



## NOTA HISTÓRICA

## ¿Réquiem por la ouabaína? ¡No!

### *Requiem for Ouabain? No!*

Hernando Ordóñez, MD.; Jorge H. Ordóñez, MD.

Bogotá, DC., Colombia

Aunque el título de este trabajo parece una utopía, en realidad no lo es; está plenamente justificado, en especial por lo que se verá en las publicaciones adelante citadas. Para comprobarlo hagamos un resumen sobre la historia de la ouabaína. La primera referencia que se conoce sobre este medicamento es el uso que los Inées, nativos de Gabón en África Occidental, le daban como veneno para sus flechas según lo narra Pélikan (70) quien, en 1865, estudió el «veneno cardíaco» extraído de la raíz del *Ouabolo* (*Strophantus gratus*). Años más tarde se hicieron otras publicaciones pertinentes, entre las que se cuentan las de Polaiillon (73), Frasser (37, 38), Arnaud (4-6), Vaquez (94), Stoll (87), Lopicque (51), Wiggers y Stimson (97), Scherlag y colaboradores (81), Kisch (47) y las de otros tantos que han dedicado sus escritos a este fármaco.

Durante muchos años se empleó tanto la ouabaína como el estrofanfo en la práctica médica; éstos eran de uso corriente y se encontraban en todas las droguerías y hospitales. No obstante, hace unos años empezaron a escasear de forma inexplicable, si bien después de investigar al respecto se supo que eran poco rentables.

### Aplicación terapéutica del estrofanfo en pacientes digitalizados

Se aceptaba que para pasar de preparaciones digitales a ouabaína o estrofanfo se debía esperar varios días (hasta 10) (66). Al caso un paciente en insuficiencia cardíaca desde hacía un año con manifestaciones de poca tolerancia a la digital a una dosis de 0,65 a 1 mg diarios. Como no toleraba la digital se indicó a la familia que comprara Estrofocid® ante la posibilidad de que sufriera un edema pulmonar agudo, el cual se presentó. La familia llamó de urgencia a un

colega, quien aplicó 0,25 mg de Estrofocid® intravenoso. Cuando llegué constaté que el paciente reaccionaba satisfactoriamente, por lo cual continué aplicándoselo durante un año a la dosis de 0,25 mg una o dos veces por semana. En esta historia clínica resumida e incompleta, pude apreciar dos fenómenos importantes: que se puede pasar de digitalina a estrofanfo si la dosis no es superior a 0,25 mg, y que en los casos con poca tolerancia a la digital, se puede aplicar estrofanfo por periodos prolongados, ya que es bien tolerado y muy efectivo.

### Tratamiento prolongado de la insuficiencia crónica

Sobre la experiencia en el tratamiento prolongado de la insuficiencia cardíaca crónica y severa con ouabaína, se presentó un trabajo en el Congreso Interamericano de Cardiología reunido en Lima en 1968 (67, 68). Se describió el tratamiento de 90 casos de insuficiencia crónica congestiva grado IV de la clasificación de la Asociación Cardiológica de Nueva York (NYHA), por periodos que variaron de 8 días a 5 años y 10 meses. La dosis diaria máxima empleada fue de 0,25 mg y la frecuencia varió de diaria a semanal. La respuesta terapéutica de estos pacientes fue excelente a pesar de ser clínicamente irreductibles. Sólo 9% de los pacientes no mostró mejoría. El efecto más sorprendente es la estabilización de la insuficiencia con una dosis semanal. El 90% de los pacientes se estabilizó con dosis cada dos días o más. El uso prolongado de ouabaína no fue nuevo y la emplearon otros autores tan eminentes como Fraenkel (35, 36), Clercl (23), Edens (33), Benhamou (12), Batterman (10, 11) y Chaves (22) entre otros.

