

Arginina vasopresina y bomba de sodio, potasio: estudios en eritrocitos humanos

J. Díez y A. Arrázola

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

RESUMEN

Junto al efecto hidroosmótico, en los últimos años se han descrito efectos de la arginina vasopresina (AVP) sobre el transporte tubular renal de sodio (Na^+) y de potasio (K^+). Hasta el presente, los datos recogidos en la literatura sobre este aspecto son muy contradictorios. Por ello hemos estudiado «in vitro» la interrelación entre la AVP y la bomba de Na^+ , K^+ de eritrocitos frescos de sujetos normotensos. La AVP no modifica el flujo de salida de Na^+ catalizado por la bomba de Na^+ , K^+ . La ausencia de un efecto se observa aún tras la adición de AMP cíclico (AMPc) o de calcio (Ca^{2+}). Estos resultados sugieren que la AVP no es capaz de modular la actividad transportadora de la bomba de Na^+ , K^+ de eritrocitos humanos cuya concentración de Na^+ no se ha modificado.

Palabras clave: **Arginina vasopresina. Bomba de Na^+ , K^+ . Eritrocitos.**

THE EFFECT OF ARGININE VASOPRESSIN ON THE SODIUM, POTASSIUM PUMP OF HUMAN ERYTHROCYTES

SUMMARY

It has been well established that «in vitro» arginine vasopressin (AVP) stimulates sodium (Na^+) transport across different segments of the renal tubule. However, the net «in vivo» effect of AVP on kidney Na^+ handling is natriuretic. Erythrocytes are an easily accesible tissue whose membrane contains ion transport systems which may serve as models for epithelial ion pathways. Thus, we have explored the possible effects of AVP on Na^+ , K^+ pump in fresh human erythrocytes. At 10^{-10}M AVP does not modify Na^+ efflux catalyzed by the pump. No changes in the activity of the pump are observed when cells are incubated in presence of AVP plus cyclic AMP or AVP plus calcium. These results suggest that AVP is not able to modulate the Na^+ transport activity of Na^+ , K^+ pump in fresh human erythrocytes. In addition, the lack of effect appears not to be influenced by second messengers.

Key words: **Arginine vasopressin. Na^+ , K^+ pump. Human erythrocytes.**

Correspondencia: Dr. J. Díez.
Servicio de Nefrología.
Clínica Universitaria.
31080 Pamplona.

Recibido: 23-VII-85.
En forma definitiva: 18-II-86.
Aceptado: 25-II-86.

Introducción

La AVP ejerce su efecto principal sobre el túbulo colector renal, aumentando la permeabilidad al agua del lado luminal de la membrana celular y facilitando así su reabsorción¹. La acción hidrosmótica de la AVP parece estar mediada por el AMPc^{1, 2}. Estudios recientes sugieren que la AVP también podría modificar el manejo renal del Na⁺ y del K⁺. En efecto, distintas experiencias realizadas «in vitro» demuestran que la AVP estimula un cotransporte de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en las células de la porción medular gruesa de la rama ascendente del asa de Henle³⁻⁵. Los mismos estudios indican que dicho efecto estaría mediado por el AMPc³⁻⁵. Por otra parte, la aplicación directa «in vitro» de AVP a células del túbulo colector también favorece la absorción de Na⁺⁶. Sin embargo, otras experiencias muestran que el efecto neto de la AVP sobre una preparación de riñón entero⁷ o sobre el animal intacto⁸ es natriurético. Trabajos muy recientes que aportan datos contrapuestos sobre el efecto de la AVP sobre la Na⁺, K⁺-ATPasa de células de médula de rata^{9,10} dificultan aún más la comprensión de la influencia de la hormona sobre el manejo tubular de Na⁺.

Los eritrocitos constituyen un tejido fácilmente accesible, cuya membrana contiene sistemas de transporte de Na⁺ que pueden servir como modelo para la comprensión de los mecanismos reguladores del transporte de Na⁺ en tejidos epiteliales¹¹. Además, el transporte de Na⁺ en los eritrocitos puede estar modulado por hormonas a través de segundos mensajeros, tales como el AMPc^{12, 13}. Por todo ello, y con el fin de profundizar en el conocimiento de la influencia de la AVP sobre el transporte transmembranario de Na⁺, en este trabajo hemos investigado el efecto «in vitro» de la AVP sobre la actividad transportadora de Na⁺ de la bomba de Na⁺, K⁺ de eritrocitos humanos frescos, o sea manipulados sin modificar su concentración basal de Na⁺.

