

Estudio de los efectos in vitro de un fármaco diurético, Xipamida, sobre los sistemas de transporte de sodio y de potasio del eritrocito humano

J. DIEZ, R. VIRTO, L. YAP, P. ERRASTI, A. PURROY, J. PRIETO

Servicio de Nefrología. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Pamplona.

RESUMEN

La Xipamida, 4-cloro-5-sulfamoil-2',6'-saliciloxilida es un fármaco diurético cuyo mecanismo de actuación es actualmente desconocido. En este trabajo hemos investigado in vitro los posibles efectos de la Xipamida sobre los sistemas de transporte de sodio (Na^+) y de potasio (K^+) de eritrocitos de sujetos normotensos control. La Xipamida inhibe el flujo de Na^+ catalizado por el sistema de cotransporte- Na^+ , K^+ eritrocitario. Dicha inhibición es aproximadamente un 50 % de la inhibición inducida por la bumetanida. En condiciones en las que los eritrocitos tienen bloqueados todos sus sistemas saturables transportadores de Na^+ y de K^+ , la adición de Xipamida induce un incremento de los flujos de Na^+ y de K^+ a través de la membrana eritrocitaria. Estos resultados sugieren que la acción diurética de la Xipamida podría ser la consecuencia del efecto directo de la droga sobre el sistema que cotransporta Na^+ , K^+ y cloro (Cl^-) en el lado luminal de las células de la rama ascendente del asa de Henle. Además, la Xipamida podría ser capaz de influenciar los movimientos catiónicos dependientes de la permeabilidad de la bicapa lipídica membranaria.

SUMMARY

EFFECTS «IN VITRO» OF XIPAMIDE ON THE SODIUM AND POTASSIUM TRANSPORT SYSTEMS IN HUMAN RED BLOOD CELLS

Xipamid, 4-chloro-5-sulphamoyl-2',6'-salicyloxylyde, is a diuretic with a structure resembling that of chlorthalidone. Experimental and clinical studies have shown that Xipamid has an intense hydrosaluretic action which is equipotent with frusemide. Work in human volunteers showed a consistent decrease in free water clearance compatible with an action of the drug on the ascending limb of Henle's loop. In order to gain insight into the mechanism of action of Xipamid, we explored whether this diuretic exhibits some direct action on Na^+ and K^+ transport systems of human red cells. At 10^{-3} M concentration, Xipamid is able to inhibit the Na^+ , K^+ -cotransport of human red cells. Xipamid inhibits erythrocyte Na^+ , K^+ -cotransport to a lesser extent than does bumetanide. Under conditions in which the erythrocytes have all their saturable Na^+ and K^+ transport systems blocked, the addition of Xipamid increases Na^+ and K^+ fluxes. The stimulated Na^+ and K^+ fluxes are resistant to ouabain and bumetanide, thus suggesting that they are not mediated by the Na^+ , K^+ -pump or the Na^+ , K^+ -cotransport system. These results suggest that Xipamid may decrease renal Na reabsorption by direct inhibition of the Na^+ , K^+ , Cl^- -cotransport carrier which is located in the luminal side of Henle's loop cells. In addition, Xipamid may affect transmembrane cation transport by influencing fluxes related to the steady-state permeability of the lipid bilayer.

Recibido: 16-I-1985.
En forma definitiva: 6-III-1985.
Aceptado: 15-III-1985.
Correspondencia:
Dr. J. Diez.
Servicio de Nefrología.
Clínica Universitaria.
Pamplona.

INTRODUCCION

Distintas observaciones demuestran que los diuréticos inhiben mecanismos transportadores de Na^+ y de K^+ a través de la membrana plasmática de células distintas de las del túbulo renal. La ouabaina inhibe la bomba de Na^+ , K^+ de la mayor parte de las células animales¹. La furosemida y la bumetanida inhiben el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- de eritrocitos humanos², de rata³ y de ave⁴, de células de músculo liso vascular⁵, etc. La amilorida inhibe la reabsorción apical de Na^+ en diferentes tejidos epiteliales⁶ y en el músculo estriado⁷. La canrenona, metabolito activo de la espirolactona, inhibe la bomba de Na^+ , K^+ de eritrocitos humanos⁸.