### Historia

Durante más de 150 años de uso terapéutico los estudios científicos se centraron en los efectos terapéuticos y tóxicos, y se ignoró su acción fisiológica. El efecto inotrópico positivo de estos compuestos en el flujo

Correspondencia: Jorge H. Ordóñez, MD., correo electrónico: [jhordonez\\_smith@yahoo.com](mailto:jhordonez_smith@yahoo.com)

Recibido: 24/11/05. Aceptado: 08/03/06

coronario y en el miocardio, fueron descritos por Gilbert (39), en 1932, y por Cattell y Gold (21), en 1938, respectivamente. La orientación de la investigación dio un giro radical en 1953, después del descubrimiento de la acción bloqueadora, potente y específica de los glicósidos digitálicos sobre la bomba de sodio, hecho por Schalmann (80), y de la publicación del libro de Szent-Gyorgyi (90) *Chemical physiology of contraction in body and heart muscle*, en el cual revive la hipótesis, expuesta inicialmente por Ringer (76) en 1885 de la existencia de digitálicos endógenos en los mamíferos. Skou (86) demostró, en 1957, que estos receptores están localizados en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de las membranas plasmáticas.

En estos últimos trece años los conocimientos de la fisiología y patofisiología celular han avanzado enormemente, aunque todavía hay muchísimo más por descubrir. Sin embargo, aquí sólo se mencionará lo que está más o menos claro. Es imposible describir en detalle lo que se conoce o se está investigando hoy en día.

La ouabaina es una hormona circulante (43, 44, 46, 49, 55, 71, 83) de acción rápida, la cual se halla presente en varias especies (20, 30). Es almacenada (48, 30, 55) y secretada por el hipotálamo (41, 55, 104), la hipófisis (43, 104) y las suprarrenales (17, 30-32, 43, 49, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 82, 91). En estas últimas es sintetizada en las células de la zona fasciculada (53, 55) a partir de progesterona y pregnenolona (44, 50, 72) a través de varios isómeros de  $3\beta$ -hidroxiesteroideo dehidrogenasas. La síntesis en el hipotálamo y la hipófisis no se ha aclarado todavía. Tiene una vida media,  $\text{IC}_{50}$ , de 5 a 8 minutos y es transportada por la cadena  $\mu$  del alotipo d, de la globulina M, IgM $\mu$ d (2, 3, 49) y es eliminada por el hígado (3) y la orina (24). Es secretada humoralmente, por el ejercicio (3) y la hipoxia (25), a través de la fenilefedrina y la angiotensina II (17, 53, 54) a través del receptor angiotensina tipo 2,  $\text{AT}_2$ , por medio de sistemas todavía desconocidos.

Además de la ouabaina se ha demostrado la síntesis de otros cardiotónicos endógenos como marinobufagénina (8, 9), bufalín (83), 19-norbufalina (60) y proscillaridina A (83).

Aunque se ha demostrado la presencia de digoxina en plasma, orina, adrenales y quistes de seno (48, 102), no hay pruebas de que ésta sea secretada de manera endógena.

La acción bloqueadora de los esteroides cardiotónicos en la bomba de sodio, se ejerce en los receptores  $\alpha$  y se ha demostrado en casi todos los

animales y todo tipo de células. La bomba de sodio, la sodio-potasio adenosín trifosfatasa,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, tiene cuatro isómeros en los receptores  $\alpha$ ,  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ -4 (89). El  $\alpha$ -1 es específico para el  $\text{Na}^+$  y está presente en toda la membrana celular. Los receptores  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3 son menos afines al  $\text{Na}^+$  y están asociados con la actividad de la proteína intercambiadora de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , NCX. Cada tipo de célula tiene una proporción diferente de estos receptores. Los receptores  $\alpha$ -3, son más numerosos en células nerviosas, miocárdicas y músculo liso arterial; los dos receptores  $\alpha$ -2 son más abundantes en el músculo estriado y los receptores  $\alpha$ -1 son más abundantes en el riñón. La ouabaina actúa principalmente en los receptores  $\alpha$ -3 y también en los  $\alpha$ -2 pero con menos afinidad. Sólo los espermatozoides tienen el cuarto receptor, el  $\alpha$ -4 (89).

