

Caracterización del efecto inhibitor de la xipamida sobre el sistema de cotransporte sodio, potasio del eritrocito humano

J. Díez, L. Yap, R. Díaz-Tejeiro, F. Maduell, P. Errasti y A. Purroy

Servicio de Nefrología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

Resumen

En este trabajo hemos profundizado en el estudio del efecto inhibitor de la xipamida sobre el cotransporte Na^+ , K^+ del eritrocito humano. La xipamida inhibe los flujos simultáneos de Na^+ y de K^+ catalizados por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ , siendo la concentración inhibitora semimáxima de aproximadamente 10^{-3} M. Dicho efecto inhibitor disminuye al incrementar la concentración de bumetanida o la concentración de cloro del medio, lo que sugiere que la xipamida compite con la bumetanida y con el cloro por un mismo sitio receptor en la molécula del cotransporte Na^+ , K^+ . Al estudiar el comportamiento cinético del cotransporte Na^+ , K^+ de eritrocitos incubados en presencia de xipamida 10^{-3} se observa un incremento de la afinidad aparente para el Na^+ . Efectos similares han sido descritos con la bumetanida. Nuestros resultados sugieren que a elevadas concentraciones la xipamida ocupa el sitio receptor para el cloro del sistema de cotransporte Na^+ , K^+ eritrocitario y bloquea su funcionamiento de un modo análogo al de la bumetanida. Dado que dichos efectos se han observado a concentraciones suprafarmacológicas, parece improbable que la acción natriurética que la xipamida presenta «in vivo» sea sólo el resultado del bloqueo de la reabsorción de Na^+ que se efectúa a través del mecanismo de cotransporte de Na^+ , K^+ y Cl^- de la rama ascendente del asa de Henle.

Palabras clave: Eritrocitos. Cotransporte Na^+ , K^+ . Xipamida. Bumetanida. Asa de Henle.

CHARACTERIZATION OF THE INHIBITORY EFFECT OF XIPAMIDE ON SODIUM, POTASIAM CONTRANSPORT SYSTEM OF HUMAN ERYTHROCYTES

SUMMARY

In order to gain insight into the molecular properties of the inhibitory effect of xipamide on the Na^+ , K^+ cotransport system of human erythrocytes, we have performed some additional experiments. Xipamide inhibits by 50 % bumetanide-sensitive Na^+ and K^+ outward cotransport fluxes of human erythrocytes, the IC_{50} being 10^{-3} M. The inhibitory effect of xipamide on bumetanide-sensitive Na^+ efflux tends to decrease in the presence of increasing concentrations of bumetanide.

Correspondencia: Dr. Javier Díez.
Servicio de Nefrología.
Clínica Universitaria.
Avenida Pío XII, s/n.
31080 Pamplona.

Recibido: 18-I-87.
En versión definitiva: 17-III-87.
Aceptado: 17-III-87.

in the incubation medium. Similarly, in presence of increasing concentrations of chloride in the incubation medium, the inhibitory effect of xipamide on bumetanide-sensitive Na^+ efflux tends to diminish. Xipamide also modifies the kinetic parameters of the Na^+ , K^+ cotransport system. These parameters were obtained by regression analysis of the activation curve of bumetanide-sensitive Na^+ efflux as a function of intracellular Na^+ . Xipamide 10^{-3} M diminishes maximal rate (V_{max}) and decreases apparent affinity constant (K_{Na}). All these results indicate that «in vitro» xipamide inhibits Na^+ , K^+ cotransport of human erythrocytes as does bumetanide, the only difference being related to a lesser inhibitory potency of xipamide as compared to bumetanide (IC_{50} for bumetanide 6×10^{-7} M). This observation would suggest that the «in vivo» natriuretic effect of xipamide is not due solely to the inhibition of the Na^+ , K^+ , 2Cl^- mechanism located at the luminal side of cells from thick ascending limb of Henle's loop.

Key words: **Erythrocytes. Na^+ , K^+ cotransport. Xipamide. Bumetanide. Henle's loop.**

Introducción

En la membrana luminal de las células de la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle (PGRAAH) existe una proteína que transporta acoplada 1 Na^+ , 1 K^+ y 2 Cl^- ^{1, 2}. Los llamados diuréticos del asa (furosemida, bumetanida, etc.) son sustancias cuyo efecto natriurético es debido a la inhibición del funcionamiento de esa proteína³.

Los diuréticos del asa inhiben «in vitro» un transporte acoplado de Na^+ y de K^+ , Cl^- dependiente en el eritrocito humano⁴. Asimismo, se ha demostrado que existe una buena correlación entre el grado de inhibición del cotransporte Na^+ , K^+ eritrocitario y la intensidad de la natriuresis inducida por dichas sustancias⁵.

Por todo ello, desde el punto de vista molecular, el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- , dependiente del eritrocito humano, constituye un modelo representativo válido del mecanismo que transporta acoplada Na^+ , K^+ y Cl^- en la PGRAAH. En este sentido, el eritrocito puede utilizarse para estudiar mecanismos moleculares de acción de sustancias cuya estructura y cuyo efecto natriurético «in vivo» permiten considerarlas como diuréticos que actúan en la PGRAAH. Tal es el caso de la xipamida⁶.

En un trabajo previo hemos demostrado que la xipamida es capaz de inhibir el transporte de Na^+ , K^+ del eritrocito humano⁷. En este artículo se presentan resultados de experimentos destinados a profundizar en las características de la interrelación xipamida-sistema de cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- dependiente del eritrocito humano.

