatro: dos que producen una terminación precoz de la proteína (non-ense mutaciones), una que provoca un cambio de aminoácido (missense mutación) y una deleción. Paralelamente nuestro grupo ha encontrado tres mutaciones más (Gasparini y cols, sometido a publicación): dos por cambio de aminoácido y una que produce una terminación precoz de la proteína.

Utilizando híbridos de células somáticas humanas y de roedores y por hibridación in situ (FISH), localizamos el gen rBAT en el brazo corto del cromosoma 2<sup>84,86,89</sup>. Prus y cols<sup>88</sup>, encuentran por FISH ligamiento homogéneo entre cistinuria y los marcadores D2S 119 y D2S 177. Nosotros hemos localizado por el mismo método el gen rBAT y los marcadores D2S 119 y D2S 177 en la banda 2p16.3: confirmando la localización física en el locus asignado previamente para cistinuria<sup>90</sup>.

### Mutaciones en rBAT por cambio de aminoácido (missense mutation)

| Mutación | Nucleótido | Aminoácido cambiado | Pacientes |
|----------|------------|---------------------|-----------|
| R181Q    | G542 a A   | Arg 181 por Glu     | A         |
| M467K    | T1400 a A  | Met 467 por Lis     | B         |
| M467T    | T1400 a C  | Met 467 por Thr     | C-J       |
| M615T    | C1843 a A  | Pro 615 por Thr     | K         |
| T652R    | C1932 a G  | Thr 652 por Arg     | A         |
| L678P    | T2033 a C  | Leu 678 por Pro     | B         |

**FIGURA 2.** Secuencia de mutaciones en rBAT por cambio de aminoácido. Arg: arginina. Glu: glutamina. Met: metionina. Lis: lisina. Pro: prolina. Leu: leucina. Thr: treonina. G: guanidina. A: adenosina. T: tirosina. C: citosina. La numeración en la columna de nucleótidos se refiere al primer nucleótido codificante en el cDNA. La numeración referida al aminoácido cambiado se refiere al codon. El paciente A es portador de dos mutaciones (R181Q y T652R); el paciente B es un doble heterocigoto para las mutaciones M467K y L678P.

Como habíamos comentado anteriormente, existen tres tipos fenotípicos de cistinuria<sup>52</sup>; se ha considerado que estos fenotipos son debidos a un alelismo en el mismo gen<sup>1,4</sup>. Recientemente se ha sugerido, sobre la base del patrón de excreción de aminoácidos urinarios en heterocigotos compuestos, la participación de dos loci génicos distintos para los fenotipos I y III<sup>56</sup>. Para aclarar esta duda hemos realizado estudios de ligamiento en familias cistinúricas de los tipos I y III con los marcadores D2S119 y D2S177 del brazo corto del cromosoma 2 y marcadores intragénicos de rBAT; objetivando que el genotipo I/II muestra ligamiento homogéneo con el locus rBAT de cistinuria mientras que para el tipo III no se observa ligamiento para dicho locus.

El análisis extenso del gen ha demostrado mutaciones en el tipo I pero no en los tipos II y III (Gasparini y cols. sometido a publicación).

Actualmente se están llevando a cabo estudios para objetivar si el gen rBAT es responsable de la cistinuria tipo II.

Todos estos hallazgos son demostrativos de que la cistinuria, en contra de lo que se pensaba, es una enfermedad genética heterogénea<sup>52</sup>.

La localización de genes) adicionales responsables de la enfermedad permitirán establecer las bases genéticas de la enfermedad.

### Agradecimientos

Esta línea de investigación ha sido posible llevarla a cabo gracias a un esfuerzo multidisciplinar en el que han participado de forma directa los siguientes investigadores:

MJ Calonge, J Purroy, M Chillón, V Volpini, y X Estivill del Departament de Genètica Molecular (IRO), Hospital Duran i Reynals, L Hospitalet del Llobregat, Barcelona.

MJ Calonge, J Chillarón, X Testar y A Zorzano del Departament de Bioquímica i Fisiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona, Barcelona.

