

## Fisiopatología del daño neuronal postisquémico I: cambios de volumen neuronal secundarios a la inhibición de la bomba de sodio

F. Javier Alvarez-Leefmans<sup>1,2</sup>, Sergio Márquez Gamiño<sup>1,3</sup>, Luis Reuss<sup>3</sup>

### Summary

Cell volume maintenance is generally believed to be achieved by net ion efflux mediated by the Na<sup>+</sup> pump, which balances the higher intracellular colloid-osmotic pressure resulting from impermeant intracellular anions. Hence, pump inhibition in neurons (eg. secondary to ATP depletion resulting from ischemia or trauma) should result in net solute and water entry and cell swelling. To test this hypothesis we used electrophysiologic techniques to measure changes in membrane voltage and cell water volume during Na<sup>+</sup> pump inhibition in identified neurons from subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. In 21 neurons studied, upon inhibition of the pump by sustained exposure to 1 mM ouabain, most neurons shrank by  $6.5 \pm 0.7\%$  ( $\bar{X} \pm S.E.$ ,  $n = 14$ ). In 5 of these cells, shrinkage was preceded by a short-lived swelling phase, at a rate of  $\geq 20\%/min$ . In the 9 cells that shrank without swelling phase, the shrinkage ensued  $1.9 \pm 0.4$  min. after the onset of ouabain action (signalled by the start of ouabain induced membrane depolarization) and persisted for at least 10 min. In 2 out of the 21 cells we observed only the transient increase in cell volume. In other 5 cells, ouabain had no measurable effect on cell water volume. The data suggest that while the pump may be necessary for cell volume maintenance, nerve cells may be endowed with ouabain-insensitive mechanisms of volume control, whose activation following Na<sup>+</sup> pump inhibition prevents them from short-term swelling and lysis.

### Resumen

Se acepta que el mantenimiento del volumen celular se debe a la operación de la bomba de Na<sup>+</sup>. Esta contrarresta el gradiente de presión coloidosmótica resultante de la presencia de aniones protéicos intracelulares, que no permean a través de la membrana plasmática. La anoxia del tejido nervioso (vg.: en procesos isquémicos) se acompaña de una rápida disminución en el contenido celular de ATP, que resulta en la inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup>. Se ha postulado que la inhibición de esta última produce edema y eventual lisis celular. Para evaluar esta hipótesis utilizamos una técnica electrofisiológica que mide simultáneamente cambios en el volumen celular y en el potencial de membrana, durante la inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup>, en neuronas identificadas de *Helix aspersa*. Se estudió el efecto de la inhibición de la bomba de Na<sup>+</sup> con uabaina (1 mM) sobre el volumen celular en 21 neuronas. La mayoría de éstas respondieron con una disminución del  $6.5 \pm 0.7\%$  ( $\bar{X} \pm E.E.$ ,  $n = 14$ ) de su volumen inicial. En 5 de estas células, la disminución del volumen fue precedida por un incremento transitorio y rápido ( $\geq 20\%/min$ ) del mismo. En las otras 9 células el encogimiento ocurrió  $1.9 \pm 0.4$  min. después del inicio de la acción de la uabaina (inferido a partir de la despolarización inicial de la membrana). En 2 de las 21 células estudiadas, se observó el incremento inicial del volumen celular, pero éste únicamente retornó a su valor inicial sin presentarse el encogimiento de la célula. En otras 5 células no se detectaron cambios de volumen, sin embargo, esto no se debió a falta de resolución de la técnica. Los resultados sugieren que las neuronas son capaces de regular su volumen aun cuando la bomba de Na<sup>+</sup> esté inhibida. Esto sugiere que además de la bomba de Na<sup>+</sup>, las neuronas, cuentan con otros mecanismos, que en ciertas condiciones patológicas (vg.: anoxia postisquémica) previenen el edema y la lisis celular.

<sup>1</sup> Departamento de Neurobiología de la División de Neurociencias. Instituto Mexicano de Psiquiatría, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México, D. F.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV del IPN, Apartado Postal 14-740, 07000 México, D. F.

<sup>3</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Texas, Medical Branch, Galveston, Texas 77550, USA.