Materiales y métodos

La actividad transportadora de la bomba de Na⁺, K⁺ se ha estudiado en sujetos sanos, analizando el componente de los flujos de Na⁺ sensible a la ouabaina^{14, 15} en eritrocitos frescos incubados en un medio sin Na⁺, por lo que el flujo medido correspondía a la extrusión de Na⁺ de la célula^{16, 17}. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Preparación de los eritrocitos

Se recogían 20 ml. de sangre venosa en tubos heparinizados que se centrifugaban a 1.750 × g. durante diez minutos, tras lo que el plasma y la capa

superior de células, leucocitos y plaquetas se aspiraba y se desechaba. El sedimento eritrocitario se procesaba inmediatamente.

Medida del flujo de Na⁺ catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺

Los eritrocitos se lavaban cinco veces con Cl₂Mg 110 mM y se suspendían, hasta un hematocrito del 20-25 %, en un medio de Mg²⁺-sacarosa compuesto por (en mM): Cl₂Mg 75, sacarosa 85, MOPS-Tris 10 (pH 7,4 a 37° C) y glucosa 10. Todos los pasos se efectuaban a 4° C. Alícuotas de la suspensión anterior se añadían, hasta un hematocrito final del 4-5 %, a dos soluciones a 4° C conteniendo medio de Mg²⁺-sacarosa como constituyente básico más los siguientes aditivos (en mM): Solución 1 ClK 2 y solución 2 ouabaina 0,1. La osmolalidad de ambas soluciones era de 295 ± 10 mosm/kg. agua. Al tiempo t = 0 los tubos se transfirieron a un baño de agua a 37° C para su incubación. La concentración extracelular de Na⁺ se midió en los sobrenadantes al tiempo t = treinta minutos; en un medio de Mg²⁺-sacarosa con ClK o con ouabaina el flujo de Na⁺ a 37° C es lineal más de treinta minutos¹⁶, previa transferencia de los tubos al hielo y posterior centrifugación a 1.750 × g. durante cinco minutos a 4° C.

Los flujos de Na⁺ se calculaban utilizando la siguiente ecuación:

Flujo de salida de Na⁺ =

$$\frac{(Dcat) \times (1 - \text{Hematocrito final})}{\text{Hematocrito final} \times t}$$

Donde Dcat (micromoles/litro sobrenadante) representa la diferencia en la concentración extracelular de Na⁺ entre los tubos con y sin ouabaina tras el tiempo de incubación t expresado en horas.

Otras medidas

Alícuotas de la suspensión final se destinaban a la medida del contenido intracelular de Na⁺ y K⁺. Para ello los eritrocitos se lisaban suspendiéndolos en una solución hipotónica de Acación-ox 2 %. Tanto estas medidas como las efectuadas en los sobrenadantes de los medios de incubación se efectuaron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer.

El volumen celular se midió empleando alícuotas del sedimento eritrocitario que quedaba tras centrifugar los tubos previamente incubados a 37° C. Para ello se empleó un autoanalizador Coulter Counter.

Sustancias estudiadas

Los efectos de la AVP sintética y de sus derivados,

lisina vasopresina (LVP) y Asu^{1,6}, Arg⁸-vasopresina (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA), sobre la bomba de Na⁺, K⁺ del eritrocito humano se estudiaron siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Se procedió análogamente para el AMPc, el Ca²⁺ y el ionóforo del Ca²⁺ (A₂₃₁₈₇). Todas las sustancias estudiadas se disolvieron en una cantidad mínima de medio de Mg²⁺-sacarosa con el fin de no modificar apreciablemente el volumen o la concentración de las soluciones de incubación.

Análisis estadístico

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

Resultados

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

Como se observa en la tabla I, la AVP no modifica el flujo total de Na⁺ extruido por eritrocitos frescos incubados durante treinta minutos en una solución de Mg²⁺-sacarosa sin Na⁺. Tampoco modifica significativamente el flujo de Na⁺ sensible a la ouabaina que es catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺. En presencia de AVP, dicho flujo disminuye aproximadamente en un 10 %, lo que supone entre 150 y 200 micromoles de Na⁺ por litro de eritrocitos y por hora. Por el contrario, el flujo de Na⁺ resistente a la ouabaina tiende a aumentar ligeramente con AVP.

