

Estudio del factor endógeno similar a la digoxina y el transporte de Na⁺ eritrocitario en la insuficiencia renal crónica

R. J. Bosch, N. Hernando, J. J. Plaza, S. Casado y J. M. López-Novoa

Servicio de Nefrología. Laboratorio de Fisiopatología Renal. Fundación Jiménez Díaz-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

RESUMEN

Existen considerables pruebas de que la expansión del volumen extracelular promueve la producción de factores humorales natriuréticos. Uno de estos factores es el factor endógeno, similar a la digoxina (FESD), sobre el que se ha sugerido sea un inhibidor endógeno de la bomba de Na⁺ (NaP). EL FESD ha sido implicado en la adaptación que acompaña a la insuficiencia renal crónica y en la patogenia de la hipertensión.

Hemos estudiado la razón constante (Rc) de la actividad de la NaP y los niveles plasmáticos de un factor endógeno similar a la digoxina (FESD) mediante inmunoensayo por polarización de fluorescencia previa cromatografía del plasma en 15 sujetos control (C), 10 pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) pre y post-hemodiálisis (HD), cinco normotensos (NT) y cinco hipertensos (HT) y en 10 pacientes con trasplante renal (TR) (creatinina <1,4 mg/dl) (cinco NT y cinco HT) en tratamiento con azatioprina y ciclosporina A.

No se hallaron diferencias significativas en la RC de la NaP entre los grupos C ($0,332 \pm 0,8$) e IRC (NT pre-HD $0,283 \pm 0,06$; HT pre-HD $0,289 \pm 0,06$; post-HD $0,289 \pm 0,06$) ni en TR (NT $0,277 \pm 0,06$; HT $0,299 \pm 0,08$). EL FESD se detectó sólo en pacientes con IRC y fue similar en ambos grupos, tanto antes como después de la HD (pre-HD, HT 34 ± 26 pg/ml digoxina equivalente, NT 40 ± 28 , NS; post-HD, HT 23 ± 18 , NT 25 ± 15 , NS). La concentración plasmática de FESD tendió a disminuir con la HD sin significación estadística.

En conclusión: la existencia de un FESD ha sido hallada sólo en pacientes con insuficiencia renal. No hemos hallado correlación entre la presencia de un FESD y la actividad de la NaP. EL FESD y la actividad de la bomba de Na⁺ eritrocitaria no parecen ser marcadores de hipertensión en estos pacientes.

STUDY OF THE ENDOGENOUS DIGOXIN-LIKE FACTOR AND THE ERYTHROCYTE Na⁺ TRANSPORT IN CHRONIC RENAL FAILURE

SUMMARY

Endogenous inhibitors of the Na⁺ pump have been implicated in the pathogenesis of hypertension and in the physiologic adaptation to chronic renal failure (CRF). We have studied the rate constant for erythrocyte Na⁺ pump (NaP) and plasma levels of endogenous digoxin-like immunoreactivity (EDLI) by fluorescence polarization immunoas-

say after gel chromatography in 10 controls subjects (C), 10 patients with CRF before and after hemodialysis (HD), 5 normotensive (NT) and 5 hypertensive (HT), and 10 renal allograft receivers (RA) (creatinine <1.4 mg/dl) (5 NT and 5 HT) in treatment with azathioprine and cyclosporine A.

No differences in the rate constant for NaP between C (0.323 ± 0.08) and CFR (NT before HD 0.280 ± 0.06 , after HD 0.283 ± 0.03 ; HT before HD 0.298 ± 0.06 , after HD 0.292 ± 0.06) or RA (NT 0.77 ± 0.06 , HT 0.299 ± 0.08) were found. EDLI was only detected in CRF patients and the plasma concentration was similar in both groups before HD (HT 34 ± 26 pg/ml digoxin equivalents, NS) and after HD (HT 23 ± 18 , NT 25 ± 15 , NS). Although the plasma levels of EDLI tended to decrease after HD, this fall did not reach statistical significance.

In conclusions: 1) EDLI are presents only in CRF patients, 2) There is no relationship between EDLI and the erythrocyte NaP, 3) neither of these parameters seems to be a marker of hypertension in these patients.