Estas observaciones han permitido postular que la acción hidrosalurética de los diuréticos podría ser la consecuencia de la inhibición directa de algún mecanismo transportador de Na^+ emplazado en los distintos segmentos de la nefrona. Diversas experiencias directamente relacionadas con el riñón sustentan dicha hipótesis. La inyección de ouabaina en la arteria renal inhibe la reabsorción basolateral de Na^+ que es catalizada por la bomba de Na^+ , K^+ , induciendo una intensa natriuresis⁹. La furosemida y la bumetanida provocan natriuresis a través de la inhibición de otro mecanismo transportador de Na^+ : el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- que está localizado en el lado luminal de las células del asa de Henle^{4,10}. La amilorida inhibe un transportador de Na^+ localizado apicalmente en las células del túbulo distal¹¹ y a altas dosis inhibe un mecanismo emplazado en el túbulo proximal que reabsorbe Na^+ a cambio de secretar H^+ ⁶. La espirolactona antagoniza la síntesis de proteínas transportadoras de Na^+ que la aldosterona induce en las células del túbulo colector^{11,12}. La acetazolamida impide la acidificación tubular proximal, lo que comporta la inhibición de la reabsorción de CO_3HNa ¹³. Se desconoce cuál puede ser el mecanismo responsable de la acción diurética de las tiazidas.

La Xipamida (fig. 1) es un diurético químicamente em-

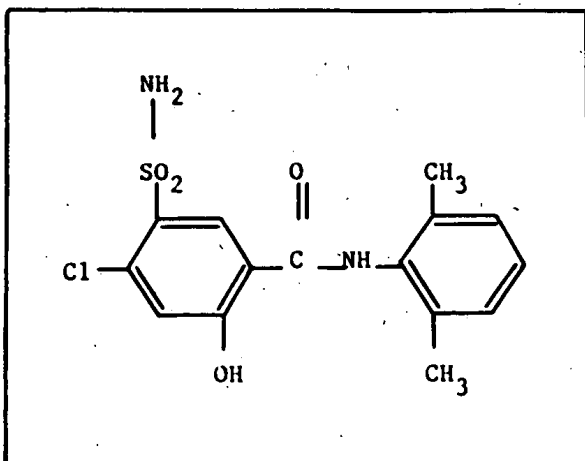


Fig. 1.—Estructura química de la Xipamida (4-cloro-5-sulfamoyl-2',6'-salicyloxilida).

parentado con la clortalidona que parece actuar distalmente respecto al túbulo proximal¹⁴. Presenta la potencia diurética de la furosemida¹⁵ con una acción más gradual y prolongada y una considerable actividad anti-hipertensiva^{16,17}. En el momento actual se desconoce su mecanismo exacto de acción a nivel tubular renal. Dado que los eritrocitos son células fácilmente accesibles, cuya membrana contiene sistemas de transporte iónico que pueden servir de modelo para los mecanismos epiteliales de transporte iónico¹⁸, en el presente trabajo hemos investigado el efecto de la Xipamida sobre los mecanismos de transporte de Na^+ y de K^+ del eritrocito humano.

MATERIAL Y METODOS

Los movimientos de Na^+ y de K^+ a través de la membrana del eritrocito humano están mediados por diferentes sistemas de transporte^{19,20} (fig. 2). La actividad de la bomba de Na^+ , K^+ es considerada como el componente sensible a la ouabaina de los flujos de Na^+ y de K^+ . Los flujos de Na^+ y de K^+ resistentes a la ouabaina que son inhibidos por los diuréticos del asa (furosemida, bumetanida, etc.) corresponden a los flujos catalizados por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ . El flujo de Na^+ resistente a la ouabaina y a la bumetanida que es estimulado por el Litio (Li^+) corresponde al catalizado por el contratransporte Na^+ (Li^+): Na^+ (Li^+). A partir de los flujos de Na^+ y de K^+ resistentes a la ouabaina y a la bumetanida que se observan en un medio sin Li^+ y sin CO_3H^- se puede evaluar aproximadamente el grado de permeabilidad de la membrana para el Na^+ y para el K^+ .

Todos los flujos antecitados se han estudiado en eritrocitos frescos, incubados en un medio que no contenía ni Na^+ ni K^+ , por lo que los flujos medidos corresponden a flujos de salida de la célula. Todas las medidas se efectuaron por duplicado.

Preparación de los eritrocitos

Se emplearon sujetos normotensos control como donantes. Se recogieron 20 ml. de sangre venosa en tubos heparinizados que se centrifugaron a 1.750 xg durante 10 minutos, tras lo que el plasma y la capa superior de células (leucocitos y plaquetas) se aspiraron desechándose. El sedimento de eritrocitos se procesó inmediatamente.

Medida simultánea de la bomba de Na^+ , K^+ , el cotransporte Na^+ , K^+ , el contratransporte Na^+ : Li^+ y los flujos de Na^+ y K^+ resistentes a la ouabaina y a la bumetanida

Los eritrocitos se lavaron cinco veces con Cl_2Mg 110 mM frío y se resuspendieron —hasta un hematocrito de 20-25 %— en un medio de Mg^{2+} -sacarosa compuesto (en mM): Cl_2Mg 75, sacarosa 85, MOPS-Tris 10 (pH 7,4 a 37° C) y glucosa 10.