## Introducción

Es bien sabido que las células nerviosas requieren del aporte continuo de glucosa y oxígeno para mantener normal el funcionamiento cerebral. La hipoglicemia o todo proceso que conduzca a la anoxia del tejido nervioso, como la isquemia secundaria a trombosis y embolias cerebrales, produce depleción de ATP celular, la principal fuente energética neuronal. Se sabe que la depleción de ATP celular produce inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$ . Esta última es una enzima que se encuentra localizada en la membrana plasmática y que expulsa de las células iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) a la vez que introduce a las mismas iones de potasio ( $\text{K}^+$ ), utilizando para ello la energía derivada de la hidrólisis de ATP. Esta enzima es el principal dispositivo de expulsión de  $\text{Na}^+$  con el que cuentan las células y se cree que constituye el mecanismo mediante el cual éstas mantienen su osmolaridad y su volumen constantes en condiciones fisiológicas<sup>4,5,6</sup>. Ya que el  $\text{Na}^+$  se encuentra más concentrado en el exterior que en el interior celular y que este último es eléctricamente negativo con respecto al primero, el gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  está dirigido hacia dentro de las células, lo cual explica la tendencia de este catión a entrar a las mismas. Dado que la membrana plasmática es permeable al  $\text{Na}^+$ , cuando se inhibe la bomba que lo expulsa, sea en condiciones patológicas (vg.: anoxia postisquémica) o experimentales (vg.: con glucósidos cardíacos como la uabaína), este catión entra a las células impelido por su gradiente electroquímico y por la presión coloidosmótica que ejercen los aniones no difusibles intracelulares. Esto trae como consecuencia la acumulación de  $\text{Na}^+$  en el interior celular lo que, de acuerdo con las ideas comúnmente aceptadas, produce un imbalance osmótico a través de la membrana plasmática, que culmina con el edema y aun la lisis celular (Figs. 1 y 2). Esta secuencia de hechos derivada de una hipótesis propuesta hace tiempo por Tosteson y Hoffman<sup>5,6</sup>, se acepta ampliamente como uno de los mecanismos de producción de daño neuronal subsecuente a hipoglicemia o anoxia<sup>3</sup>. Desafortunadamente la evidencia que sustenta a dicha hipótesis y el involucramiento de la misma en la fisiopatología de dichas entidades nosológicas es hasta ahora débil, fragmentaria e incompleta (*vide infra*).

Para avanzar en el conocimiento de la patogénesis del supuesto edema citotóxico, considerado como preludio al daño neuronal irreversible, es indispensable dilucidar los mecanismos celulares responsables de mantener y regular el volumen de

las neuronas en condiciones fisiológicas así como las consecuencias de su disrupción en condiciones patológicas. A pesar de que se acepta universalmente que la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  produce edema celular, no existe evidencia directa que sustente esta suposición. Más aún, a pesar de su importancia, se desconocen la magnitud y sentido de los cambios en el volumen celular que ocurren en neuronas como resultado de la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$ , así como los movimientos transmembranales de solutos osmóticamente activos que les subyacen.

En el presente trabajo usamos una novedosa técnica para estudiar los cambios de volumen celular acuoso, en neuronas aisladas, en respuesta a la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  por medios farmacológicos. Además, se estudiaron los flujos de iones que ocurren a través de la membrana plasmática y que subyacen a dichos cambios del volumen neuronal. Las técnicas empleadas en éste y en los trabajos siguientes, nos han permitido evaluar críticamente la hipótesis de Tosteson y Hoffman<sup>5,6</sup> que, aunque originalmente propuesta para el caso particular de los eritrocitos, ha sido generalizada y adoptada *a priori* para explicar cómo las células animales mantienen su volumen constante en condiciones fisiológicas y cómo éste se altera cuando se inhibe la bomba de  $\text{Na}^+$ .