Existen pruebas en favor de que la expansión del volumen extracelular promueve la producción de factores humorales natriuréticos^{1,2}. Numerosos estudios han sugerido que una de estas sustancias es un factor endógeno similar a la digoxina (FESD), con capacidad de inhibir la Na⁺, K⁺ ATPasa en diversos tejidos, incluyendo el riñón³, y que modula la excreción renal de Na⁺^{4,5}. Diversos autores han sugerido la presencia en la uremia de un factor circulante con capacidad de modular la actividad de la bomba de Na⁺^{3,5}. Este inhibidor sería sensible a los cambios de volumen extracelular. Antes de la diálisis, la hipervolemia promovería su producción, y la disminución del volumen extracelular inducido por la diálisis conduciría a su disminución.

El FESD ha sido implicado en la adaptación que acompaña al aumento del volumen extracelular en la insuficiencia renal crónica y en la patogenia de la hipertensión arterial esencial⁷. Sin embargo, Kelly y cols.⁶ han sugerido que el incremento en la actividad de la Na⁺, K⁺ ATPasa durante la diálisis no confirma la hipótesis de que este inhibidor es producido en respuesta al aumento del volumen extracelular.

Aunque estos compuestos han sido intensamente estudiados, tanto su estructura química como su significado fisiopatológico han sido completamente dilucidados.

El objetivo del trabajo ha sido evaluar la hipótesis de que el FESD y la actividad de la bomba de Na⁺ en eritrocitos pueden ser considerados como marcadores de la hipertensión secundaria a insuficiencia renal, así como la posible correlación entre el FESD y la actividad de la bomba de Na⁺ en estas células. Además, hemos estudiado el efecto de la diálisis y el trasplante sobre estos parámetros.

Material

Los estudios se realizaron en tres grupos de sujetos: un grupo control, un grupo de pacientes con insuficien-

cia renal crónica (IRC) y un grupo de pacientes con trasplante renal (TR).

Grupo control: Se estudiaron 15 sujetos normales como controles, siete mujeres y ocho hombres, con una edad media de treinta y ocho años (rango, veinticuatro-seenta años). Todos eran sanos, sin antecedentes personales ni familiares de hipertensión arterial esencial o secundaria.

Grupo IRC: Formado por 10 pacientes diagnosticados de insuficiencia renal crónica terminal, seis hombres y cuatro mujeres, con una edad media de cuarenta y cinco años (rango, dieciséis-treinta y tres años), en programa de hemodiálisis periódica durante al menos seis meses (rango, seis-ciento cuarenta y cuatro meses). La etiología de la insuficiencia renal crónica fue glomerulonefritis crónica (cinco casos), nefropatía intersticial (dos casos), nefroangiosclerosis (dos casos) y nefropatía no filiada (un caso). Cinco de los pacientes cumplían los criterios de hipertensión arterial (>145/90). Todos los pacientes recibían una pauta de hemodiálisis de cuatro horas tres veces por semana. Se emplearon dializadores de fibra hueca de cuprofán (0,8-1,3 m²). El líquido de diálisis (renofundina 920) contenía en mmol/l: Na⁺, 137; K⁺, 2; Ca⁺⁺, 3,5; Mg⁺⁺, 0,75; Cl⁻, 104; acetato, 40. Los estudios se realizaron antes y después de la misma sesión de hemodiálisis (HD). En ningún caso se infundieron soluciones salinas. Todos los pacientes recibían suplementos de calcio e hidróxido de aluminio.