Material y métodos

Preparación de los eritrocitos

De cada donante sano se obtuvieron 30-40 ml. de sangre venosa en tubos heparinizados que se centri-

fugaron a 1.750 x g. durante diez minutos a 4° C. El plasma y la capa celular de leucocitos y plaquetas se aspiraron desechándose. El sedimento eritrocitario se procesó inmediatamente.

Medida de los flujos simultáneos de salida de Na^+ y de K^+ catalizados por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+

Los flujos de salida de Na^+ sensibles a la bumetanida fueron utilizados como índice de la actividad del sistema de cotransporte Na^+ , K^+ . Para la medida de dichos flujos se empleó un método previamente descrito⁸ y que brevemente consistió en lo siguiente: los eritrocitos previamente aislados se lavaron cinco veces con Cl_2Mg 110 mM frío y se resuspendieron hasta un hematócrito de 20-25 %, en un medio de magnesio (Mg^{2+})-sacarosa con la siguiente composición (en mM): Cl_2Mg 75, sacarosa 85, MOPS-Tris 10 (pH 7,4 a 37° C), ouabaina 0,1 y glucosa 10. La osmolalidad de esta solución se ajustó a 295 ± 10 mosm/kg. agua. Una alícuota de la suspensión celular se destinó a la medida del hematócrito y del contenido intraeritrocitario de Na^+ y de K^+ previa lisis hipotónica de las células. Un volumen de 0,5 ml. de la suspensión celular se añadió a dos tubos con 2 ml. de medio de Mg^{2+} -sacarosa con bumetanida 25 μM . Los tubos se incubaron dos horas a 37° C (en experimentos control se había observado que los flujos iónicos eran lineales durante más de tres horas). Tras el período de incubación los tubos se enfriaron a 4° C durante un minuto y se centrifugaron a 1.750 x g. durante cuatro minutos a 4° C. Los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos para análisis de Na^+ y de K^+ en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer. Los flujos de salida de Na^+ y de K^+ sensibles a la bumetanida fueron calculados a partir de la diferencia de los flujos iónicos entre los tubos con y sin bumetanida^{7, 8}.

En experimentos adicionales se analizó la influencia de cambios en la concentración de Cl^- y de bu-

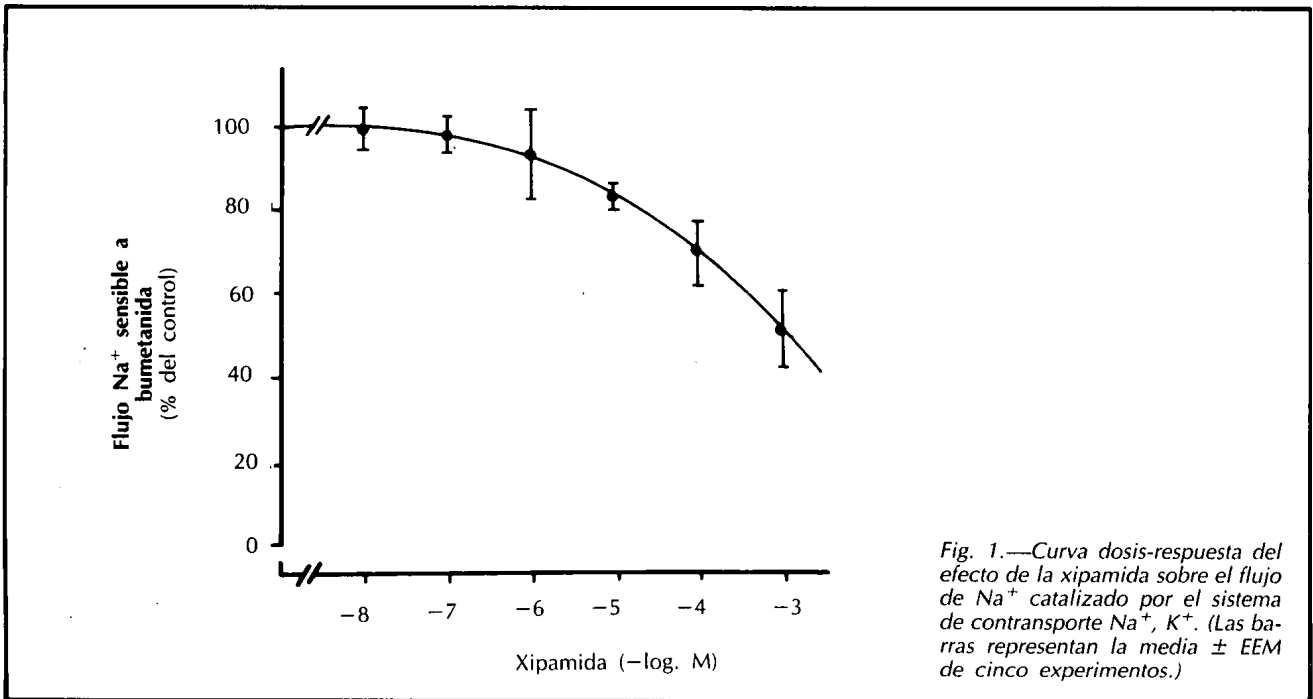


Fig. 1.—Curva dosis-respuesta del efecto de la xipamida sobre el flujo de Na^+ catalizado por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ . (Las barras representan la media \pm EEM de cinco experimentos.)

metanida del medio sobre el efecto de la xipamida sobre los flujos de Na^+ y de K^+ catalizados por el cotransporte. Para ello, en el medio de incubación de Mg^{2+} —sacarosa se modificó el contenido de Cl^- (0 mM —en tal caso se sustituyó el Cl_2Mg por NO_3Mg —, 75 mM y 135 mM), o el de bumetanida (25 y 75 μM).