Efecto de los derivados de la AVP sobre la bomba de Na⁺, K⁺

En la tabla II se puede observar que ninguno de los derivados de la AVP estudiados es capaz de modificar apreciablemente el flujo de Na⁺ catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺. Asimismo, ninguna de ambas sustancias modifica apreciablemente el flujo total de Na⁺ o el flujo de Na⁺ resistente a la ouabaina.

Efecto del AMPc y de AVP + AMPc sobre la bomba de Na⁺, K⁺

Dado que se ha demostrado que los eritrocitos humanos son capaces de incorporar AMPc exógeno en cantidades superiores a las requeridas para saturar protein-quinasa AMPc dependientes¹⁸, hemos investigado si la AVP podría modificar la actividad de la bomba de Na⁺, K⁺ en condiciones en que estuviera aumentado el contenido intraeritrocitario de AMPc. En la figura 2 se observa que no se modifica el flujo de Na⁺ sensible a la ouabaina de eritrocitos incubados en presencia de AMPc 2 mM. Por otra parte, el AMPc no incrementa apreciablemente el flujo de Na⁺ extruido por la bomba de Na⁺, K⁺ de células incubadas en presencia de AVP.

Tabla I. Efecto de la AVP (10⁻¹⁰M) sobre los flujos de Na⁺ de eritrocitos humanos frescos

Condición	Flujo total	Flujo sensible a la ouabaina	Flujo resistente a la ouabaina
Control	2.290 ± 140	1.710 ± 50	580 ± 135
AVP	2.270 ± 195	1.530 ± 60	700 ± 200

Todos los resultados se expresan como M ± EEM (N = 6). Los valores de los flujos se dan en mmoles. 1t⁻¹células. h⁻¹. Contenido intraeritrocitario de Na⁺: 7,70 ± 0,71 mmoles. 1t⁻¹células. Contenido intraeritrocitario de K⁺: 82,29 ± 1,48.

Tabla II. Efecto de los derivados de la AVP sobre los flujos de Na⁺ de eritrocitos humanos frescos

Condición	Flujo total	Flujo sensible a la ouabaina	Flujo resistente a la ouabaina
Control	1.845 ± 45	1.565 ± 50	280 ± 25
LVP 10 ⁻¹⁰ M	1.875 ± 40	1.605 ± 55	265 ± 20
aAVP 10 ⁻¹⁰ M	1.845 ± 35	1.570 ± 40	275 ± 35

LVP = lisina vasopresina aAVP = Asu^{1,6}, Arg⁸-vasopresina. Los valores de los flujos se dan en mmoles. 1t⁻¹células. h⁻¹. Todos los resultados se expresan como M ± EEM (N = 4). Contenido intraeritrocitario de Na⁺ = 6,64 ± 0,13 mmoles. 1t⁻¹células. Contenido intraeritrocitario de K⁺ = 91,50 ± 0,25 mmoles. 1t⁻¹células.

Efecto del Ca²⁺ y de AVP + Ca²⁺ sobre la bomba de Na⁺, K⁺

Hemos investigado si el aumento del contenido intraeritrocitario de Ca²⁺ modificaría el efecto de la AVP sobre la bomba de Na⁺, K⁺. En la figura 3 se observa que el flujo de Na⁺ catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺ no se modifica cuando hay Ca²⁺ en el medio extracelular. Tampoco se modifica cuando, añadiendo A₂₃₁₈₇, aumenta, presumiblemente, el Ca²⁺ intraeritrocitario. La misma figura muestra que el aumento del Ca²⁺ celular no varía el comportamiento de la bomba de Na⁺, K⁺ en presencia de AVP.

Efecto de la AVP sobre el volumen eritrocitario

Con el fin de evaluar si la AVP modifica la permeabilidad para el agua de la membrana eritrocitaria, hemos analizado el comportamiento del volumen eritrocitario en presencia de AVP 10⁻¹⁰M. Como muestra la figura 4, a lo largo de dos horas de incubación no se observan variaciones en el volumen de los eritrocitos incubados con AVP.