Grupo TR renal: Estudiamos diez pacientes con trasplante renal (seis mujeres y cuatro hombres) con una edad media de treinta y nueve años (rango, veinticuatro-cincuenta y nueve años). La nefropatía de base fue glomerulonefritis crónica (cinco casos), glomerulonefritis rápidamente progresiva (un caso), poliquistosis renal (dos casos) y nefropatía no filiada (un caso). El tiempo medio de tratamiento previo en hemodiálisis fue de veintiséis meses (rango, cuatro-seenta). En ocho casos se trataba de trasplante renal de cadáver y en dos casos de donante vivo. Todos los pacientes presentaban en el momen-

to del estudio una función renal normal (creatinina, <1,4 mg/dl; aclaramiento de creatinina, >70 ml/minuto). El tiempo medio de evolución del trasplante fue de dieciocho meses (rango, doce-treinta y seis). Cinco de los pacientes cumplían los criterios de hipertensión arterial (>145/90). Como medicación inmunosupresora recibían azatioprina (1-2 mg/kg peso/día) y ciclosporina A (3-5 mg/kg peso/día).

Con autorización, previo informe de los pacientes, la medicación antihipertensiva fue suspendida dos semanas antes de realizar el estudio.

Métodos

Na⁺ y K⁺ intracelular

Los eritrocitos se obtuvieron por centrifugación, desechándose los leucocitos. El plasma se aspiró y almacenó a -20° C. Los eritrocitos se lavaron tres veces con Cl₂Mg (110 mM, pH 7,4) a una temperatura no superior a 4° C. Los eritrocitos lavados se hemolizaron en agua destilada en una proporción 1:15 (v:v), y se determinó la concentración de Na⁺ y K⁺ en el hemolizado mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer modelo 2380, Norwalk, Connecticut, USA)^{6,7}.

Transporte eritrocitario de Na⁺

Se determinó el transporte mediado por la bomba de Na⁺ (inhibible por ouabaína) según el método descrito por Garay y cols.⁸, con ligeras modificaciones⁹. Los eritrocitos se lavaron tres veces en un medio de ClMg⁺⁺ (110 mmol/l, pH 7,4) y se resuspendieron en 250 µl con un hematócrito entre 20-25 %, y se diluyeron en 1 ml de un medio con la siguiente composición en mmol/l: Cl₂Mg 100, MOPS 10, TRIS 10 y glucosa 10, pH 7,4. Las alícuotas (en una suspensión de 4-5 % de hematócrito) se incubaron una hora a 37° C, con el agregado de los siguientes medios (composición en mmol/l): medio (I) ClK 2, 10 µl; medio (II) ouabaína 0,15 µl. Un par de tubos con medio I no se incubaron para determinar el flujo basal de Na⁺ (tiempo 0). Después de la incubación se realizó una centrifugación a 1.700 g/min, recogiendo el sobrenadante. La concentración de Na⁺ del sobrenadante se determinó mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, modelo 2380, USA).

El transporte de Na⁺ resulta de la siguiente ecuación:
Eflujos de Na⁺ =

$$\frac{D [\text{Na}^+] \times 1/\text{hematocrito}}{\text{Hematocrito} \times t (\text{horas}) \times 0,85}$$

Donde se expresa el hematócrito en el medio de incubación; 0,85 es el factor de corrección del espectrofotómetro; D [Na⁺] (µmol/l sobrenadante) es la diferencia entre la concentración externa de Na⁺ antes (tiempo 0) y después de la incubación. El transporte de Na⁺ resulta de la diferencia entre el flujo de Na⁺ después de una

hora de incubación y el flujo basal en el tiempo cero (tubos no incubados). La actividad de la bomba de Na⁺ se calcula como la diferencia del flujo en ausencia y en presencia de ouabaína (medios 1 y 2, respectivamente). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

FESD en plasma

Se determinó previa centrifugación de la sangre a 1.700 g diez minutos y posterior aspiración y fraccionamiento del plasma (volumen, 3-4 cm/l) en gel de Sephadex G 25 fino, en columnas cromatográficas (Pharmacia Fine Chemical, Suecia) de 2,5 × 40' cm⁶. El volumen de exclusión de la columna fue de 85-90 ml, estimado mediante la elución de azul dextrano. Se utilizó como eluyente acetato de amonio (10 mM, pH 6,5) a un flujo de elución de 1,5 ml/minuto. Las fracciones fueron recogidas en volúmenes de 5 ml, en tubos de poliestileno, mediante un colector de fracciones automático (LKB Ultrac), y la concentración de Na⁺ se determinó mediante un analizador con electrodos selectivos (Astra 4, Beckman, Schilla Pork, IL, USA).