L Bisceglia, L Zelante, B Dallapiccola y P Gasparini del Servizio di Genetica Medica, IRCCS-Ospedale "CSS", San Giovanni Rotondo, Foggia, Italia.

M Gallucci y F di Silverio del Dipartimento di Urologia, Università "La Sapienza", Roma, Italia.

L de Sanctis y A Ponzone, Istituto di Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Torino, Italia.

E Beccia, Division di Urologia, IRCCS-Ospedale "CSS", San Giovanni Rotondo, Foggia, Italia.

A Rousaud, Servicio Urología, IUNA, Fundación Puigvert, Barcelona.

Parte de esta investigación ha sido financiada por la Sociedad Española de Diálisis y Trasplante (SEDYT), Dirección General de Investigación Científica y Técnica Research Grant PB90/0435 y PB93/0738, Fundación August Pi i Sunyer, Institut Català de la Salut, Ministerio Italiano di Sanità Research Grant, Telethon 94 Grant E083 de Italia.

### Bibliografía

1. McKusick VA, in Mendelian Inheritance in Man, Catalogs of Autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes, 9th Edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1990; pp 1128-1129.
2. Segal S, Thier SO, in The Metabolic Basis of Inherited Diseases, eds. Scriver CH, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, McGraw-Hill, New York; 1989; pp 2479-2496.
3. Rousaud F, Rousaud A, Barceló P. Manejo médico del paciente cistinúrico. Rev Port Nefrol Hipert 1994; 8: 289-299.
4. Normal RW, Manatte WA. Dietary restriction of sodium as means of reducing urinary cystine. J Urol 1990; 143: 1193-1195.