Medida de los parámetros cinéticos del flujo de Na^+ catalizado por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+

Los parámetros cinéticos del flujo de Na^+ catalizado por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ (K_{Na} : constante de disociación aparente del Na^+ intracelular; $V_{\text{máx.}}$: velocidad máxima del flujo de Na^+ sensible a la bumetanida) se obtuvieron a partir del análisis de regresión de la curva de estimulación del flujo de Na^+ , sensible a la bumetanida en función del contenido intraeritrocitario de Na^+ ⁹.

El contenido intraeritrocitario de Na^+ se modificó utilizando el siguiente protocolo: cinco alícuotas de 2 ml. de eritrocitos frescos y lavados se suspendieron en medio salino hasta un hematócrito de 10 %. Dependiendo de la composición catiónica intracelular que se pretendía, el medio salino se preparó mezclando las proporciones adecuadas de medio de Na^+ y de medio de K^+ . El medio de Na^+ contenía (en mM): ClNa 145, tampón de fosfato sódico (pH 7,2 a 4° C) 2,5, Cl_2Mg 1, sacarosa 40 y glucosa 10. El medio de K^+ contenía (en mM): ClK 125, tampón de fosfato potásico (pH 7,2 a 4° C) 10, Cl_2Mg 1, inosina 10, adenina 2, Trizma base 2, sacarosa 20 y glucosa 10. La osmolalidad de estas soluciones se ajustó a

295 \pm 10 mosm/kg. agua. Las células suspendidas en los correspondientes cinco medios salinos se incubaron cuatro horas a 37° C y los sobrenadantes se desecharon. Las células volvieron a resuspenderse en los mismos medios salinos y se mantuvieron durante dieciocho a veinte horas a 4° C. Tras este período las suspensiones se centrifugaron a 1.750 \times g. durante tres minutos a 4° C, los sobrenadantes se desecharon y los eritrocitos se lavaron cinco veces en Cl_2Mg frío. A partir de lo cual se procedió a la medida del flujo de salida de Na^+ catalizado por el sistema de cotransporte Na^+ , K^+ , tal como se describía en el apartado anterior. En experimentos control habíamos verificado que la absorbancia de hemoglobina (medida por espectrofotometría) por litro de células era similar a los eritrocitos sometidos a modificación de su contenido de Na^+ que en eritrocitos frescos, por lo que descartamos que el procedimiento experimental descrito modificase el volumen celular.

El flujo de Na^+ sensible a la bumetanida así obtenido fue analizado como una función del contenido intraeritrocitario de Na^+ . Dado que la curva de estimulación del flujo de Na^+ catalizado por el cotransporte Na^+ , K^+ es sigmoide ⁹, puede ser escrita por la ecuación siguiente:

$$V = \frac{V_{\text{máx.}}}{(1 + K_{\text{Na}}/\text{Na}^+)^n} \quad [a]$$

en la que V es el flujo de Na^+ sensible a la bumetanida, Na^+_{i} es el contenido intraeritrocitario de Na^+ y $n = 1$ es el número de sitios internos del sistema de cotransporte Na^+ , K^+ para el Na^+ intracelular.