El contenido de los tubos desde el inicio de la aparición de Na⁺ hasta su terminación se reunió como fracción III (fracción de las sales), y los siguientes 18 tubos como fracción IV (fracción posterior a las sales)^{9,10}. Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente resuspendidas en 300 µl de un tampón de ClNa (composición: albúmina bovina, 0,1 % [W/V]; ClNa 0,9 %; azida, 0,01 [W/V]) (pH 7,4).

La concentración de equivalentes de digoxina fue determinada mediante inmunoensayo por polarización de fluorescencia (Abbot TDX, Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA). Los resultados se expresan como equivalentes de digoxina en picogramos/ml⁹⁻¹¹.

Estadística

Todos los datos están expresados como medias ± SD. Todos los grupos se estudiaron mediante un análisis de la varianza y la prueba de Kurskal Wallis. Los valores pre y post-HD se compararon con el test de Wilcoxon. Se utilizó el test de Mann Whitney para comparar los valores de NT e HT. Todos los estudios estadísticos se realizaron en una base de datos estadística (Sigma, Horus Hardware Co.).

Resultados

El peso perdido durante la sesión de HD fue similar en NT y HT (2,2 ± 1 kg vs 1,9 ± 0,5, respectivamente; NS). Los valores correspondientes a la concentración de Na⁺ y K⁺ intracelular y la actividad de la bomba de Na⁺ fueron similares a los de los sujetos control, tanto en los pacientes sometidos a hemodiálisis como en los pacientes

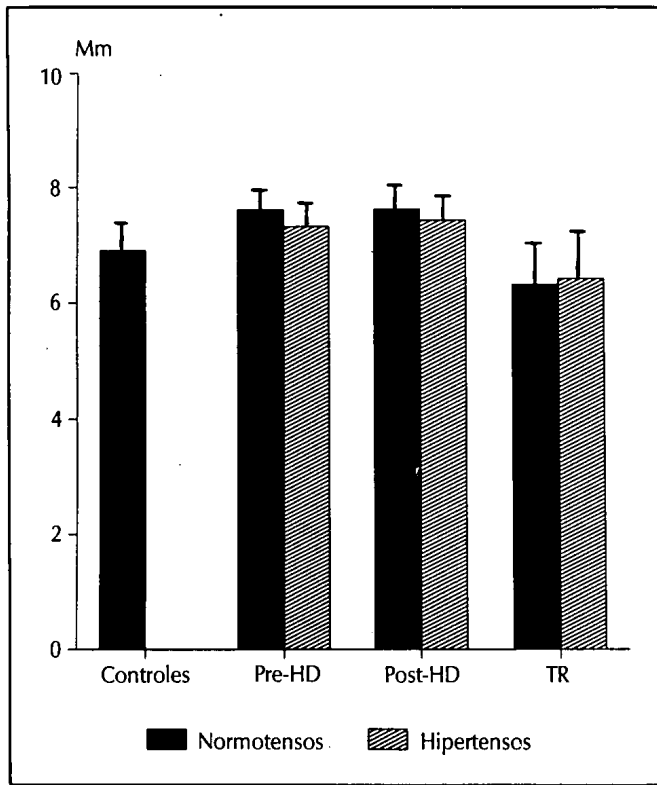


Fig. 1.—Concentración intracelular de Na⁺ en sujetos control, pacientes con IRC pre y posthemodiálisis (HD) y pacientes con trasplante renal (TR).