Nuestros resultados muestran que, contrario a lo predicho por la hipótesis de Tosteson y Hoffman<sup>5,6</sup>, las neuronas responden principalmente con una disminución de su volumen cuando se les inhibe la bomba de  $\text{Na}^+$ . En ocasiones, esta disminución del volumen celular es precedida por un incremento rápido y transitorio del mismo. Estos hallazgos sugieren que además de la bomba de  $\text{Na}^+$ , las neuronas están dotadas de mecanismos que les permiten regular y mantener su volumen constante. Uno de estos mecanismos parece ser un canal de  $\text{K}^+$  que se activa por un incremento en la concentración de calcio ionizado intracelular,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , secundario a la acumulación de  $\text{Na}^+$  que resulta de la inhibición de la bomba, como se verá en los dos trabajos que siguen a éste. Postulamos que el daño celular consecuencia de la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$ , probablemente resulta más de la acumulación de calcio ionizado en el interior celular que de cambios en el volumen celular.

## Fundamentos teóricos

La membrana plasmática es permeable al agua y a pequeños iones como el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ . Además, las

células contienen aniones protéicos que no permean la membrana pero que ejercen un gradiente de presión coloidosmótica dirigido hacia el interior celular. En la figura 1 se ilustra cómo se genera un gradiente de presión coloidosmótica entre dos compartimientos separados por una membrana semi-permeable, uno de los cuales contiene aniones no difusibles.

En las células animales, cuya membrana es distensible, si los iones se distribuyesen siguiendo el equilibrio de Gibbs-Donnan, el gradiente de presión coloidosmótica resultante produciría un incremento de volumen y eventual lisis celular. Tosteson

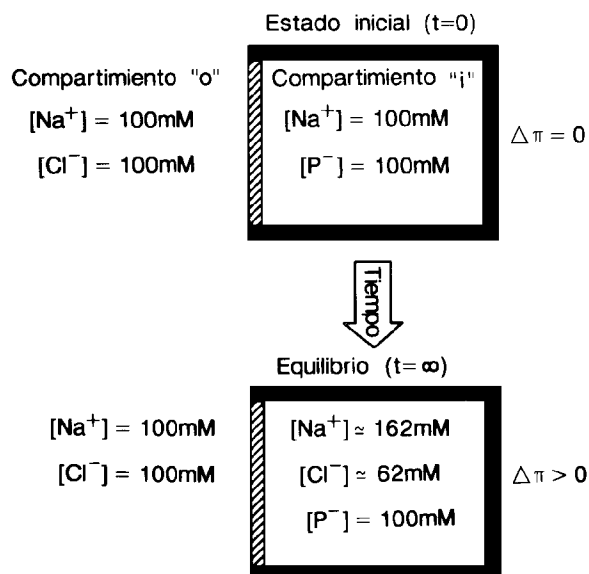
y Hoffman<sup>5,6</sup> postularon que este edema celular coloidosmótico se previene normalmente por la acción de la bomba de  $\text{Na}^+$ , la cual, por cada ciclo, expulsa 3  $\text{Na}^+$  a la vez que introduce 2  $\text{K}^+$ , generando así la salida neta de una partícula osmóticamente activa, manteniendo el balance osmótico celular. Una de las predicciones de esta hipótesis es que la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  conduce al edema celular a consecuencia de la entrada neta de  $\text{Na}^+$  y agua a la célula (Fig. 2).

## Métodos

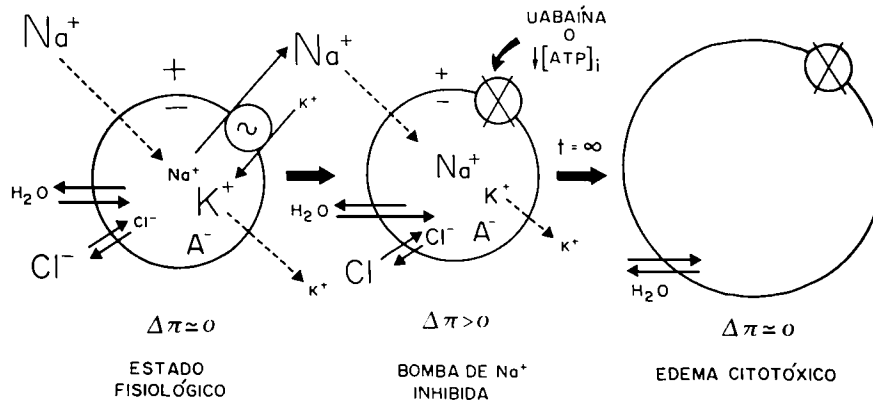
Se utilizaron neuronas identificadas del ganglio subesofágico de *Helix aspersa*, ya que por su tamaño permiten realizar experimentos electrofisiológicos que resultarían, hasta ahora, técnicamente imposibles en neuronas de vertebrados. Estas células son un modelo idóneo pues en ellas se encuentran los mismos sistemas de transporte de iones presentes en neuronas de vertebrados incluyendo las humanas. El ganglio aislado se sumergió en una cámara (volumen = 0.5–0.8 ml) en donde se perfundió a una tasa de 5 ml/min con una solución salina de la siguiente composición (en mM): NaCl 82.5; KCl, 4;  $\text{CaCl}_2$ , 7;  $\text{MgCl}_2$ , 5; HEPES, 5; glucosa, 5; pH 7.5. Para inhibir a la bomba de  $\text{Na}^+$  se añadió uabaina (1mM) a la solución anterior.