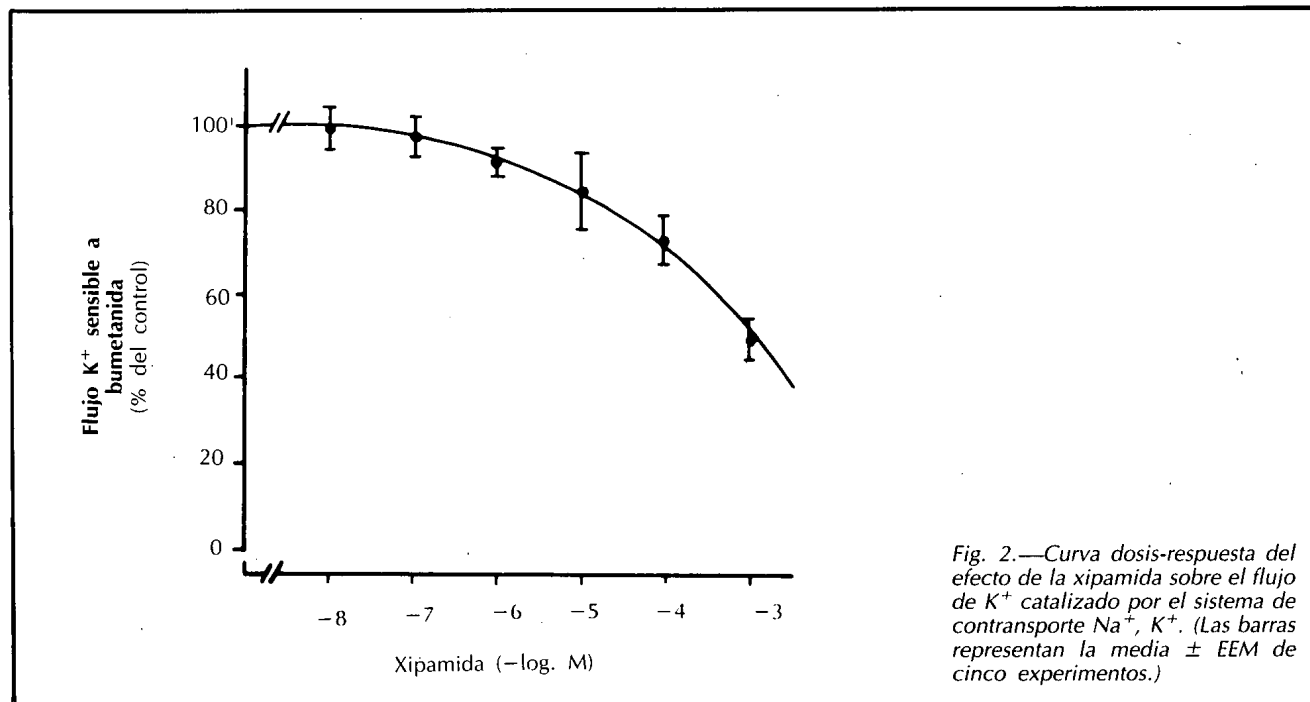


Fig. 2.—Curva dosis-respuesta del efecto de la xipamida sobre el flujo de K⁺ catalizado por el sistema de cotransporte Na⁺, K⁺. (Las barras representan la media ± EEM de cinco experimentos.)

La ecuación [a] puede transformarse en la siguiente transformación de Hanes:

$$\frac{Ba^{+i}}{V} = \left(\frac{K_{Na}}{V_{m\acute{a}x.}} \right) + \left(\frac{Na^{+i}}{V_{m\acute{a}x.}} \right) \quad [b]$$

El primer miembro de la ecuación [b] se analizó como una función del Na⁺i. De esta manera se obtuvo una recta cuya intersección con el eje de abscisas representaba la K_{Na} y cuya pendiente representaba la V_{máx.}⁹. Ambos parámetros fueron calculados mediante un análisis de regresión.

Efecto de la xipamida

El efecto de la xipamida (Lacer, S. A.) sobre el cotransporte Na⁺, K⁺ eritrocitario se estudió en las distintas condiciones experimentales señaladas. Para ello, la xipamida disuelta en una cantidad mínima de etanol, que no modificaba «per se» el transporte de iones, se añadía en los medios de incubación (concentración final máxima de etanol 10⁻⁸ M).

Estudios estadísticos

La significación estadística se analizó empleando el test de la «t» de Student para datos no pareados.

Resultados

Efecto de la xipamida sobre los flujos simultáneos de Na⁺ y de K⁺ catalizados por el sistema de cotransporte Na⁺, K⁺

Las figuras 1 y 2 muestran que en presencia de xipamida 10⁻³M disminuyen el flujo de Na⁺ sensible a la bumetanida (129 ± 25 vs 81 ± 16, media ± EEM de cinco experimentos, p < 0,05), y el flujo de K⁺ sensible a la bumetanida (141 ± 25 vs 67 ± 8, media ± EEM de cinco experimentos, p < 0,05), respectivamente. En ambos casos se constata que el efecto inhibitor máximo es de aproximadamente un 50 %.

Influencia de la bumetanida sobre el efecto inhibitor de la xipamida sobre el cotransporte Na⁺, K⁺

La figura 3 representa la curva dosis-respuesta del efecto de la xipamida sobre el flujo de Na⁺ catalizado por el cotransporte Na⁺, K⁺ en presencia de dos concentraciones distintas de bumetanida. Se observa que el efecto inhibitor porcentual de la xipamida tiende a disminuir al incrementar la concentración de bumetanida del medio. Así, la concentración inhibitor semimáxima (CI₅₀) de la xipamida pasa de 10⁻² M con bumetanida 75 μM.

Influencia del Cl⁻ sobre el efecto inhibitor de la xipamida sobre el cotransporte Na⁺, K⁺

En la figura 4 se representa la modificación del efecto inhibitor porcentual de la xipamida 10⁻³M por concentraciones crecientes de Cl⁻. Dicho efecto inhibitor tiende a disminuir al aumentar la concentración de Cl⁻, pasando de 60 ± 5 % (media ± EEM) con Cl⁻ 0 mM a 33 ± 6 % (media ± EEM) con Cl⁻ 135 mM (p < 0,05, N = tres experimentos).

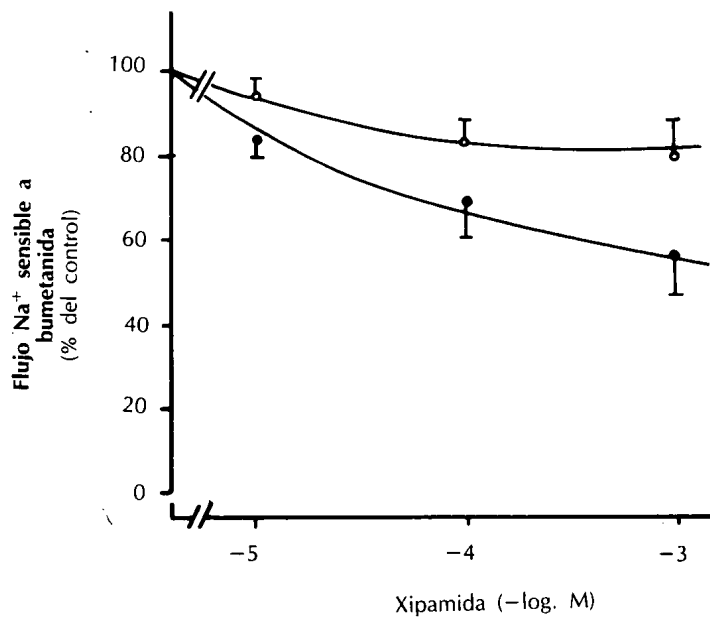


Fig. 3.—Efecto de la bumetanida sobre la curva dosis-respuesta de la inhibición del cotransporte Na⁺, K⁺ por la xipamida. (Los valores se representan como media ± EEM. Círculos negros: bumetanida 24 uM, círculos blancos: bumetanida 75 uM.)