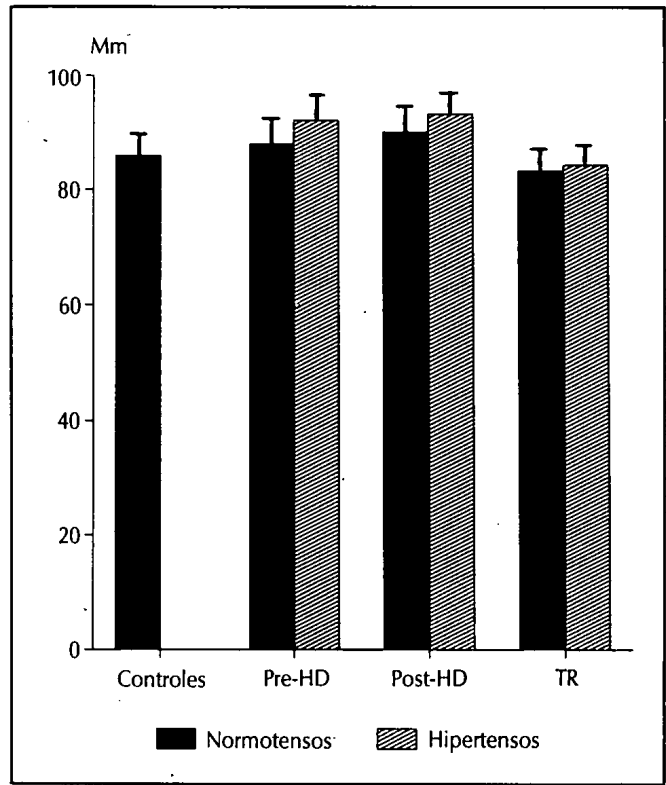


Fig. 2.—Concentración intracelular de K⁺ en sujetos control, pacientes con IRC pre y posthemodiálisis (HD) y pacientes con trasplante renal.

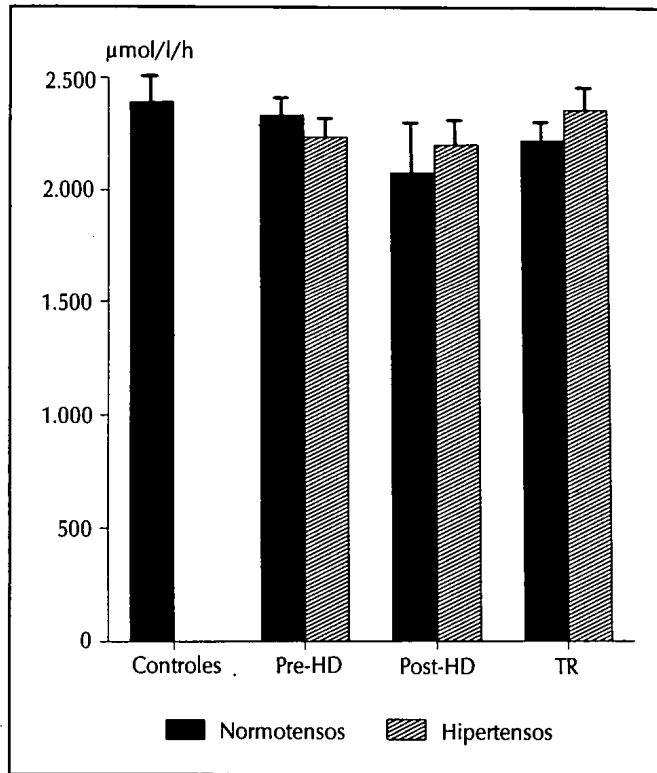


Fig. 3.—Actividad de la bomba de Na⁺ (μmol/l/h) en sujetos control, pacientes con IRC pre y posthemodiálisis (HD) y pacientes con trasplante renal (TR).