5. Peeces R, Sanchez L, Gorostidi M, Alvarez J. Effects of variation in sodium intake on cystinuria. *Nephron* 1991; 57: 421-423.
6. Peeces R, Gorostidi M, Sanchez L, Escalada P. Nuevos aspectos fisiopatológicos y terapéuticos en la cistinuria. *Nefrología* 1992; 12: 128-132.
7. Dent CE, Friedman M, Green H y cols. Clinical features and management of cystinuria. *Br Med J* 1965; 1: 403-408.
8. McDonald VB, Selvarajah K. The long-term management of cystinuria. *Austr Paed J* 1976; 12: 102.
9. Dent CE, Seniorfi. Studies on the treatment of cystinuria. *Br J Urol* 1955; 23: 317-332.
10. Lewis HB. Cystinuria: a review of some recent investigations. *Yale J Biol Med* 1932; 4: 437-449.
11. Patch FS. Cystinuria and cystine lithiasis. *Can Med Assoc J* 1934; 31: 250-255.
12. Smuh LI-I. Medical evaluation of urolithiasis: etiologic aspects and diagnostic evaluation. *Urol Clin North Am* 1974; 1: 241-260.
13. Kallistratos G, Malorny G. Experimentelle untersuchungen zur frage der chemischen auflösung von cystinssteinen. *Arzneim Forsch* 1972; 22: 1434.
14. King JS jr. Treatment of cystinuria with alpha-mercaptopropionylglycine: a preliminary report with some notes on culturn chromouography of mercaptans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 129: 927-932.
15. Haunann RE. Cystine stone therapy with: alpha-mercaptopropionylglycine: ten years of experience with forty-two patients. In: *Urolithiasis: Clinical and Basic Research*. Edited by L.H. Smith, VG Robertson and B. Finlayson. 1981; New York: Plenum Press, pp 139-143.
16. Hautmann RE, Terhorst B, Stuhlatz W, Lutzeyer W. Mercaptopropionylglycine: a progress in cystine stone therapy. *J Urol* 1977; 117: 628-630.
17. Harbar JA, Cusworth OC, Lawes LC, Wrong OM. Comparison of 2-Mercaptopropionylglycine and D-penicillamine in the treatment of cystinuria. *J Urol* 1986; 136: 146.
18. Pak CYC, Fuller C, Sakhae K, Zerwekh JE, Adams BV. Management of cystine nephrolithiasis with alpha-mercaptopropionylglycine. *J Urol* 1986; 136: 1003-1008.
19. Rizzoni G, Pavanello L, Dussini N, Chiandetti L, Zaccchello G. Nephrotic syndrome during treatment with alpha-mercaptopropionylglycine. *J Urol* 1979; 122: 381-382.
20. Crawhall JE, Scowen EF, Watts RW. Effect of penicillamine on cystinuria. *Br Med J* 1963; 1: 588-590.
21. Crawhall JC, Scowen EF, Watts RW. Further observations on use of D-penicillamine in cystinuria. *Br Med J* 1964; 1: 1411-1413.
22. King JS jr, Boyce WH. Effect of penicillamine on cystinuria. *Invest Urol* 1965; 2: 595-597.
23. Halperin EC, Thier SO, Rosenberg LE. The use of D-penicillamine in cystinuria. *N Eng J Med* 1965; 273: 578-583.
24. Rosenberg LE, Hayslett JP. Nephrotoxic effects of penicillamine in cystinuria. *JAMA* 1967; 201: 698-699.
25. Migdalof BH, Antonaccio MJ, McKinstry DN, Singhvi SM, Lan SJ, Egli P, Kripalani KJ. Captopril: pharmacology, metabolism and disposition. *Drug Metab Rev* 1984; 15: 841.
26. Sloan JA, Izzo Jr. Captopril reduces urinary cystine excretion in cystinuria. *Arch Intern Med* 1987; 147: 1409.
27. Streem SB, Hall P. Effect of captopril on urinary cystine excretion in homozygous cystinuria. *J Urol* 1989; 142: 1522-1524.
28. Pezarella MA, Buller DC. Successful treatment of cystinuria with captopril. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: 504-507.
29. Miyagi K, Nakada F. Amino acid reabsorption in cystinuria: the effect of monoaminocarboxylic acids and amidogroup amino acids with special reference to glutamine. *J Jpn Soc Intern Med* 1978; 67: 694-702.
30. Miyagi K, Nakada F, Ohshiro S. Effect of guanidine on cystine excretion in a patient with cystinuria. *N Eng J Med* 1979; 301: 196-198.
31. Skovby F, Rosenberg LE, Thier SO. No effect of L-glutamine on cystinuria. *N Eng J Med* 1980; 302: 236-237.
32. Van der Berg C, Iones JD, Wilson DM, Smith LH. Glutamine therapy on cystinuria. *Invest Urol* 1980; 18: 155-157.
33. Joost J, Jarosch E. Guanidine: a new uricocystinuric drug" *Eur Urol* 1981; 7: 363-364.
34. Jaeger P, Porunann L, Suumlers A, Rosenberg LE, Thier SO. Auricystinuric effects of glutamine and 01" dietary sodium restriction. *N Eng J Med* 1986; 315: 1120-1123.
35. Mulvaney VP, Owilert T, Mortera A. Experience with acetylcysteine in cystinuric patients. *J Urol* 1975; 114: 107.
36. Smith AD, Lange PH, Miller RP, Reinke DB. Dissolution of cystine calculi by irrigation with acetylcysteine through percutaneous nephrostomy. *Urology* 1979; 13: 422-423.
37. Lu B, May P. Long-term observations of young cystinuric patients under ascorbic therapy. *Urol Int* 1983; 38: 91.
38. Rousaud F. Otras opciones terapéuticas de la vitamina C. *Med Clin (Barcelona)* 1994; 102: 715.
39. Wollaston W-I. New species of stone. *Phil Tr Roy Soc. Lond* 1810; 100: 223-239.
40. Garrod AE. Inborn errors of metabolism. *Lancet* 1909; 2: 1-7.
41. Noehden GH. Scientific notes. Chemistry. I. Cystic oxide. Communicated in a letter from Dr. Noehden 10 Mr. Children. *Annals of Philosophy* 1824; 7: 146.
42. Von Udranszley L, Baumann E. 1899. Ueber das Vorkommen von Diaminen. Sogannanten Ptomainen, bei cystinuria. *Z Physiol Chem* 13: 562.
43. Yeh HL, Frankl W, Dunn MS, Parker P, Hughes B, Gyorgy P. The urinary excretion of amino acids by a cystinuric subject. *Am J Med Sci* 1974; 214: 507.
44. Stein VH. Excretion of amino acids in cystinuria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 78: 705.
45. Milne MD, Asatoor AM, Edwards KDG, Loughridge LW. The intestinal absorption defect in cystinuria. *Gut* 1961; 2: 323.
46. Thier SO, Fox M, Segal S, Rosenberg LE. Cystinuria: in vitro demonstration of an intestinal transport defect. *Science* 1964; 143: 482-484.