Suspensiones de eritrocitos se añadieron en frío —hasta un hematocrito final de 4-5 %— a soluciones diferentes conteniendo medio de Mg^{2+} -sacarosa como constituyente básico más los siguientes aditivos (en mM): 1) ClK 2; 2) ouabaina 0,1; 3) ouabaina 0,1 más bumetanida 0,02, y 4) ouabaina 0,1 más bumetanida 0,02 más ClLi 10. La osmolalidad de estas soluciones se mantuvo en 295 ± 10 mosm/Kg. agua. Al tiempo $t = 0$ los tubos se transfirieron a un baño de agua a 37° C para incubación ulterior. Las concentraciones externas de Na^+ y K^+ se midieron en los sobrenadantes a los tiempos (en minutos): 0 (medio 3), 30 (medios 1 y 2) y 120 (medios 3 y 4), previa transferencia de los tubos al frío y posterior centrifugación a 1.750 xg durante 4 minutos y a 4° C.

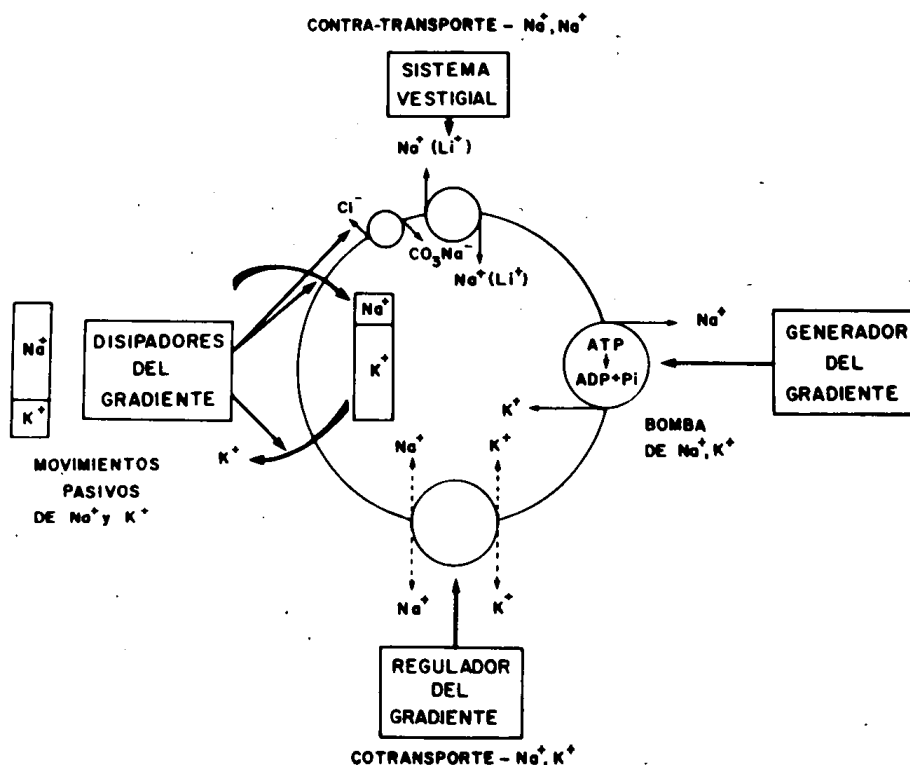


Fig. 2.—Esquema representativo de los principales sistemas de transporte de Na⁺ y de K⁺ del eritrocito humano.

Los flujos de Na⁺ y K⁺ se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo de salida del catión} = \frac{(\text{Dcat}) \times (1 - \text{Hematocrito final})}{(\text{Hematocrito final}) t}$$

Donde Dcat (micromoles/litro sobrenadante) es la diferencia entre las concentraciones externas del catión (Na⁺ o K⁺) medidas tras incubación a 37°C y las concentraciones medidas en el tiempo 0 y t representa el tiempo de incubación (expresado en horas). La actividad de la bomba de Na⁺, K⁺ se calculó sustrayendo el flujo de Na⁺ en presencia (medio 2) del flujo en ausencia de ouabaina (medio 1). Los flujos del cotransporte Na⁺, K⁺ se obtuvieron sustrayendo el flujo de Na⁺ en presencia de ouabaina más bumetanida (medio 3) del obtenido en presencia de ouabaina sola (medio 2). Para calcular el contratransporte Na⁺: Li⁺, el flujo de Na⁺ en medio 3 se sustrajo del flujo en medio 4. Los flujos de Na⁺ y K⁺ resistentes a la ouabaina y a la bumetanida fueron considerados como los medidos en el medio 3. Estos mismos flujos analizados como una función del contenido intracelular de Na⁺ y de K⁺ sirvieron para calcular la permeabilidad de la membrana a ambos cationes.