Se adaptó una técnica electrofisiológica para medir simultáneamente cambios en el potencial de membrana ( $E_m$ ) y en el volumen celular ( $V$ ) de neuronas individuales<sup>1</sup>. La técnica permite medir de manera continua cambios de volumen celular menores del 5%. Su fundamento se ilustra en la figura 3. Esencialmente consiste en introducir a las células un marcador del volumen acuoso intracelular. Una vez introducido, el marcador debe permanecer en el espacio intracelular, sin salirse de la célula o metabolizarse por la misma, de tal manera que midiendo su concentración, es posible calcular el volumen acuoso celular.

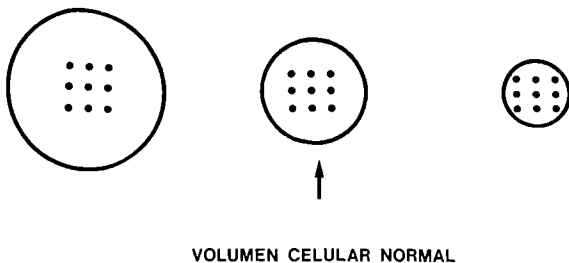
Se utilizó tetrametilamonio ( $\text{TMA}^+$ ) como marcador del volumen de agua intracelular. Las células se cargaron hasta obtener una concentración final de  $\text{TMA}^+$  de  $6.2 \pm 2.7$  mM ( $\bar{X} \pm \text{E.E.}$ ,  $n = 21$ ), exponiéndolas a una solución Ringer en la cual el  $\text{Na}^+$  se sustituyó por  $\text{TMA}^+$ . Se encontró que una vez que el  $\text{TMA}^+$  entraba a las células, quedaba virtualmente atrapado dentro de las mismas. En los experimentos aquí reportados, la salida neta de  $\text{TMA}^+$  una vez que la preparación era perfundida nuevamente con Ringer normal fue menor de 0.5



**Figura 1.** Generación de un gradiente de presión coloidosmótica en un sistema físico comprendido por una membrana semi-permeable rígida que separa dos compartimientos: el "i", que está cerrado a la atmósfera y el "o" que está abierto a la misma. Las paredes del compartimiento "i", al igual que la membrana, son rígidas. La membrana es permeable al agua y a pequeños iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), pero impermeable a aniones protéicos ( $\text{P}^-$ ). En la parte superior de la figura se ilustran las condiciones iniciales del experimento: al tiempo  $t = 0$  se añade una solución acuosa de NaCl al compartimiento "o" y una solución hecha de la sal sódica de una proteína (proteinato de  $\text{Na}^+$ ) al compartimiento "i". Las concentraciones en mmoles/l, son iguales en ambos compartimientos, de modo que no existe diferencia de presión osmótica entre ellos, es decir  $\Delta\pi = 0$ . Conforme transcurre el tiempo, el agua y los iones a los que la membrana es permeable, difunden hasta alcanzar el estado de equilibrio (al tiempo  $t = \infty$ ), el cual se ilustra en el diagrama inferior. Este estado de equilibrio es el predicho por la teoría de Gibbs-Donnan. Nótese que en el estado de equilibrio, las concentraciones iónicas entre los dos compartimientos difieren de tal manera que:  $[\text{Na}^+]_i > [\text{Na}^+]_o$  y  $[\text{Cl}^-]_i < [\text{Cl}^-]_o$ ; además la concentración total de iones es mayor en "i", de modo que ahora existe una diferencia de presión osmótica ( $\Delta\pi > 0$ ) entre los dos compartimientos. Si la membrana y las paredes del compartimiento "i" fuesen distensibles, como la membrana plasmática de las células animales, entonces el volumen del compartimiento "i" aumentaría.