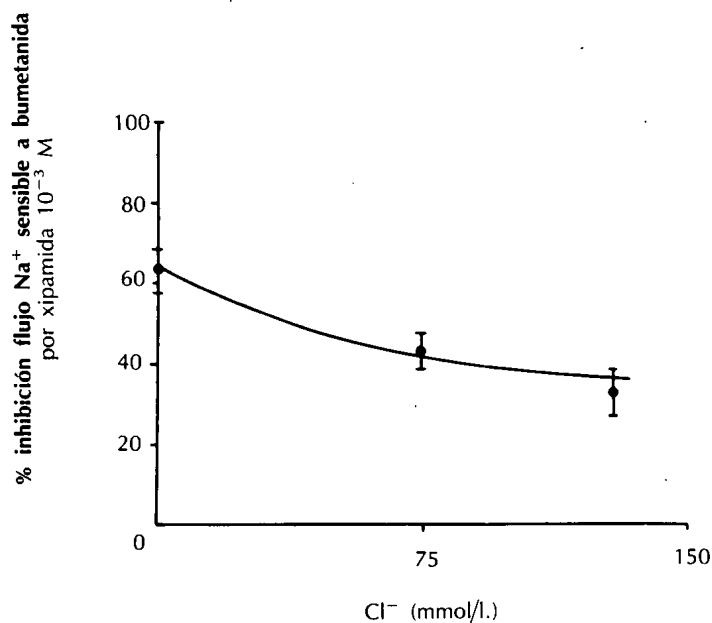


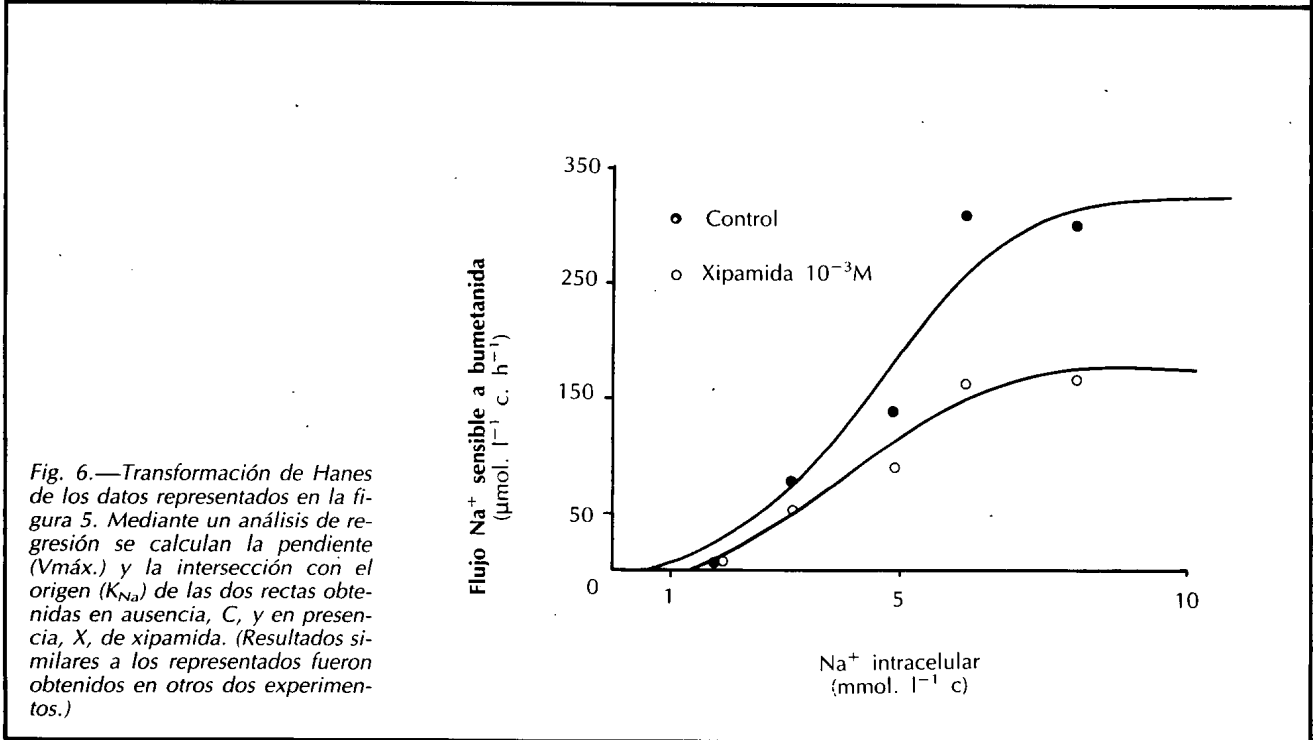
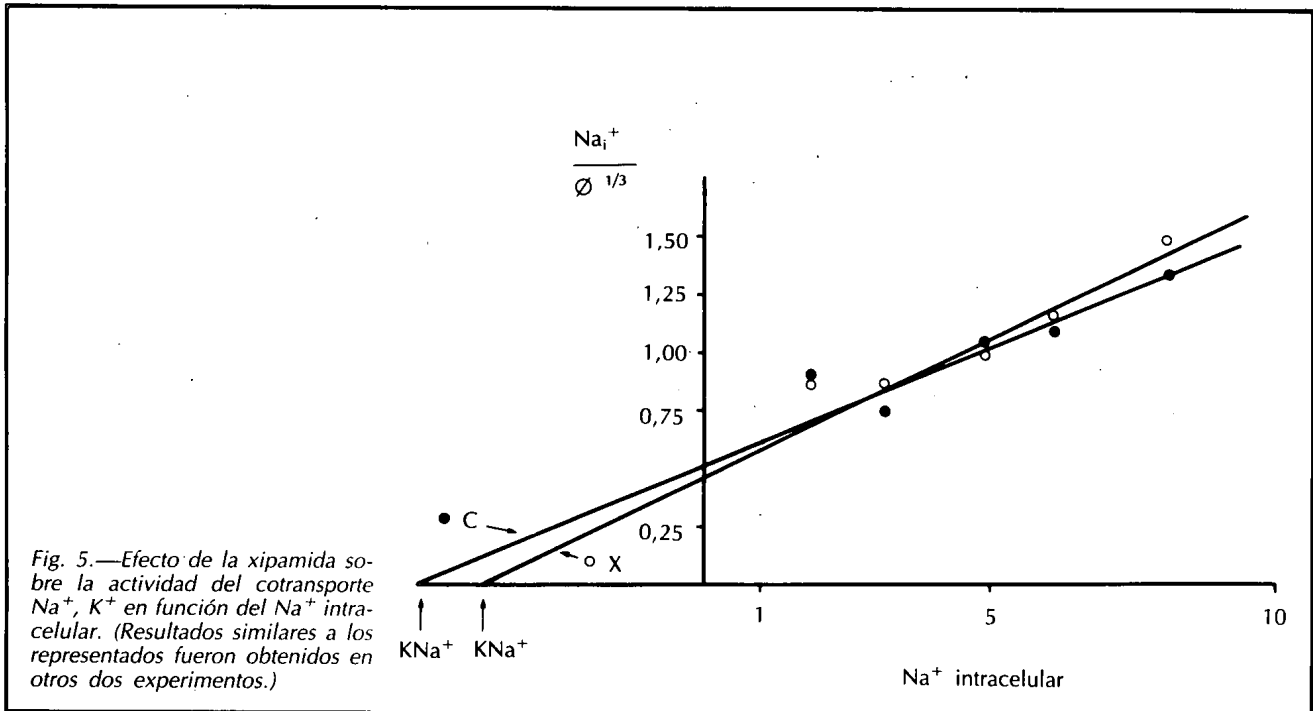
Fig. 4.—Efecto del cloro sobre la inhibición del cotransporte Na⁺, K⁺ por la xipamida. (Los valores se representan como media ± EEM.)