Las concentraciones extracelulares de Na⁺ y de K⁺ se midieron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer.

El efecto de la Xipamida

La Xipamida fue suministrada por los Laboratorios Lacer, S. A. Para estudiar sus efectos sobre el transporte de Na⁺ y K⁺ la droga se añadió a partir de soluciones de la misma en una cantidad mínima de etanol.

Estudios estadísticos

Todos los resultados se expresan como Media ± EEM de al menos tres experimentos. Para el análisis de la significación estadística se ha empleado el test de la «t» de Student para datos pareados. Se ha considerado estadísticamente significativa una p < 0,05.

RESULTADOS

Efecto de la Xipamida sobre la bomba de Na⁺, K⁺

A concentración 10⁻³M, la Xipamida estimula discreta, pero no significativamente, el flujo de Na⁺ —sensible a la ouabaina— catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺ (tabla I).

Inhibición del cotransporte Na⁺, K⁺ por la Xipamida

Como se recoge en la tabla I, la Xipamida 10⁻³M inhibe significativamente (p < 0,005) el flujo de Na⁺ —sensible a la bumetanida— catalizado por el cotransporte Na⁺, K⁺. En la figura 3 se puede observar que esa inhibición supone el 45 % del flujo control.

Una curva dosis-respuesta (fig. 4) muestra que la inhibición es máxima para concentraciones de Xipamida comprendidas entre 1 y 1,25 milimoles/litro.

Efecto de la Xipamida sobre el contratransporte Na⁺: Li⁺

La Xipamida tiende a inhibir el flujo de Na⁺ estimulado por el Li⁺ (tabla I). Aunque se trata de una inhibición porcentualmente importante, 25 %, no alcanza significación estadística, quizá por el escaso número de observaciones efectuadas, tres.

TABLA I

EFFECTO DE LA XIPAMIDA SOBRE EL TRANSPORTE DE Na⁺ DEL ERITROCITO HUMANO

Condición	Flujo sensible a ouabaina	Flujo sensible a bumetanida	Flujo estimulado por Li ⁺	Flujo resistente a ouabaina y bumetanida	Permeabilidad pasiva (1)
Control	1.755 ± 227	130 ± 29	79 ± 9	135 ± 19	0,018 ± 0,001
Xipamida 10 ⁻³ M	1.793 ± 261	71 ± 17*	59 ± 2	173 ± 25*	0,024 ± 0,002**

Los resultados se expresan en μmoles/litro células x hora.
 (1) Resultados expresados x hora⁻¹. Contenido intraeritrocitario de Na⁺: 7,0 ± 0,5 mmoles/litro células.
 * p < 0,05.
 ** p < 0,02.

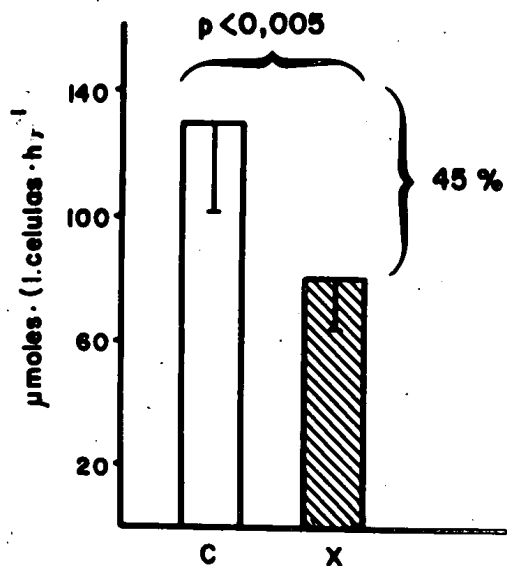


Fig. 3.—Histogramas demostrativos del efecto de la Xipamida (X) sobre el flujo de Na⁺ sensible a la bumetanida de eritrocitos control (C).