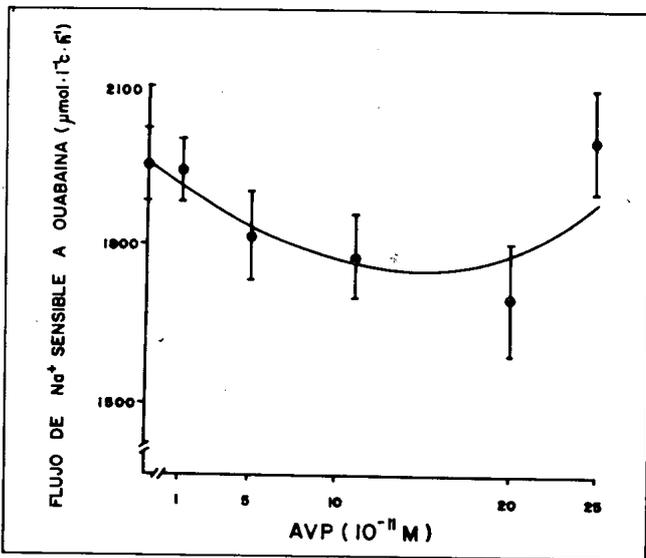


Fig. 1.—Curva dosis-respuesta del efecto de la AVP sobre el flujo de Na⁺ sensible a la ouabaina catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺.

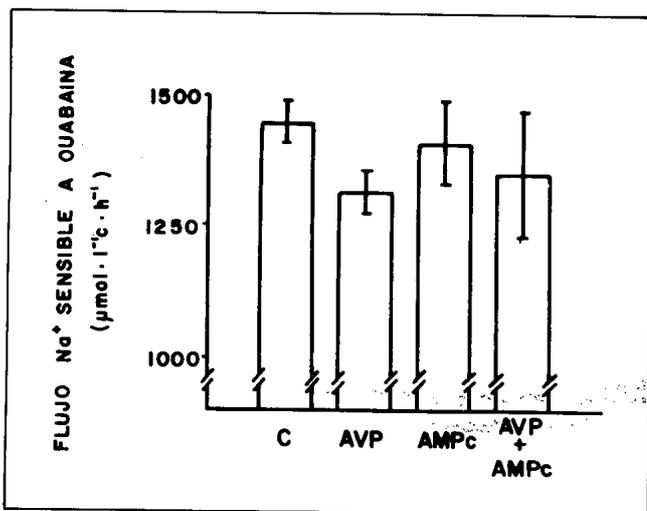


Fig. 2.—Histogramas correspondientes al efecto de la AVP 10⁻¹⁰M y el AMPc 2 mM sobre el flujo de Na⁺ sensible a la ouabaina catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺. (Barras = Error estándar de la media de cuatro experimentos.)

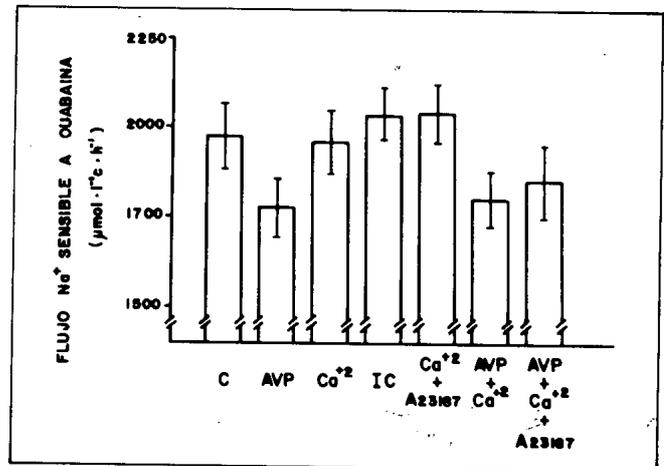


Fig. 3.—Histogramas correspondientes al efecto de la AVP 10⁻¹⁰M, el Cl₂Ca 1 mM y el ionóforo del Ca²⁺, IC, (A₂₃₁₈₇) sobre el flujo de Na⁺ sensible a la ouabaina catalizado por la bomba de Na⁺, K⁺. (Barras = Error estándar de la media de cuatro experimentos.)