### Acciones fisiológicas en el sistema cardiocirculatorio

El ejercicio y la hipoxia (3, 25), por intermedio del hipotálamo, a través de un sistema todavía desconocido, pueden incrementar de 50 a 500 veces la concentración de ouabaina en el suero (3). Este aumento actúa sobre la actividad simpática, el miocardio, el músculo liso arterial y el endotelio arterial. La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, al ser bloqueada parcialmente por la ouabaina (15, 100, 102) aumenta la concentración de sodio intracelular,  $[\text{Na}^+]_i$  e inicia una cadena de eventos celulares iónicos y enzimáticos. Los receptores  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3 se encuentran principalmente en los plasmersomas, zonas de la membrana plasmática, con la proteína intercambiadora  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , NCX. Los plasmersomas están yuxtapuestos con los retículos sarcoplasmático y endoplasmático. Al aumentar la concentración de  $[\text{Na}^+]_i$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  intercambiado por  $\text{Na}^+$  es secuestrado inmediatamente por los retículos, lo que incrementa de manera significativa la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intra-reticular (15, 86, 88, 92) sin aumentar la concentración del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El intercambio se hace con la relación de 3  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$  (15).

Este mecanismo activa el bombeo de calcio al interior de la célula miocárdica (84, 95, 96), el músculo liso arterial (8, 75, 77, 84, 85, 88, 105) y las células arteriales endoteliales (19, 79, 100).

Durante la contracción miocárdica y del músculo liso arterial el efecto inotrópico aumenta en proporción al calcio liberado por el RS (64, 96, 98, 99) y en las células arteriales endoteliales incrementa la secreción de óxido nítrico (18, 64, 69, 78, 98, 100) o de endotelina (79, 103).

Por otro sistema que todavía no se comprende bien, estas elevaciones del  $[Na^+]_i$  actúan sobre los canales de calcio voltaje-dependientes del tipo-L, de voltaje bajo del tipo-T y de los canales de calcio activados por descarga de calcio, CRAC. Además generan oscilaciones en el calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  (1, 7, 13, 74), las cuales, de acuerdo con su frecuencia, amplitud y duración controlan todas las funciones celulares, desde la fertilización del huevo hasta la muerte celular (apoptosis) (13, 74, 99, 101, 102).

En condiciones fisiológicas al suspender el ejercicio o la hipoxia los niveles de ouabaína vuelven al nivel de reposo en 4 a 8 minutos (3). Aunque el mecanismo de acción completo aún de desconoce (16) el papel de los esteroides cardiotónicos endógenos en la homeostasis del sistema cardiocirculatorio es, sin duda, esencial. Los cambios de  $[Na^+]_i$  y los procesos celulares desencadenados por la bomba de sodio, la amplitud, AM, y la frecuencia, FM, de las señales del  $[Ca^{2+}]_i$  activan diferentes reguladores de la transcripción genética (71, 85).

### Consideraciones terapéuticas

De acuerdo con el desencadenamiento de la apoptosis y necrosis de las células miocárdicas con dosis altas de esteroides cardiotónicos (26-29, 69), la práctica actual, al iniciar la terapia con digitalinas, de saturar el organismo hasta obtener cambios isquémicos en el electrocardiograma (alteraciones en el segmento RT, negativización o difasismo de la onda T y arritmias), debería reevaluarse. ¿Se deben estos cambios a la acción terapéutica o a cambios tóxicos por muerte celular? ¿Debería contraindicarse? ¿Es la carencia del efecto inotrópico positivo en el músculo liso arterial (45, 61, 62, 63) y el aparente efecto inotrópico negativo (62) de los digitálicos, favorable o desfavorable en el tratamiento prolongado de la insuficiencia cardiaca crónica?

Por otro lado, los cambios electrocardiográficos producidos por una dosis terapéutica de ouabaína son mínimos (67, 68); el organismo maneja fisiológicamente elevaciones hasta 500 veces el valor basal durante un ejercicio que retorna al nivel basal en 4 a 8 minutos (3) de reposo y el efecto restaurador del acoplamiento excitación-contracción de los miocitos después del infarto del miocardio (40) inclina la balanza hacia la ouabaína como terapia ideal para la falla cardiaca.