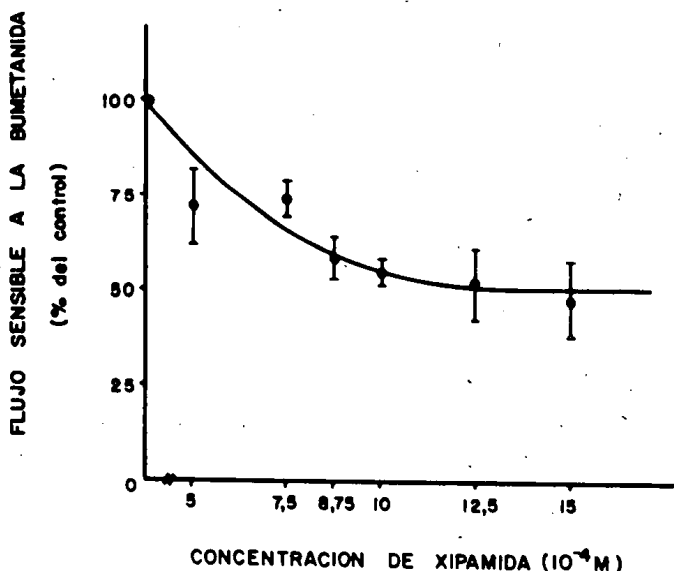


Fig. 4.—Curva dosis-respuesta del efecto de la Xipamida sobre el flujo de Na⁺ sensible a la bumetanida del eritrocito humano.

Estimulación del flujo de Na⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida por la Xipamida

En un medio sin Li⁺ y sin CO₃H⁻ el flujo de Na⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida aumenta significa-

tivamente (p < 0,005) en presencia de Xipamida en concentración milimolar (tabla I). Calculada la permeabilidad pasiva de la membrana eritrocitaria para el Na⁺, se aprecia en la tabla I que la Xipamida la incrementa significativamente (p < 0,02).

Estimulación del flujo de K⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida por la Xipamida

En presencia de Xipamida 10⁻³M se observa un incremento intenso y significativo (p < 0,02) del flujo de K⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida en un medio sin Li⁺ y sin CO₃H⁻ (tabla II, fig. 5). El cálculo de la permeabilidad pasiva para el K⁺ permite observar un aumento significativo (p < 0,02) de la misma en eritrocitos incubados con Xipamida.

TABLA II

EFFECTO DE LA XIPAMIDA SOBRE EL TRANSPORTE DE K⁺ DEL ERITROCITO HUMANO

Condición	Flujo resistente a ouabaina y bumetanida	Permeabilidad pasiva (1)
Control	1.011 ± 57	0,012 ± 0,001
Xipamida 10 ⁻³ M	1.239 ± 68*	0,015 ± 0,001*

Los resultados se expresan en μmoles/litro células x hora.
 (1) Resultados expresados en mmoles/litro células x hora. Contenido intraeritrocitario de K⁺: 86,50 ± 1,45 μmoles/litro células.
 ** p < 0,02.

DISCUSION

El principal resultado de este trabajo es que un diurético, que actúa distalmente respecto al túbulo proximal¹⁴, es capaz de inhibir el funcionamiento de un sistema de transporte de la membrana eritrocitaria que transporta acopladamente Na⁺ y K⁺: el sistema de cotransporte Na⁺, K⁺. Dicho sistema cataliza un flujo simultáneo de Na⁺ y K⁺ y tal vez de Cl⁻². En condiciones fisiológicas el sistema puede transportar cationes tanto hacia el exterior de la célula, cuando aumenta el Na⁺ intracelular, como hacia el interior celular, cuando aumenta el K⁺ extracelular²¹. Basalmente el sistema de cotransporte

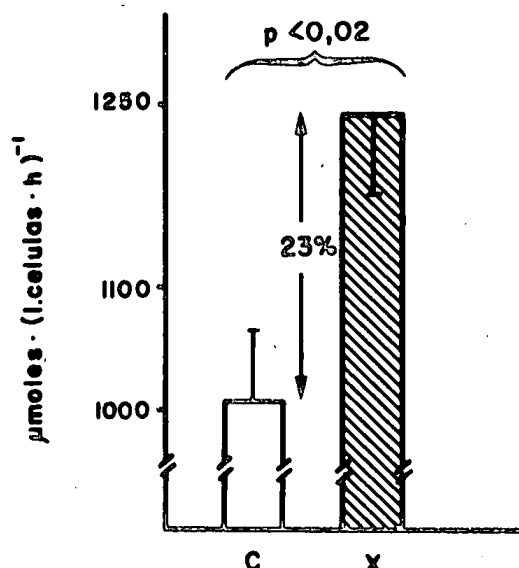


Fig. 5.—Histogramas demostrativos del efecto de la Xipamida (X) sobre el flujo de K⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida de eritrocitos control (C).

está casi en equilibrio, tal que los flujos de cotransporte de entrada y de salida son de similar orden de magnitud y no se observa, por lo tanto, un flujo catiónico neto¹⁶. Cualquier cambio en la concentración interna de Na⁺ o externa de K⁺ es corregida por un flujo neto de cotransporte en la dirección opuesta al de la perturbación iónica; por eso se ha sugerido que en determinadas células el sistema de cotransporte Na⁺, K⁺ funcionaría como un regulador del gradiente iónico transmembranario¹⁶.