Efecto de la xipamida sobre los parámetros cinéticos del cotransporte Na⁺, K⁺

En la figura 5 se muestra el efecto de la xipamida 10⁻³M sobre la curva de estimulación del cotransporte Na⁺, K⁺ en función del Na⁺ intracelular. Se constata que el efecto inhibitorio de la xipamida sobre el flujo de Na⁺ sensible a la bumetanida se incrementa

a medida que aumenta el contenido intraeritrocitario de Na⁺.

Con los flujos de Na⁺ intracelular se obtienen las rectas representadas en la figura 6. En la misma se observa que la recta obtenida con la xipamida presenta una pendiente mayor que la recta control. Asimismo, la recta de la xipamida presenta una intersec-



ción con el eje de abscisas más próxima al origen que la de la recta control.

En la tabla I se resumen los valores de $V_{\text{máx.}}$ y de K_{Na} obtenidos en tres experimentos como los representados en las figuras 5 y 6. La $V_{\text{máx.}}$ disminuye en presencia de xipamida, lo que significa que dicha sustancia inhibe la velocidad transportadora máxima de Na^+ del cotransporte Na^+ , K^+ . La K_{Na} también disminuye en presencia de xipamida. Dado que la

K_{Na} representa la constante de disociación aparente, dicho resultado traduce un aumento de la afinidad aparente del cotransporte Na^+ , K^+ por el Na^+ intracelular.