La respuesta al tratamiento de la falla cardiaca con una dosis de ouabaína cada dos, tres u ocho días (67, 68), con lo poco que se sabe sobre la fisiología de la

ouabaína endógena, permite sospechar si algunas de estas fallas cardíacas son consecuencia de una hipouabainemia y preguntarnos: ¿Serán los digitálicos semejantes a los esteroides? ¿Produce su uso, como lo hacen los esteroides, un estado de hipouabainemia suprarrenal? ¿Es la dosis de mantenimiento de los digitálicos con cambios electrocardiográficos isquémicos la que genera apoptosis e isquemia miocárdica? ¿Cuál esteroide cardiotónico sería el mejor para uso terapéutico? Se cree que la respuesta está muy bien expresada por el padre de estos nuevos hallazgos, Alvert Szent-Gyorgyi, quien escribió en su libro de 1953: «*Which is the best «digitalis»? On first thought one would be inclined to say that for man the best digitalis has to be the AS (active steroid) which is actually present in his blood.*»

Hoy sabemos que esta es, sin duda, la ouabaína. El actual raciocinio sobre la mal llamada «toxicidad» de la ouabaína anula el comentario hecho en el siglo XVI por el químico griego Paraselsus, quien inició el uso terapéutico de drogas puras; al referirse a éstas dijo: «sólo la dosis las convierte en tóxicas». El conocimiento a fondo de la fisiología y la dosificación de la ouabaína endógena será sin duda uno de los pasos primordiales del éxito terapéutico. El manejo de la ouabaína no sería diferente del manejo de la insulina, las endorfinas, la atropina, los esteroides e incluso el agua; todas letales si se dan a dosis excesivas.

Nuevamente, ¿requiem por la ouabaína? Por el bien de la humanidad, definitivamente ¡No!

### Bibliografía

1. Aizman O, Uhlén P, Lal M, Brismar H, Aperia A. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *PNAS* 2001; 98: 13420-13424.
2. Antolovic R, Kost H, Mohadjerami M, Linder D, Linder M, Schoner W. A specific binding protein for cardiac glycosides exists in bovine serum. *J Biol Chem* 1998; 273: 16259-16254.
3. Antolovic R, Bauer N, Mohadjerami M, Kost H, Neu H, Kirch U, Grünbaum EG, Schoner W. Endogenous ouabain and its binding globulin: Effect of physical exercise and study on its tissue distribution. *Hypertens Res* 2000; 23: 593-598.
4. Arnaud M. Sur la matière cristallisée active de flèches empoisonnées des Çomalis, extradite du bois d'Ouabio. *C R Acad Sci Paris* 1888; 106: 1011-1014.
5. Arnaud M. Sur la composition élémentaire de la strophantine cristallisée, extraite du *Strophantus combé*. *C R Acad Sci Paris* 1888; 107: 179-182.
6. Arnaud M. Sur la matière cristallisée active, extraité des sémences du *Strophantus glabre* de Gabon. *C R Acad Sci Paris* 1888; 107: 1162.
7. Arnon A, Hamlyn JM, Blaunstein MP.  $Na^+$  entry via store-operated channels modulate  $Ca^{++}$  signaling in arterial. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C173-C173.
8. Bagrov AY, Fedorova OV. Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the  $Na^+$ ,  $K^+$ -pump in human mesenteric arteries. *J Hypertens* 1998; 16: 1953-1958.
9. Bagrov AY, Fedorova OV, Dmitrieva RI, Howald WN, Hunter AP, Kuznetsova EA, et al. Characterization of a urinary bufodienolide  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998; 31: 1097-1103.