Actualmente se admite que en el lado luminal de las células de la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle existiría un sistema de transporte acoplado de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ similar al anteriormente descrito en el eritrocito y responsable de la reabsorción de ClNa en ese segmento de la nefrona¹⁰. Los llamados «diuréticos del asa», furosemida y bumetanida, inhiben el funcionamiento del sistema de cotransporte Na⁺, K⁺, Cl⁻ tanto en la rama ascendente del asa de Henle^{4,10} como en el eritrocito humano² y de otras especies animales^{3,4}. La Xipamida, que inhibe el cotransporte Na⁺, K⁺ en eritrocitos humanos, podría ejercer sus efectos natriurético-diuréticos inhibiendo la reabsorción acoplada de Na⁺, K⁺, Cl⁻ en la rama ascendente del asa de Henle. Dos tipos de observaciones sustentarían tal hipótesis: 1) Estudios realizados en sujetos sanos muestran que la Xipamida disminuye constantemente el aclaramiento de agua libre, lo que es compatible con una acción del diurético localizada en la rama ascendente del asa de Henle²²; y 2) Desde el punto de vista natriurético-diurético la Xipamida es equipotente respecto a la furosemida, aunque con un inicio menos brusco de su acción que resultará más prolongada¹⁵.

En el eritrocito humano se ha descrito un sistema de intercambio Na⁺: Na⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida y sensible a la floretina que puede detectarse usando Li⁺ como trazador²³. La actividad de este transportador puede evaluarse como la del flujo de Na⁺ esti-

mulado por el Li⁺ externo, por lo que también se le denomina contratransporte Na⁺: Li⁺. No es probable que la función fisiológica del contratransporte en el eritrocito sea la de intercambiar Na⁺: Na⁺ o Na⁺: Li⁺, aunque en otras células su funcionamiento puede tener otro significado. En distintas especies celulares se han obtenido evidencias sugerentes de la existencia de un sistema de intercambio de Na⁺ por H⁺ que es sensible a la amilorida²⁴. Concretamente, en preparaciones renales se ha demostrado que la captación de Na⁺ por la célula tubular a través de este sistema de transporte es dependiente del contenido intracelular de ácidos y es inhibida competitivamente por el Li⁺, pero no por K⁺, rubidio, cesio o colina²⁵. Interesantemente, la salida de Na⁺ es estimulada por el Na⁺ externo²⁶. Estas observaciones sugieren que a nivel renal, el sistema de transporte responsable del intercambio Na⁺: H⁺ también puede mediar un intercambio Na⁺: Na⁺ en el que el Li⁺ puede sustituir al Na⁺. Todo ello sirve de base para considerar que el sistema de contratransporte Na⁺: Li⁺ del eritrocito podría ser idéntico al sistema de intercambio Na⁺: H⁺ existente en distintas células del organismo, por ejemplo, las células del túbulo renal²⁵.

La Xipamida tiende a inhibir el contratransporte Na⁺: Li⁺ de eritrocitos humanos. Si la Xipamida ejerciese el mismo efecto sobre el sistema de intercambio Na⁺: H⁺ del túbulo renal, su efecto neto sobre la función renal consistiría en una menor reabsorción de Na⁺ y de bicarbonato. Sin embargo, en humanos tratados con Xipamida se observa un incremento significativo de los niveles plasmáticos de bicarbonato¹⁷. Probablemente ello se deba a que la Xipamida produce hipokaliemia y contracción del volumen del espacio extracelular¹⁷. Dos efectos que pueden inducir y mantener una alcalosis metabólica a través de la modificación del proceso renal de acidificación de la orina²⁷.

Finalmente, la Xipamida estimula los flujos de Na⁺ y de K⁺ no catalizados por la bomba de Na⁺, K⁺; el cotransporte Na⁺, K⁺; el contratransporte Na⁺: Li⁺ o el transportador de aniones. Parte de estos flujos, que son resistentes a la ouabaina y a la bumetanida, corresponden a los flujos «pasivos» de Na⁺ y de K⁺ a través de la membrana eritrocitaria¹⁶. La Xipamida aumenta la permeabilidad de la membrana eritrocitaria para el Na⁺ y para el K⁺. La parte restante de los flujos de Na⁺ y de K⁺ resistentes a la ouabaina y a la bumetanida —también estimulada por la Xipamida— podría corresponder a los flujos catalizados por sistemas de transporte no detectables en nuestras condiciones experimentales. Así, en los eritrocitos humanos existe un canal de K⁺ dependiente de calcio (efecto Gardos), que en condiciones fisiológicas es un canal silente y que experimentalmente se evidencia cuando en el medio existe calcio en concentraciones de rango milimolar²⁸. Recientemente se ha descrito un nuevo sistema de transporte de K⁺ en eritrocitos humanos que requiere Cl⁻, que puede ser estimulado por la N-etilmaleimida y que experimentalmente se puede

detectar utilizando un medio hipotónico²⁹. En el medio de incubación empleado en los experimentos presentados en este trabajo, la contaminación por calcio no superaba el rango micromolar. Por otra parte, la osmolalidad de dicho medio se mantuvo siempre en los límites de la isotonia fisiológica (véase apartado de métodos para más detalles).