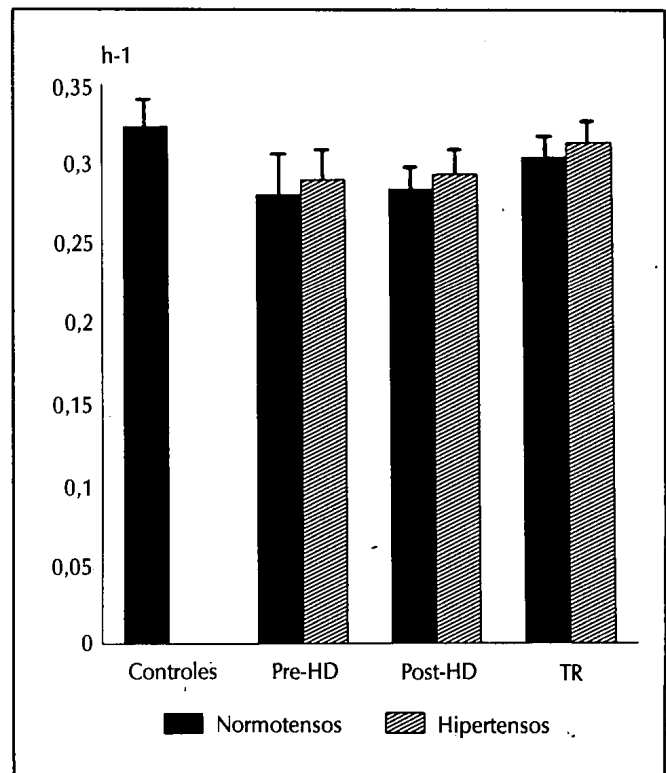


Fig. 4.—Razón constante de la bomba de Na⁺ (h⁻¹) en sujetos control, pacientes con IRC en hemodiálisis (HD) y en pacientes con trasplante renal (TR).

trasplantados. No se hallaron diferencias entre los pacientes normotensos e hipertensos (figs. 1, 2, 3 y 4).

El FESD fue detectado sólo en los pacientes en IRC sometidos a hemodiálisis, y su concentración plasmática fue similar en ambos grupos, tanto antes como después de la diálisis. Prediálisis NT, 34 ± 26 pg/ml, equivalentes de digoxina; HT, 40 ± 28 , NS; posdiálisis NT, 23 ± 18 ; HT, 25 ± 15 , NS). Aunque la concentración plasmática tendió a disminuir con la hemodiálisis, esta caída no tuvo significación estadística. Cabe destacar que uno de los pacientes trasplantados fue estudiado durante su estancia en hemodiálisis. El FESD antes de la diálisis fue de 11 pg/ml, y no se detectó después de la diálisis.

Discusión

Hace más de veinticinco años que Welt y cols.¹² describieron alteraciones en el transporte iónico celular en la uremia. Desde entonces diversos investigadores han hallado alteraciones en el transporte iónico celular en pacientes urémicos^{9, 13, 14} y en la hipertensión arterial esencial^{15, 16}.

Es importante destacar que ya en esta descripción original los autores señalaron que el incremento en la concentración intracelular de Na^+ y la disminución en la actividad de la bomba de Na^+ en eritrocitos era un hallazgo inconstante en los pacientes urémicos.

Izumo y cols.¹³ describieron una inhibición en la actividad de la bomba de Na^+ en eritrocitos de pacientes urémicos por la presencia de un factor circulante y su aguda corrección por hemodiálisis. Sin embargo, Cheng y cols.¹⁴ no han hallado una sustancia circulante que interfiera con la unión de la ouabaína a su receptor. Estos autores hallaron un incremento en la concentración intracelular de Na^+ en algunos, pero no en todos los pacientes con IRC, y clasificaron a los pacientes según la concentración de Na^+ eritrocitario en: 1) IRC con incremento de la concentración de Na^+ , y 2) IRC con normal concentración de Na^+ . En los pacientes con incremento de la concentración de Na^+ , estos autores han hallado una disminución del número de unidades de la Na^+ , K^+ ATPasa en eritrocitos. Cheng y cols.¹⁴ concluyen que la disminución del número de unidades enzimáticas es el evento inicial que conduce al aumento de la concentración intracelular de Na^+ .

Es importante destacar que recientes investigaciones aportan pruebas en favor de los hallazgos de Cheng y cols. En efecto, Ferverza y cols.¹⁷ han hallado una inhibición en la actividad de la bomba de Na^+ eritrocitaria en un 30 % de los pacientes en hemodiálisis crónica, mientras los pacientes con trasplante renal no presentan diferencias con los sujetos controles. Además, estudios previos en nuestro laboratorio han señalado resultados similares⁹. Estos datos pueden explicar que en el presente trabajo no hayamos observado alteraciones en la ac-

tividad de la bomba de Na^+ en eritrocitos de estos pacientes.