47. Thier SO, Scgul S, Fox M, Blair A, Roscrnberg LE. Cystinuria: defective intestinal transport of dibasic amino acids and cystine. *J Clin Invest* 1965; 44: 482.
48. Maree: A. An essay on the chemical history and medical treatment of calculus disorders. London. 1817.
49. Harris H, Warren FL. Quantitative studies on the urinary cystine in patients with cystine stones and their relatives. *Annat-Eugenics* 18:125, 1953.
50. Harris H, Miwoch U, Robson EB, Warren FL. Pattern of amino acid excretion in cystinuria. *Annals of human genetics* 19: 195, 1955a.
51. Harris H, Mittwoch U, Robson EB, Warren FL. Phenotypes and genotypes in cystinuria. *Annals of human genetics* 20: 57, 1955b.
52. Rosemberg LE, Downing S, Durani IL, Segal S. Cystinuria: biochemical evidence of three genetically distinct diseases. *Journal of clinical investigation* 46: 365, 1966.
53. Morin CL, Thompson MW, Jackson SH, Sass-Kortsak A. Biochemical and genetic studies in cystinuria: Observation on double heterozygotes of genotype 1/1. *J Clin Invest* 1971; 50: 1961-1976.
54. Kelli S. Cystinuria genotypes predicted from excretion patterns. *Am J Med Genet* 1978; 2: 175-190.
55. Goodver P, Clow C, Reade T, Girardin C. Prospective analysis and classification of patients with cystinuria identified in a new born screening program. *J Pediatr* 1993; 122: 568-572.
56. Segal S, Thier SO. Cystinuria, in the *Metabolic Basis of Inherited Diseases* (eds DC Scriver, AL Beaudet, WS Sly). D Valle) 1989. pp 2479-2496. McGraw-Hill. New York.
57. Gallardo A. Descubierta el gen del 5% de los cálculos renales. *El Periódico*, 2-4-1994.
58. Gonzalez T. El gen rBAT será la clave para iniciar la terapia génica de la cistinuria. *Diario Médico*, 5-3- 1994.
59. Corbella J. Científicos españoles hallan por primera vez un gen que causa la aparición de una enfermedad. *La Vanguardia*, 2-4-1994.
60. Serrano S. Un equipo científico de Barcelona identifica un gen relacionado con un mal hereditario. *El País*, 2-4-1994.
61. Margarit X. Un equipo español descubre el gen causante de una enfermedad. *El Mundo*, 1-4-1994.
62. Rihás C. La historia del primer gen español. *La Vanguardia*. Suplemento *Vida y Calidad* de Vida; 167:3, 6-5-1994.
63. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990; 70: 43-77.
64. Amara SG, Kuhar vU. Neurotransmitter transporters: Recent progress. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16: 73-93.
65. Kilberg vS, Stevens BR, Ninkovic DA. Recent advances in mammalian amino acid transport. *Ann Rev Nutr* 1993; 13: 137, 165.
66. Bertran J, Testar X, Zorzano A, Palacín M. A new age role mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Cell Physiol Biochem* 1994; 4: 217-241.
67. Devés R, Chavez P, Boud CAR. Identification of a new transport system (y+ L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J Physiol* 1992; 454: 491-501.
68. Palacín M. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: A tale of two proteins in search of a transport function. *JExpBiol* 1994; 196: 123-137.
69. Silbernagl S. The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 1988; 68: 911- 1007.
70. Segul S, McNamara PD, Pepe vU. Transport interaction of cystine and dibasic amino acids in renal brush border vesicles. *Science* 1977; 197: 169-171.
71. Furlong T.I, Posen S. D, penicillamine and the transport of L-cystine by rat and human renal cortical brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 1990; 258: F321-F327.
72. Wolkl H, Silbernagl S. Mutual inhibition of L-cystine/L-cysteine and other neutral amino acids during tubular reabsorption. *Pflugers Arch* 1982; 395: 190-195.
73. Schafer JA, Watkins ML. Transport of L-cystine in isolated perfused proximal straight tubules. *Pflugers Arch* 1984; 401: 143- 151.
74. Bertran J, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, Zorzano A, Palacín M, Murer H. *Biochem J* 1992; 281: 717- 723.
75. Bertran J, Werner A, Moorc M., Stunge G, Markovich O, 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 amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5601-5605.
76. Tate SS, Yan N, Undenfriend S. Expression cloning of a Na+- independent neutral amino acid transporter from rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1-5.
77. Wells RG, Hediger MA. 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* 1992; 89: 5596- 5600.
78. Bertran J, Werner A, Chillán 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* 1993; 268: 14842-14849.
79. Van Vinkle LJ, Campione AL, Gorllan MJ. Na+ - independent transport of basic and zwitterionic amino acids in mouse blastocysts by shared system and by processes which distinguish between these substrates. *J Biol Chem* 1988; 263: 3150- 3163.
80. Markovich D, Stange G, Bertran J, Palacín M, Biber J, Murer H. Two mRNA transcripts (rBAT-1 and rBAT-2) are involved in system b<sup>0</sup> + -related amino acid transport. *J Biol Chem* 1993; 268: 1362- 1367.
81. 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* 1993; 268: 27060-27068.
82. Magagnoli S, Bertran J, Werner A, Markovich D, Biber J, Palacín M, Murer H. Poly(A)<sup>+</sup> RNA from rabbit intestinal mucosa induces b<sup>0</sup> + and y+ amino acid transport activities in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 1992; 267: 15384- 15390.