Aunque son necesarias investigaciones ulteriores para precisar el marcado efecto de la Xipamida sobre el flujo de K⁺ resistente a la ouabaina y a la bumetanida, es interesante señalar que un efecto similar ha sido recientemente publicado para el ácido tienílico³⁰ y para dos familias de diuréticos furopiridinas y grupo del ácido acético (aryloxy)-¹⁷. Estos dos últimos grupos de diuréticos poseen dos propiedades relevantes: 1) Inducen una natriuresis *in vivo* que se correlaciona con la capacidad para estimular *in vitro* los flujos de K⁺¹⁷; y 2) *in vivo* y en preparaciones de células musculares lisas aórticas estimulan la producción de prostaciclina³¹. El efecto sobre la producción *in vitro* de prostaciclina inducido por dichos diuréticos se reproduce aumentando la concentración extracelular de K⁺³¹.

En resumen: en unas condiciones experimentales particulares, la Xipamida modifica significativamente los movimientos de Na⁺ y de K⁺ a través de la membrana eritrocitaria. Dicho efecto parece ser la consecuencia de la influencia directa de la droga sobre determinados sistemas de transporte de Na⁺ y de K⁺. Concretamente, la Xipamida es capaz de inhibir el funcionamiento del sistema de cotransporte Na⁺, K⁺ del eritrocito. Aunque es preciso caracterizar más ese efecto, los resultados obtenidos permiten hipotetizar que la acción diurético-natriurética de la Xipamida podría deberse, principalmente, a la inhibición del cotransporte Na⁺, K⁺, Cl⁻ de las células de la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle.

BIBLIOGRAFIA

1. GLYNN, I., y KARLISH, S.: «The sodium pump». *Ann. Rev. Physiol.*, 37: 13-55, 1975.
2. GARAY, R.; ADRAGNA, N.; CANESSA, M., y TOSTESON, D. C.: «Outward Na⁺, K⁺-cotransport in human red cells». *J. Memb. Biol.*, 62: 169-174, 1981.
3. DE MENDONÇA, M.; KNORR, A.; GRICHOIS, M. L.; BEN-ISHAY, D.; GARAY, R., y MEYER, P.: «Erythrocyte Na⁺ transport systems in primary and secondary hypertension of the rat». *Kidney Int.* (supl. 11): 569-573, 1982.
4. PALFREY, H. C.; FEIT, P., y GREENGARD, P.: «CAMP-stimulated cation co-transport in avian erythrocytes: Inhibition by "loop" diuretics». *Am. J. Physiol.*, 238: C139-C148, 1980.
5. TUCK, M.; GARAY, R.; RUSSO-MARIE, F., y MEYER, P.: «Na⁺, K⁺-cotransport system in vascular smooth muscle cells». Libro de Resúmenes «Ninth Scientific Meeting of the International Society of Hypertension». México, 1982.