Discusión

La observación principal de este trabajo es que las

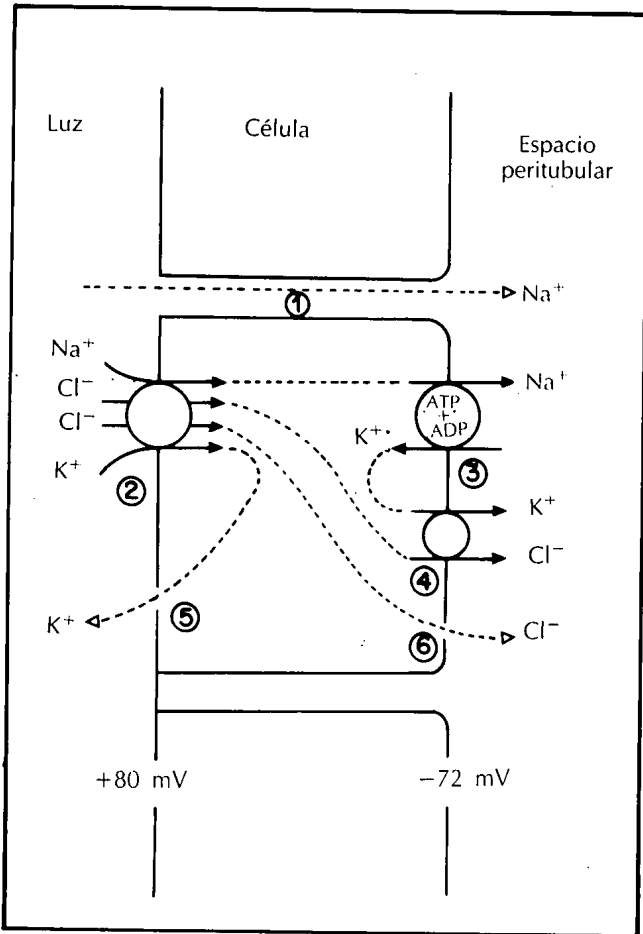


Fig. 7.—Mecanismos implicados en la reabsorción de Na⁺ en la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle:
 1. Conductancia de Na⁺ a través de las uniones estrechas intercelulares (inhibible con cationes divalentes tipo calcio o magnesio).
 2. Cotransporte Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ (inhibible con diuréticos derivados del ácido 5-sulfamoil-benzoico, por ejemplo: furosemida y bumetanida).
 3. Bomba de Na⁺, K⁺ (inhibible con ouabaina y con fletetina).
 4. Cotransporte Cl⁻K⁺ (inhibible con bario).
 5. Conductancia luminal de K⁺ (inhibible con bario).
 6. Conductancia basal de Cl⁻ (inhibible con sustancias derivadas de la difenilamina-2-carboxilato, por ejemplo: torasemida).
 El conjunto de estos mecanismos actúa acopladamente.

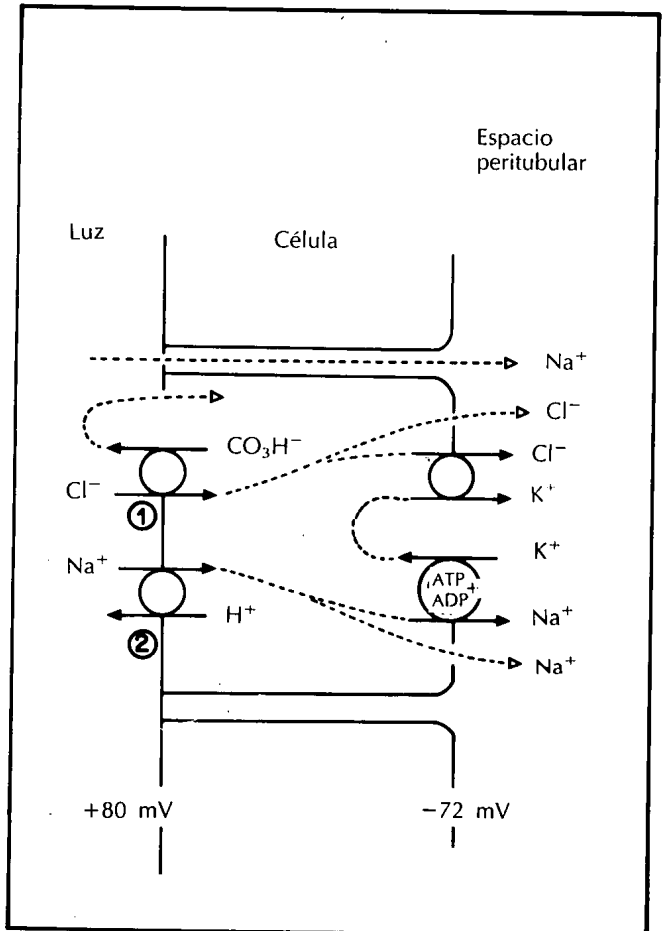


Fig. 8.—Mecanismos propuestos en la reabsorción de Na⁺ en la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle:
 1. Intercambiador Cl⁻/CO₃H⁻ (inhibible con estilbenos sulfonados tipo DIDS o SITS y, probablemente, con diuréticos tipo indacrinona).
 2. Intercambiador Na⁺:H⁺ (inhibible con amilorida). Ambos mecanismos actuarían acopladamente.

Tabla I. Efecto de la xipamida sobre los parámetros cinéticos del sistema de cotransporte Na⁺, K⁺ del eritrocito humano

Condición experimental	V _{máx.} μmoles/1 céls. × h.	K _{Na} mmoles/1 céls.
Control	300 ± 40	4,0 ± 0,5
Xipamida 10 ⁻³ M	175 ± 24 *	3,8 ± 0,2 *

Resultados expresados como media ± EEM de 3 experimentos.
 * p < 0,005.

características del efecto inhibitorio de la xipamida sobre el cotransporte Na⁺, K⁺ eritrocitario son análogas a las de la bumetanida, con la que además compete para producir dicho efecto. Así, por un lado el Cl⁻ interfiere el efecto inhibitorio de la xipamida, lo que sugiere que droga y anión pueden competir con un sitio receptor común, tal como se ha demostrado con la bumetanida¹⁰. Por otra parte, la xipamida modifica la cinética del cotransporte Na⁺, K⁺ —aumenta su afinidad por el Na⁺ intracelular, pero disminuye su actividad transportadora máxima— de un modo similar a como lo hace la bumetanida⁹. Estos resultados apoyan las observaciones clínicas y experimentales que sugieren que los efectos renales

de la xipamida permiten localizar su sitio de acción en la PGRAAH. El efecto diurético es equipotente al de la furosemida¹²; es eficaz en la insuficiencia renal¹³, aumenta la excreción urinaria de calcio¹³, disminuye el aclaramiento de agua libre y aumenta el aclaramiento osmolar¹⁴ y su farmacocinética es similar a la de los diuréticos del asa¹³.