83. Busch AE, Herzcr T, Waldgger S, Schmidt F, Palacín M, Biber J, Markovich D, Murer H, Lallg F. Opposite directed current induces by the transpon 01" dibasic and neutral amino acids in xenopus oocytes expressing the protein rBAT. *J Biol Chem* 1994; 269: 25581-25586.
84. Calonge MJ, Gusparini P, Chillaron 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 the transport of cystine. *Nature Genet* 1994; 6: 420-425.
85. Pras E, Golornb E, Raben N, Arber N, Akxentijevich I, Shupiro IM, Harel D, Katz G, Liberman U, Pras M, Kastner DL. Mutations in the SLC3A1 gene and the molecular basis of cystinuria. *Am J Hum Genet* 1994; 55: A236, p 1377.
86. Zhang XX, Rofen R, Hediger MA, Goodyer P, Eydougs P. Assignment of the gene for cystinuria (SLC3A1) to human chromosome 2p21 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 24: 413-414.
87. Lee VS, W-U, RG, Sabbag RV, Mohandas TI, Hediger MA. Cloning and chromosomal localization of a human kidney cDNA involved in cystine, dibasic and neutral amino acid transport. *J Clin Invest* 1993; 91: 1959-1963.
88. Yan N, Moxcovitz K, Gerber ID, Mathew S, Murthy VVVS, Tate SS, Undenricnd S. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7548-7552.
89. Culonge MJ, Nadal M, Calvuno S, Testar X, Zelante L, Zorzano A, Estivill X, Gasparini P, Palacín M, Nunes V. *Hum Genet* 1995 (en prensa).
90. Pras E, Arber N, Akxentijevich I, Katz G, Saphiro JVI, Prosen L, Groberg L, Harel D, Liberman U, Weissbach J, Prus M, Kastner DL. Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nature Genet* 1994; 6: 415-419.
91. Rosemberg LE, Durant JL, Albrecht I. Genetic heterogeneity in cystinuria: evidence for allelism. *Trans Ass Amer Physicians* 1966; 79: 284-296.
92. Culonge MJ, Volpini V, Bisceglia L, Rousaud F, de Sanctis L, Beccia 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* 1995 (en prensa).