6. LINDEMANN, B., y VAN DREISSCHE, W.: En «Membrane transport processes». Ed. por J. F. Hoffman. Raven Press, p. 155. New York, 1978.
7. VIGNE, P.; FRELIN, C., y LAZDUNSKY, M.: «The amiloride-sensitive Na⁺/H⁺ exchange system in skeletal muscle cells in culture». *J. Biol. Chem.*, 257: 9344-9400, 1982.
8. DIEZ, J.; DAGHER, G.; ABITBOLL, J. P., y GARAY, R.: «The effect of canrenone on Na⁺ and K⁺ movements across human red cell membranes». *Eur. J. Clin. Invest.*, 14 (supl. 2): 51, 1984.
9. SEJERSTED, O.: En «Na⁺, K⁺-ATPase, structure and kinetics». Ed. por J. Skou y J. Norby. Academic Press, p. 525. New York, 1979.
10. BURG, M. B.: «Thick ascending limb of Henle's loop». *Kidney Int.*, 22: 454-464, 1982.
11. REINECK, J., y STEIN, J.: En «The kidney». Ed. por B. M. Brenner y F. C. Rector. W. B. Saunders, p. 1097. Philadelphia, 1981.
12. MARVER, D., y KOKKO, J. P.: «Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone». *Mineral Electrolyte Metab.*, 9: 1-18, 1983.
13. JACOBSON, H. R.: «Effects of CO₂ and acetazolamide on bicarbonate and fluid transport in rabbit proximal tubules». *Am. J. Physiol.*, 240 (1): F54-F62, 1981.
14. DEETJEN, P.; HARDT, K.; HABERLE, D.; SILBERNAPEL, S.; LINGELBACH, W., y KUSCHINSKY, W.: En «Klinische Pharmakologie der Diuretika». Ed. por F. Kruck y W. Leppla. Urban & Schwarzenberg, p. 208. Munich, 1968.
15. FISHER, R., y LENHARTZ, A.: En «Klinische Pharmakologie der Diuretika». Ed. por F. Kruck y W. Leppla. Urban & Schwarzenberg, p. 262. Munich, 1968.
16. HARDING, R. D.; KALOS, A.; WEBER, J. C. P., y DIXON, A. St. J.: «Treatment of hypertension with xipamid-a new diuretic». *Clin. Trials J.*, 11: 45-48, 1974.
17. WEBER, J. C. P.; BIRD, H.; COSH, J.; DANIES, P. S.; DIXON, A. St. S.; LISTER, J.; PETTS, H. V.; PRICHARD, B. N. C., y RAFTERY, E. B.: «Once daily treatment of mild to moderate hypertension with xipamid: A controlled study». *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 4: 283-288, 1977.
18. PALFREY, H. C., y GREENGARD, P.: «Hormone sensitive ion transport systems in erythrocytes as models for epithelial ion pathways». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 372: 291-308, 1981.
19. GARAY, R. P.; PRICE, M.; HANNAERT, P., y NAZARET, C.: En «Physical chemistry of transmembrane ion motions». Ed. por G. Spach. Elsevier, p. 645. Amsterdam, 1983.
20. GARAY, R. P.; NAZARET, C.; DIEZ, J.; ETIENNE, A.; BOURGAIN, R.; BRAGUET, P., y ESANU, A.: «Stimulation of K⁺ fluxes by diuretic drugs in human red cells». *Biochem. Pharmacol.*, 33: 2013-2020, 1984.
21. WILEY, J. S., y COOPER, R. A.: «A furosemide-sensitive cotransport of sodium plus potassium in the human red cell». *J. Clin. Invest.*, 53: 745-752, 1974.
22. PIYASENA, K. H. G.; HAVARD, C. W. H., y WEBER, J. C. P.: «Xipamid, a potent new diuretic». *Curr. Med. Res. Opin.*, 3: 121-125, 1975.
23. SARKADI, B.; ALFINOFF, J. F., y GUNN, R. B.: «Kinetics and stoichiometry of Na⁺-dependent Li⁺ transport in human red blood cells». *J. Gen. Physiol.*, 7: 249-265, 1978.
24. AICKIN, C., y THOMAS, R. C.: «An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibers». *J. Physiol.*, 273: 295-316, 1977.
25. KINSELLA, J. L., y ARONSON, P. S.: «Properties of the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles». *Am. J. Physiol.*, 238: F461-F469, 1980.
26. KINSELLA, J. L., y ARONSON, P. S.: «Cation specificity of the Na⁺-H⁺ exchange in rabbit renal cortical brush border membrane vesicles (BBMV)». *Federation Proc.*, 39: 734, 1980.
27. WARNOCK, D. G., y RECTOR, F. C. (Jr.): En «The kidney». Ed. por B. M. Brenner y F. C. Rector (Jr.). W. B. Saunders, p. 440. Philadelphia, 1981.
28. LEW, V., y BEAUGE, L.: En «Membrane transport in Biology». Ed. por G. Giebisch, D. C. Tosteson y H. H. Ussing. Springer-Verlag, p. 81. Berlín, 1979.
29. LAUF, P. K.; ADRAGNA, N. C., y GARAY, R. P.: «Activation by N-ethylmaleimide of a latent K⁺-Cl⁻ flux in human red blood cells». *Am. J. Physiol.*, 246: C385-C390, 1984.
30. CUSI, D., y GARAY, R. P.: «The effect of tienilic acid on Na⁺ and K⁺ transport in human red cells». *Molec. Pharmacol.*, 19: 438-443, 1981.
31. BRAQUET, P.; DEBY, C.; GARAY, R.; LARRUE, J., y BOURGAIN, R.: «Is a K⁺-prostacyclin interaction involved in the mechanism of action of some diuretic drugs?» *Lancet*, 1: 1218-1219, 1983.