**Figura 2.** Mantenimiento del volumen celular mediante la operación de la bomba de  $\text{Na}^+$  y su disrupción por inhibición de la misma: hipótesis de Tosteson y Hoffman. En los esquemas, los vectores representan los flujos de iones a través de la membrana, generados tanto por la operación de la bomba de  $\text{Na}^+$  como por electrodifusión. Cada esfera representa diferentes estados de una misma célula. Según la hipótesis de Tosteson y Hoffman<sup>5,6</sup> el equilibrio osmótico de la célula se debe a la operación de la bomba de  $\text{Na}^+$  que expulsa dicho catión a una tasa igual a la que éste entra a la célula. Cuando se inhibe la bomba de  $\text{Na}^+$ , indicado por el diagrama del centro, ya sea por la acción directa de la uabaína o por disminución de la concentración intracelular de ATP, se altera el equilibrio osmótico de la célula ( $\Delta\pi > 0$ ) produciéndose un influjo neto de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua. Dado que la membrana plasmática es distensible, estos movimientos de agua e iones culminan con un nuevo estado de equilibrio osmótico en donde el gradiente de presión osmótica a través de la membrana ( $\Delta\pi$ ) vuelve a ser aproximadamente de cero, a expensas de un aumento del volumen celular (edema citotóxico).



**Figura 3.** Principio de la técnica electrofisiológica para medir el volumen celular<sup>1</sup>. Los círculos representan una célula que contiene una cantidad de marcador ( $Q_m$ ), en este caso 9 partículas del mismo, que permanece constante en el citosol, independientemente de cambios en el volumen celular. Esta condición es requerimiento esencial para usar una sustancia como marcador del volumen de un compartimiento acuoso. El volumen de agua intracelular ( $V$ ) está relacionado con la concentración del marcador  $C_m$  (moles/l) de acuerdo con la ecuación  $V = Q_m/C_m$ . Dado que  $Q_m$  m (moles) es constante, los cambios de volumen celular pueden inferirse midiendo  $C_m$ , de tal manera que un incremento en  $V$  corresponde a una disminución en  $C_m$  y viceversa. Usando tetrametilamonio ( $\text{TMA}^+$ ) como marcador intracelular, los cambios relativos del volumen de agua celular con respecto al tiempo ( $V_t/V_0$ ), se calculan de acuerdo con la ecuación:

$$V_t/V_0 = [\text{TMA}^+]_0/[\text{TMA}^+]_t$$

donde:  $V_0$  = volumen celular acuoso inicial ( $t = 0$ );  $V_t$  = volumen celular acuoso al tiempo  $t$ ;  $[\text{TMA}^+]_0$  = concentración intracelular inicial de  $\text{TMA}^+$  ( $t = 0$ ) y  $[\text{TMA}^+]_t$  = concentración intracelular de  $\text{TMA}^+$  al tiempo  $t$ .