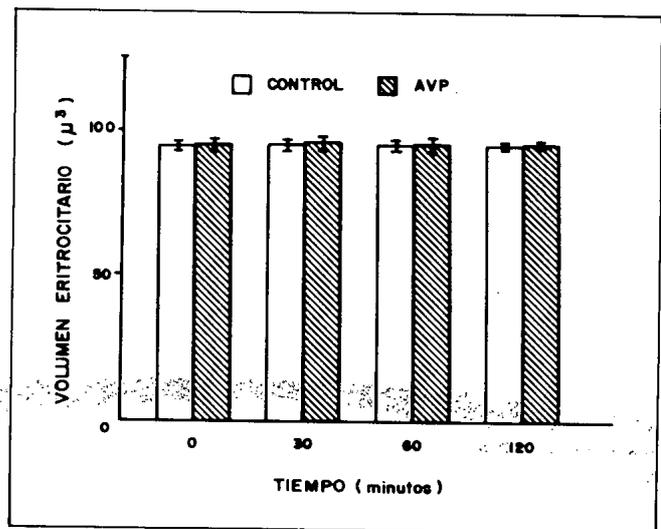


Fig. 4.—Histogramas correspondientes al comportamiento del volumen eritrocitario según el tiempo de incubación y la presencia o ausencia de AVP 10⁻¹⁰M. (Barras = Error estándar de la media de dos experimentos.)

Discusión

En los últimos años se ha evidenciado que los eritrocitos de distintas especies animales, incluyendo los eritrocitos humanos, contienen sistemas de transporte iónico que desde el punto de vista del funcionamiento cinético se pueden asemejar a los sistemas de transporte iónico existentes en los epitelios¹¹. Además, se ha demostrado que la actividad de los sistemas de transporte de Na⁺ del eritrocito humano puede ser modulada por hormonas que actúan a través del AMP^{12, 13}. Por todo ello parece interesante utilizar el eritrocito humano como modelo celular para el

estudio de los efectos de distintas hormonas sobre el transporte transmembranario de Na⁺.

Aunque se admite que la AVP u hormona antidiurética puede influenciar directamente el transporte tubular de Na⁺, no existe unanimidad en cuanto a los efectos experimentales observados (véase referencia 1 para revisión). En lo concerniente al efecto de la AVP sobre la actividad hidrolítica de la bomba de Na⁺, K⁺ de células tubulares renales, unos autores observan estimulación⁹ y otros inhibición¹⁰. Dado que en un trabajo previo de nuestro laboratorio hemos observado que el efecto de la AVP sobre el co-transporte Na⁺, K⁺, Cl⁻ del eritrocito era similar

al observado por Hebert y cols. sobre el cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- de células de la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle⁵, hemos planteado este trabajo con el fin de estudiar si la AVP ejerce algún efecto sobre la actividad transportadora de la bomba de Na^+ , K^+ eritrocitaria y si existe alguna relación entre lo observado a nivel del eritrocito y lo reportado a nivel renal.

El resultado principal aquí presentado es que la AVP, a concentraciones idénticas a las que estimula la actividad del cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- eritrocitario¹⁹ y renal⁵, no modifica significativamente la actividad transportadora de Na^+ de la bomba de Na^+ , K^+ eritrocitaria. Esta observación discrepa de otras publicadas en preparaciones celulares renales y en las que se demuestra un efecto estimulador⁹ o inhibitorio¹⁰. Sin embargo, nuestro trabajo analizaba la actividad transportadora de la bomba, mientras que los trabajos reseñados analizaban la actividad hidrolítica^{9, 10}. Aunque se admite actualmente que las condiciones experimentales pueden alterar el acoplamiento entre actividad transportadora y actividad hidrolítica que la bomba presenta en condiciones fisiológicas²⁰, otros trabajos recientes de nuestro laboratorio muestran que la AVP 10^{-10}M no modifica significativamente la actividad hidrolítica máxima de la Na^+ , K^+ -ATPasa medida en preparaciones solubles de membranas de eritrocitos humanos²¹. Por lo tanto, y a diferencia de lo observado en otros modelos celulares, la AVP no modifica directamente la actividad de la bomba de Na^+ , K^+ eritrocitaria.

Es un hecho bien comprobado que muchos de los efectos celulares de la AVP están mediados por un mecanismo adenil ciclasa-AMPC dependiente^{1,2}. Además, se ha descrito que algunos de los efectos de la AVP pueden estar mediados por un aumento del Ca^{2+} libre citosólico²². Por otra parte, se ha demostrado que tanto el AMPC^{23, 24} como el Ca^{2+} ²⁵ pueden modificar la actividad de la bomba de Na^+ , K^+ en distintos tejidos. Por todo ello, y con el fin de precisar si la ausencia de un efecto de la AVP sobre la bomba de Na^+ , K^+ del eritrocito podría deberse a la ausencia de adecuadas concentraciones intracelulares de AMPC y de Ca^{2+} , hemos analizado el efecto de la hormona sobre la bomba en condiciones en las que ambos compuestos se deberían hallar en concentraciones elevadas en el eritrocito. Tampoco en estas nuevas condiciones es capaz la AVP de modificar significativamente la actividad transportadora de la bomba de Na^+ , K^+ eritrocitaria. Quizá ello pueda estar en relación con que, como muestran nuestros resultados, la bomba de Na^+ , K^+ eritrocitaria no parece ser sensible ni al AMPC ni al Ca^{2+} en las condiciones experimentales utilizadas.