Sin embargo, la potencia inhibidora de la xipamida sobre el cotransporte Na^+ , K^+ eritrocitario es menor que la de los diuréticos del asa clásicos. Así, la máxima inhibición de los flujos catiónicos observada con xipamida no supera el 60 %, en tanto que la inhibición es del 100 % con furosemida o con bumetanida⁵. Además, la concentración inhibidora semimáxima de la xipamida es de orden milimolar, siendo de $6 \times 10^{-7}\text{M}$ para la bumetanida y de $2 \times 10^{-5}\text{M}$ para la furosemida¹¹. Por tanto, el efecto diurético-natriurético que produce «in vivo» la xipamida no puede atribuirse únicamente a la inhibición del mecanismo que transporta acopladamente Na^+ , K^+ y Cl^- en la PGRAAH. En este sentido, es interesante señalar que la reabsorción de Na^+ que tiene lugar en la PGRAAH es el resultado de la acción combinada de varios mecanismos (fig. 7). Del mismo modo, se admite que la reabsorción de Na^+ en la PGRAAH puede bloquearse inhibiendo cada uno de dichos mecanismos². De esta manera, la xipamida podría inhibir la reabsorción de Na^+ que tiene lugar en la PGRAAH, inhibiendo el funcionamiento de alguno de los mecanismos que operan en dicho segmento de la nefrona distintos del cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- .

Por otra parte, a partir de experimentos realizados «in vitro» con eritrocitos, se ha sugerido recientemente que existirían dos grupos distintos de diuréticos del asa: los que muestran gran potencia para inhibir el cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- dependiente y débil potencia para inhibir el mecanismo transportador de aniones, $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ descrito en la membrana luminal de las células de la PGRAAH, donde funciona acoplado a un mecanismo que intercambia Na^+ por H^+ ¹⁵. La xipamida, en tanto que débil inhibidor del cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- dependiente, podría actuar como diurético del asa inhibiendo el transportador $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ acoplado al intercambiador Na^+ : H^+ de la PGRAAH (fig. 8). Recientes observaciones «in vitro» apoyan esta posibilidad¹⁶.

En resumen, aunque la xipamida puede seguir considerándose como un diurético del asa, el mecanismo molecular de acción responsable de su efecto natriurético es improbable que radique exclusivamente en la inhibición del mecanismo luminal que transporta acopladamente Na^+ , K^+ y Cl^- . A diferencia de los diuréticos del asa clásicos como furosemida y bumetanida, la xipamida podría inhibir el funcionamiento de otros mecanismos de transporte ióni-

co de la PGRAAH implicados también en la reabsorción de Na^+ .

Agradecimientos

Los autores de este trabajo desean dejar constancia de su agradecimiento a doña Carmen Miqueo por su ayuda técnica, a doña Eburne Elizalde por su labor de ilustración y a doña Araceli Larraga por su trabajo mecanográfico.

Bibliografía

- Burg M y Good G: Sodium chloride coupled transport in mammalian nephrons. *Ann Rev Physiol* 45:533-547, 1983.
- Greger R: Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop. *Physiol Rev* 65:760-797, 1985.
- Kokko JP: Site and mechanisms of action of diuretics. *Am J Med* 77 (A):11-17, 1986.
- Chipperfield AR: The (Na^+ - K^+ - Cl^-) co-transport system. *Clin Sci* 71:465-476, 1986.
- Ellory JC y Stewart GW: The human erythrocyte Cl^- -dependent Na-K cotransport system as a possible model for studying the action of loop diuretics. *Br J Pharmacol* 75:183-188, 1982.
- Prichard BNC y Brogden RN: Xipamide: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 30:313-332, 1985.
- Diez J, Virto R, Yap L, Errasti P, Purroy A y Prieto J: Estudio de los efectos «in vitro» de un fármaco diurético, xipamida, sobre los sistemas de transporte de sodio y de potasio del eritrocito humano. *Nefrología* 5:109-114, 1985.
- Garay RP, Nazaret C, Diez J, Etienne A, Bourgain R, Braquet P y Esanu A: Stimulation of K^+ fluxes by diuretic drugs in human red cells. *Biochem Pharmacol* 33:2013-2020, 1984.
- Dagher G, Brossard M, Feray JC y Garay RP: Modulation of erythrocyte Na transport pathway (s) by excess Na intake. *Life Sci* 37:243-253, 1985.
- Haas M y McManus TJ: Bumetanide inhibits (Na^+ + K^+ + Cl^-) co-transport at a chloride site. *Am J Physiol* 245:C235-C240, 1983.
- Garay RP, Hannaert P, Nazaret C y Cragoe Jr EJ: The significance of the relative effects of loop diuretics and anti-brain edema agents on the Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport system and the $\text{Cl}^-/\text{NaCO}_3^-$ anion exchanger. *Arch Pharmacol* 334:202-209, 1986.
- Leuschner F: En «Klinische Pharmakologie der Diuretika». Ed. por F. Kruck y W. Leppla. Urban and Schwarzenberg, p. 193. Munich, 1969.
- Knauf H y Mutschler E: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of xipamide in patients with normal and unpaired kidney function. *Europ J Clin Pharmacol* 26:513-520, 1984.
- Gold CH y Viljoen M: Site of renal action of xipamide. *Clin Pharmacol. Ther* 25 (part I):522-527, 1979.
- Friedman PA y Andreoli TE: CO_2 -stimulated NaCl absorption in the mouse renal cortical thick ascending limb of Henle. Evidence for synchronous Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ exchange in apical plasma membranes. *J Gen Physiol* 80:683-711, 1982.
- Nazaret C, Díez J, Hannaert PA, Christen HO, Wierzbicki N y Garay RP: Inhibition of the $\text{Cl}^-/\text{NaCO}_3^-$ anion exchanger by xipamide in human red blood cells. *Eur J Pharmacol* (en prensa).