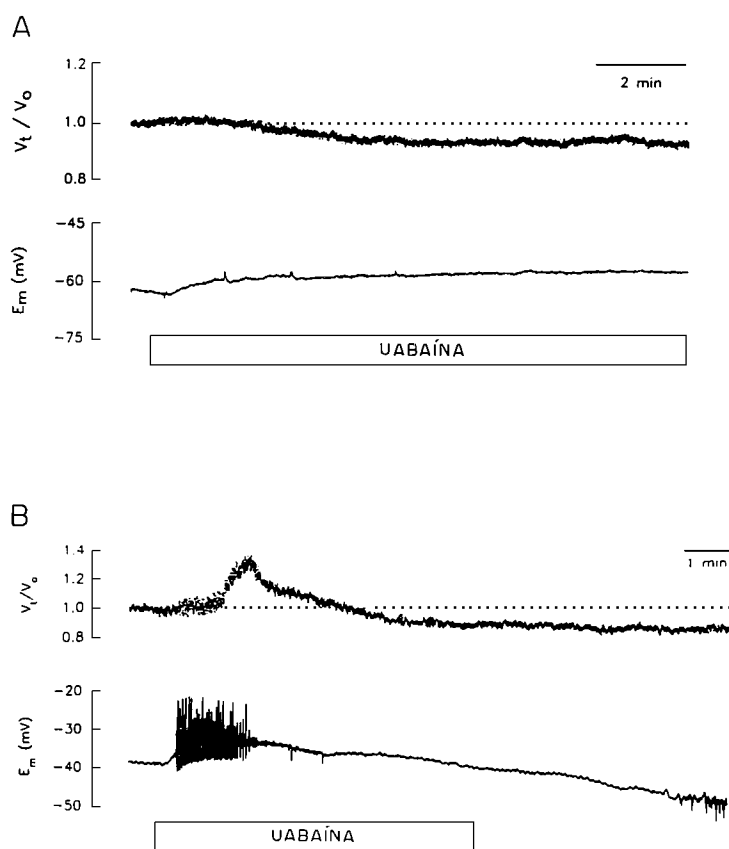
mM/hr. La concentración intracelular de tetrametilamonio,  $[\text{TMA}^+]_i$ , se midió con microelectrodos dobles, cuyas puntas tenían diámetros menores de  $1 \mu\text{M}$ , conteniendo una resina de intercambio iónico sensible al  $\text{TMA}^+$ . Un incremento del volumen celular acuoso ( $V$ ) se reflejó en una disminución de la  $[\text{TMA}^+]_i$  y viceversa<sup>1</sup>.

## Resultados

Se estudió el efecto de la inhibición sostenida de la bomba de  $\text{Na}^+$  con uabaína ( $1 \text{ mM}$ ) sobre el volumen celular acuoso en 21 neuronas. Contrario a lo predicho por la hipótesis de Tosteson y Hoffman<sup>5,6</sup>, la mayoría de las neuronas respondieron con una disminución del  $6.5 \pm 0.7\%$  ( $\bar{X} \pm \text{E.E.}$ ,  $n = 14$ ) de su volumen inicial (Fig. 4A). En 5 de estas células, la disminución del volumen, fue precedida por un incremento transitorio y rápido ( $\geq 20\%/ \text{min}$ ) del mismo (Fig. 4B). En 2 de las 21 células estudiadas se observó el incremento inicial del volumen celular, pero éste únicamente retornó a su valor inicial sin presentarse el encogimiento de la célula. En todos los casos la uabaína produjo una despolarización de la membrana neuronal, como es de espe-

rarse ante la inhibición de una bomba de  $\text{Na}^+$  electrogénica. En las 9 células en las que la disminución de su volumen acuoso no fue precedida por una fase de aumento inicial del mismo, el encogimiento celular comenzó  $1.9 \pm 0.4$  min después de iniciada la acción de la uabaína. El inicio de la acción de esta última se tomó como el comienzo de la despolarización de la membrana. Las células permanecieron encogidas durante por lo menos 10 minutos después de iniciada la acción de la uabaína.

En 5 de las 21 células no se detectaron cambios en el volumen celular durante la inhibición sostenida (10–15 min.) de la bomba de  $\text{Na}^+$ . La ausencia de cambios de volumen no se debió a falta de resolución de la técnica pues la exposición de estas mismas neuronas a soluciones 4 y 12% hipoosmóticas con respecto a la solución control, provocó los esperados incrementos en el volumen celular.