La AVP aumenta la permeabilidad para el agua de las células del túbulo colector, con el resultado de un

aumento transitorio en el contenido de agua y en el volumen de dichas células¹. Por otra parte, es bien sabido que la función fundamental de la bomba de Na^+ , K^+ consiste en la regulación del volumen celular²⁶, de tal manera que la actividad transportadora de la bomba aumenta al aumentar el volumen celular y viceversa²⁶. Dado que la AVP no modifica el transporte total de Na^+ del eritrocito ni su volumen, cabe suponer que tampoco modifica su contenido en agua. Por lo tanto, se puede asumir que en presencia de AVP no se pueden observar cambios en la actividad de la bomba de Na^+ , K^+ eritrocitaria inducidos por variaciones previas en el contenido celular de agua.

Así, pues, de los resultados presentados en este trabajo se puede concluir que la AVP no modifica, directa ni indirectamente, la actividad de la bomba de Na^+ , K^+ de eritrocitos frescos. Este resultado no excluye que la hormona pueda influenciar el comportamiento cinético de la bomba. Para evaluar dicha posibilidad deberían efectuarse estudios con eritrocitos pretratados para modificar su contenido de Na^+ y observar el efecto de la AVP sobre la respuesta de la bomba a cambios en la concentración basal de Na^+ . En cualquier caso, las observaciones que se presentan, en conjunción con otras previamente publicadas¹⁹, sugieren que la bomba de Na^+ , K^+ no parece ser el mecanismo de transporte diana para un efecto directo de la AVP. Por el contrario, dicho mecanismo parece ser el cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- ¹⁹. Esta consideración se corresponde bien con las observaciones realizadas en la porción gruesa de la rama ascendente del asa de Henle^{5, 27, 28}. En efecto, los resultados publicados con dicho modelo celular permiten establecer que la AVP, estimulando directamente el cotransporte Na^+ , K^+ , Cl^- del lado luminal, favorecería la reabsorción de Na^+ y el consiguiente aumento del contenido intracelular de Na^+ . Entonces, y de manera indirecta, se activaría la bomba de Na^+ , K^+ del lado baso-lateral que extruiría Na^+ hacia el intersticio y la circulación capilar peritubular. El resultado final de dichas acciones de la AVP sobre la excreción renal de Na^+ no puede dejar de analizarse teniendo presente que la AVP promueve la síntesis intrarrenal de sustancias como las prostaglandinas, cuyos efectos sobre los mecanismos de transporte del lado luminal de las células de la rama ascendente del asa de Henle pueden ser opuestos a los descritos para la AVP²⁹.

Agradecimiento

Los autores quieren dejar constancia de su agradecimiento a doña Carmen Miqueo, sin cuya ayuda técnica este trabajo no habría sido posible.