Por otra parte, en el presente estudio hemos detectado la presencia de un FESD en pacientes urémicos en hemodiálisis, mientras que no ha sido hallado ni en los sujetos control ni en los pacientes trasplantados con buena función renal. Además, el FESD no se ha correlacionado con los cambios agudos del volumen extracelular inducidos por la diálisis ni con la actividad de la bomba de Na^+ eritrocitaria.

Muchos investigadores han estudiado mediante radioinmunoanálisis al FESD para investigar los niveles de un posible inhibidor de la bomba de Na^+ . Estos datos se basan en la premisa de que la sustancia que se une a un receptor endógeno específico debe también unirse a un anticuerpo contra dicha sustancia². Sin embargo, recientemente diversos investigadores han aportado pruebas en favor de que esta presunción puede no ser universalmente válida¹⁸. En efecto, Yamada y cols.¹⁹ han comunicado la disociación entre el FESD y la capacidad para inhibir la Na^+ , K^+ ATPasa en suero de rata después de una expansión del volumen extracelular. Stokes y cols.²⁰ sugieren que la presencia de un inhibidor de la Na^+ , K^+ ATPasa en el plasma de pacientes urémicos no está en relación ni con los cambios del volumen extracelular inducidos por la diálisis ni con los niveles plasmáticos del FESD. Además, en otra situación clínica en que el FESD está presente, como es el tercer trimestre del embarazo, Poston y cols.²¹ no han hallado correlación entre el FESD y la actividad de la bomba de Na^+ en leucocitos.

En los últimos años se han identificado diversas sustancias que pueden actuar como FESD: ácidos grasos no saturados (AGNS), fosfolípidos, hidrocortisona y sulfato de dihidroepiandrosterona²². Recientemente, Law y Valdés²² han propuesto tres criterios empíricos para definir la capacidad necesaria que debe tener un compuesto endógeno para ser considerado un FESD. Estos criterios incluyen intensidad inmunorreactiva para existir en concentraciones fisiológicas, así como las características bioquímicas de unirse a las proteínas propias de estos compuestos. Sin embargo, se ha sugerido que los AGNS regulan la actividad de la bomba de Na^+ en leucocitos²³. Por tanto, la búsqueda de un factor endógeno inhibidor (regulador) de la Na^+ , K^+ ATPasa y su exacto mecanismo de acción continúa^{2, 24}. Siguiendo a Goto y cols., la estimación de la «hormona natriurética», solamente basada en los niveles plasmáticos de un FESD, puede conducir a error y debe interpretarse con precaución. El presente trabajo no permite interpretar adecuadamente el papel del FESD en la insuficiencia renal crónica.

En conclusión, el FESD estudiado en sujetos normales, en pacientes urémicos y en pacientes con trasplante renal sólo ha sido hallado en los pacientes urémicos. No existe correlación entre los niveles del FESD y la actividad de la bomba de Na^+ eritrocitaria. Estos parámetros no parecen ser marcadores de la hipertensión arterial secundaria a insuficiencia renal.

Agradecimiento:

R. J. Bosch es becario de la Fundación Iñigo Alvarez de Toledo.

Bibliografía

1. Haddy FJ: Endogenous digitalis-like factor or factors. *New Eng J Med*, 316:621-623, 1987.
2. Bosch RJ: Hormona natriurética: la búsqueda continúa. *Nefrología*, 10, sup. 1:1-6, 1990.
3. De Wardener HE y McGregor GA: Concept of Natriuretic Hormone. *Physiol Rev*, 65:658-759, 1985.
4. Buckalew VM (Jr): Natriuretic Hormone. En Epstein M (ed.). *The Kidney in Liver diseases*, 3.ª ed., pp. 417-428. Baltimore. Williams & Williams, 1988.
5. Gruber KA, Whitaker JM y Bukalew VM (Jr): Endogenous digitalis-like substance in plasma of volume-expanded dogs. *Nature*, 287:743-745, 1980.
6. Kelly RA, O'Hara DS, Mith WE, Steinman TI, Goldzer RC, Solomon HS y Smith TW: Endogenous digoxin-like factors in hypertension and chronic renal insufficiency. *Kidney Int*, 30:723-729, 1986.
7. De Wardener HE y MacGregor GA: Dahal's hypothesis that a saluretic substance may be responsible for a sustained rise in arterial pressure: Its possible role in essential hypertension. *Kidney Int*, 18, n.º 1:1-9, 1980.
8. Garay RP, Nazaret C, Díez J, Etienne A, Bourgain R y Braquet P: Stimulation of K⁺ fluxes by diuretics in human red cells. *Biochem Pharmacol* 33:2013-2020, 1984.
9. Bosch RJ, Hernando N, Casado S y López-Novoa JM: Endogenous digoxin-like immunoreactivity and erythrocyte sodium transport in uremic patients undergoing dialysis. *Clin Sci*, 76:157-163, 1989.
10. Kramer JH, Pennig P, Klingmuller D, Kipnowski J, Glanzer K y Dusing R: Digoxin-like immunoreacting substance(s) in the serum of patients with chronic uremia. *Nephron*, 40:297-302, 1985.
11. Clark DR, Inloes RL, Kalman SM y Sussman HH: Abbot TDx Date Status, and Du Pont aca Automated Digoxin Immunoassay Compared with a reference radioimmunoassay methods. *Clinical Chemistry*, 32:381-385, 1986.
12. Welt LG, Sach JR y McManus TJ: An ion transport defect in erythrocytes from uremic patients. *Trans Assoc Physicians*, 77:169-181, 1964.
13. Izumo H, Izumo S, DeLuise M y Flier JR: Erythrocyte Na⁺, K⁺ pump in uremia. Acute correction of transport defect by hemodialysis. *J Clin Invest*, 74:581-588, 1984.
14. Cheng JT, Khan T y Kaji DM: Mechanism of alteration of sodium potassium pump of erythrocyte from patients with chronic renal failure. *J Clin Invest*, 74:1811-1820, 1984.
15. Díez J, Hannaert P y Garay RP: A Kinetic study of the Na⁺, K⁺ pump in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Am J Physiol*, 252:H1-H6, 1987.
16. De la Sierra A, Coca A, Aguilera MT, Ingelmo M y Urbano-Márquez A: Clinical profiles and erythrocyte Na⁺ transport abnormalities of four types of primary hypertension in Spain. *Kidney Int*, 36:114-119, 1989.
17. Fervenza CF, Hendry BM y Clive Ellory J: Effects of dialysis and transplantation on red cell blood function in renal failure. *Nephron*, 53:121-128, 1990.
18. Bosch RJ y López-Novoa JM: La Na⁺, K⁺ ATPasa en la uremia. *Nefrología* (en este número).
19. Yamada K, Goto M, Yoshioka M y Sugimoto T: Dissociation of digoxin like immunoreactivity and Na⁺, K⁺ ATPasa inhibitory activity in rat plasma. *Experientia*, 44:992-993, 1988.
20. Stokes GS, Norris LA, Marwood JF, Johnston H y Caterson RJ: Effect of dialysis on circulating Na⁺, K⁺ ATPasa inhibitor in uremic patients. *Nephron*, 54:127-133, 1990.
21. Poston L, Morris FJ, Wolfe CD y Hilton PJ: Serum digoxin-like substances in pregnancy-induced hypertension. *Clin Sci*, 77:189-199, 1989.
22. Kelly RA, O'Hara DS, Canessa ML, Mitch WE y Smith TW: Characterization of digitalis-like factors in human plasma: interactions with cardiac glycoside-specific antibodies. *J Biol Chem*, 260:11396-11405, 1985.
23. Lau BWC y Valdés R (Jr): Criteria for identifying endogenous compound as digoxin-like immunoreactive factors in humans. *Clin Chim Acta*, 175:67-78, 1988.
24. NG LI: Hockaday TRD: Non-esterified fatty acids may regulate human leucocyte sodium pump activity. *Clin Sci*, 71:737-742, 1986.
25. Goto A, Yamada K, Ishii M y Sugimoto T: Does digoxin-like immunoreactivity really represent the natriuretic hormone? *Nephron*, 54:99-100, 1990.