**Figura 4.** Efecto de la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  sobre el volumen celular acuoso en dos neuronas (A y B). En cada bloque, el trazo superior es el registro del volumen celular relativo ( $V_t/V_o$ ) computado a partir de la ecuación descrita en el pie de la figura 3 y el trazo inferior es el registro simultáneo del potencial de membrana ( $E_m$ ). La barra horizontal indica el tiempo de aplicación de la uabaína (1 mM). En la parte A se muestra un ejemplo de los cambios, que con mayor frecuencia, se observaron. Nótese que el volumen celular relativo ( $V_t/V_o$ ) disminuyó durante la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$ . En la parte B la disminución del volumen celular relativo fue precedida por un incremento rápido pero transitorio del mismo. Nótese que en ambos ejemplos, la uabaína produjo una despolarización de la membrana ( $E_m$  se hizo más positivo). Esta despolarización se debe a la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$ , que en éstas, como en muchas otras células, es electrogénica. Nótese además que la reducción en V en la célula mostrada en B se acompañó de una hiperpolarización de la membrana ( $E_m$  se hizo más negativo).

## Discusión

Los resultados muestran que las neuronas responden principalmente con una disminución de su volumen cuando se inhibe la bomba de  $\text{Na}^+$ . En ocasiones esta disminución del volumen celular es precedida por un incremento rápido y transitorio del mismo (Fig. 4B). Este comportamiento es incompatible con la hipótesis de Tosteson y Hoffman<sup>4,5,6</sup> que predice que la inhibición de la bomba de  $\text{Na}^+$  conduce al edema y eventual lisis celular. Esto sugiere que las neuronas están dotadas de sistemas de mantenimiento del volumen celular que operan además de la bomba de  $\text{Na}^+$  y que el daño celular probablemente resulta más de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que de cambios en el volumen celular<sup>2</sup>.

La disminución del volumen celular cuando se inhibe la bomba de  $\text{Na}^+$  sugiere la activación de un mecanismo que permite la salida neta de partículas osmóticamente activas de la célula. Los registros de corrientes iónicas utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos muestran, como se verá en el trabajo de Altamirano y colaboradores en este mismo número, una corriente saliente, que parece ser mediada por  $\text{K}^+$  a través de canales selectivos a este catión, los cuales son activados por un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En experimentos que estamos realizando con técnicas ópticas hemos demostrado tal incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Como se verá en el trabajo de Merediz y colaboradores en este mismo número, es posible que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  aumente en el interior celular a consecuencia de un aumento en  $[\text{Na}^+]_i$  que en teoría invertiría al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que es un mecanismo de transporte que normalmente saca  $\text{Ca}^{2+}$  de las células.

En cuanto al incremento transitorio del volumen celular observado en algunas células, las medidas

realizadas en nuestro laboratorio con electrodos intracelulares selectivos al  $\text{Na}^+$  muestran que al inhibirse la bomba, este catión aumenta monotónicamente a una tasa inicial menor de 1 mM/min. Este incremento en  $[\text{Na}^+]_i$  es insuficiente para explicar el aumento transitorio en el volumen. Explicaciones posibles a este interesante hallazgo se discuten en el trabajo de Altamirano y colaboradores en este número.

## Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias a donativos otorgados a FJAL por el National Institute of Neurological Disorders and Stroke de los E.U.A. (GRANT NS29227), el John Sealy Memorial Endowment Fund de los E.U.A. (GRANT 2526-90) y CONACyT México, donativo P228CCOX891556. Los autores agradecen el magnífico apoyo técnico del Ing. José Rodolfo Fernández Calderón y del Sr. Sergio Márquez Baltazar así como los comentarios al manuscrito por el M. en C. Humberto Cruzblanca.

## REFERENCIAS

1. ALVAREZ-LEEFMANS FJ, GAMÍÑO SM, REUSS L: Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J Physiol*, Londres (en prensa).
2. CHOI DW: Cerebral hypoxia: Some new approaches and unanswered questions. *J Neurosci*, 10:2493-2501, 1990.
3. ROSENBERG GA: *Brain Fluids and Metabolism*. Oxford University Press, Nueva York, 1990.
4. STEIN WD: Channels, carriers, and pumps: An introduction to membrane transport. *Academic Press*, California, 1990.
5. TOSTESON DC, HOFFMAN JF: Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J Gen Physiol*, 44, 169-194, 1960.
6. TOSTESON DC: Regulation of cell volume by sodium and potassium transport. En: *The cellular functions of membrane transport*. Ed. Hoffman, J.F. pp. 3-22. Prentice Hall. Englewood Cliffs, Nueva Jersey, 1964.