Bibliografía

1. Kelleher SP, Berl T y Schrier RW: En *Renal Endocrinology* p. 224. Ed. por MJ Dunn. Williams & Wilkins. Baltimore, 1983.
2. Grantham JJ y Burg MB: Effect of vasopressin and cyclic AMP on permeability of isolated collecting tubules. *Am J Physiol* 211:255-259, 1966.
3. Hall DA y Verney DM: Effect of vasopressin on electrical potential difference and chloride transport in mouse medullary thick ascending limb of Henle's loop. *J Clin Invest* 66:797-802, 1980.
4. Sasaki S e Imai M: Effects of vasopressin on water and NaCl transport across the in vitro perfused medullary thick ascending limb of Henle's loop of mouse, rat, and rabbit kidneys. *Pflugers Archiv* 383:215-221, 1980.
5. Hebert SC, Culpepper RM y Andreoli TE: NaCl transport in mouse medullary thick ascending limb. I: Functional nephron heterogeneity and ADH-stimulated NaCl cotransport. *Am J Physiol* 241:F412-F431, 1981.
6. Frindt G y Burg MB: Effect of vasopressin on sodium transport in renal cortical collecting tubules. *Kidney Int* 1:224-232, 1972.
7. Arruda JL, Stipanuk S y Walter R: Effect of vasopressin on sodium excretion and plasma phosphate concentration. *Proc Soc, Exp Biol Med* 155:308-313, 1977.
8. Chan WY: Effects of prolonged administration of vasopressin on plasma sodium and on renal excretion of electrolytes and water. *J Pharmacol Exp Ther* 178:141-149, 1971.
9. Pippard C y Bayliss PH: The stimulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity in the medulla of the rat kidney by arginine vasopressin and its analogues. *Clin Sci* 66:561-567, 1984.
10. Opava-Stitzer S, Rodríguez-Sargent C, Cangiano JL y Martínez Maldonado M: Effect of antidiuretic hormone (ADH) on renal Na⁺, K⁺-ATPase activity in the diabetes insipidus (DI) rat kidney. *Kidney Int* 25:312, 1984.
11. Palfrey HC 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.
12. Garay R, Díez J, Verna R, Nazaret C y Braquet P: En *Peptide hormones, biomembranes, and cell growth*, p. 89. Ed. por L Bolis, R Verna, L Frati. Plenum. New York, 1984.
13. Garay RP, Díez J y Braquet P: Are icosanoids involved in ion transport regulation? I. A study in human red blood cells. *Adv Ion Transport Regulation* 1:786-792, 1984.
14. Garay RP, Price M, Hannaert P y Nazaret C: En *Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions*, p. 645. Ed. por G Spach. Elsevier. Amsterdam, 1983.
15. Glynn I y Karlsh S: The sodium pump. *Ann Rev Physiol* 37:13-55, 1975.
16. Cusi D y Garay RP: The effect of tienilic acid on Na⁺ and K⁺ transport in human red cells. *Mole Pharmacol* 19:438-443, 1981.
17. Garay RP, Nazaret C, Díez 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.
18. Garay RP: Inhibition of the Na⁺/K⁺ cotransport system by cyclic AMP and intracellular Ca²⁺ in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 688:786-792.
19. Díez J, Miqueo C, Arrázola A y Varela JI: Stimulation of the Na⁺, K⁺-cotransport system by arginine vasopressin in human red cells. *Re Pept suppl* 4:23-25, 1985.
20. Kaplan JH: Sodium ions and the sodium pump: transport and enzymatic activity. *Am J Physiol* 245:G327-G333, 1983.
21. Arrázola A y Díez J: Estudio del efecto de la arginina vasopresina sobre la actividad hidrolítica de la Na⁺, K⁺-ATPasa de la membrana del eritrocito humano. *Rev Esp Fisiol* (enviado para publicación).
22. Berridge MJ e Irvine RF: Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321, 1984.
23. Díez J, Braquet P, Verna R, Nazaret C y Garay RP: The effect of cyclic AMP on Na⁺ and K⁺ transport systems in mouse macrophages. *Experientia* 41:666-667, 1985.
24. Verna R, Braquet P, Díez J y Garay RP: En *Peptide hormones, biomembranes and cell growth*, p 51. Ed. por L Bolis, R Verna, L Frati. Plenum, 1984.
25. Sarkadi B, Szász I, Gerlóczy A y Gárdos G: Transport parameters and stoichiometry of active calcium ion extrusion in intact human red cells. *Biochim Biophys Acta* 464:93-107, 1977.
26. Sarkadi B y Tosteson DC: En *Membrane Transport in Biology*, p 117. Ed por G Gievisch, DC Tosteson, HH Ussing. Springer Verlag. Berlín, 1979.
27. Hebert SC, Culpepper RM y Andreoli TE: NaCl transport in mouse medullary thick ascending limb. II. ADH enhancement of transcellular NaCl cotransport; origin of transepithelial voltage. *Am J Physiol* 241:F432-F442, 1981.
28. Hebert SC, Culpepper RM y Andreoli TE: NaCl transport in mouse medullary thick ascending limb. III: Modulation of the ADH effect by peritubular osmolality. *Am J Physiol* 241:F443-F451, 1981.
29. Dunn MJ: En *Renal Endocrinology*, p 1. Ed por MJ Dunn. Williams & Willkins. Baltimore, 1983.