10. Battermann RC, Engstrom WW. Persistence of effect after digitalization by combined use of digitalis and ouabain. *Am Heart J* 1942; 24: 458.
11. Battermann RC, Rose OA, De Graff AC. Combined use of ouabain and digitalis in treatment of congestive heart failure. *Am Heart J* 1940; 20: 443.
12. Benhamou E. Les injections intraveineuses d'ouabaine quotidiennes et prolongées. *Paris Med* 1936; 1: 375.
13. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. The AM and FM of calcium signaling. *Nature* 1997; 386: 759-760.
14. Blaustein MP, Hamlyn JM. Endogenous ouabain: implications for cardiovascular disease diagnosis and treatment. *MD Med J* 1992; 41: 501-504.
15. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993; 264 (Cell Physiol 33): C1367-C1387.
16. Blaustein MP, Juhaszowa M, Golovina VA. The cellular mechanism of action of cardiotoxic steroids: a new hypothesis. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 691-703.
17. Boulanger BR, Lilly MP, Hamlyn JM, Laredo J, Shurtleff D, Gann DS. Ouabain is secreted by the adrenal gland in the awake dogs. *Am J Physiol* 1993; 264 (Endocrinol Metab 27): E413-E419.
18. Boulanger C, Hendrickson H, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Release of different relaxing factors by cultured porcine endothelial cells. *Circ Res* 1989; 64: 1070-1078.
19. Calderaro V, Steffanini R, Matera MG, Vacca C, Dini I, Rossi F. Physiological and pharmacological properties of an endogenous sodium pump inhibitor. *Life Sci* 1997; 61: 1457-1468.
20. Castañeda-Hernandez G. Evidence for the existence of the same endogenous digitalis-like factor in several mammalian species. *Comp Biochem Physiol* 1989; 94C: 49.
21. Cattell M, Gold H. Influence of digitalis glycosides on force of contraction of mammalian cardiac muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1938; 62: 116-125.
22. Chavez I. Comparative value of digitalis and of ouabain in the treatment of heart failure. *Am J M Sc* 1924; 168: 201.
23. Clerc A, Bascourret U. Ouabaine et son utilisation en cures prolongées. *J Med & Chir Pract* 1999; 104: 381.
24. De Angelis C, Riscuzzi M, Salvini R, Piccoli A, Ferri C, Santucci A. Isolation and characterization of a digoxin-like immunoreactive substance from human urine by affinity chromatography. *Clin Chem* 1997; 43: 1416-1420.
25. De Angelis C, Hauptert Jr. GT. Hypoxia triggers release of an endogenous inhibitor of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase from midbrain and adrenal. *Am J Physiol* 1998; 274: F182-F188.
26. Dearing WH, Barnes AR, Essex HE. Experiments with calculated therapeutic and toxic doses of digitalis. I. Effects on the myocardial cellular structure. *Am Heart J* 1943; 25: 648-664.
27. Dearing WH, Barnes AR, Essex HE. Experiments with calculated therapeutic and toxic doses of digitalis. II. Effects on the electrocardiogram. *Am Heart J* 1943; 25: 665-681.
28. Dearing WH, Barnes AR, Essex HE. Experiments with calculated therapeutic and toxic doses of digitalis. V. Comparative effects of toxic doses of digitalis and of pitressin on the electrocardiogram, heart and brain. *Am Heart J* 1944; 27: 96-107.
29. Dearing WH, Barnes AR, Essex HE. Experiments with calculated therapeutic and toxic doses of digitalis. VI. Comparative effects of toxic doses of digitalis and of prolonged deprivation of oxygen on the electrocardiogram, heart and brain. *Am Heart J* 1944; 27: 108-120.
30. Doris PA, Stocco DM. An endogenous digitalis-like factor derived from the adrenal gland: studies on adrenal tissues of various species. *Endocrinology* 1989; 125: 2573-2579.
31. Doris PA, Kilgore MW, Durham D, Alberts D, Stocco DM. An endogenous digitalis-like factor derived from the adrenal gland: Studies of adrenocortical tumor cells. *Endocrinology* 1989; 125: 2580-2586.
32. Doris PA, Hayward-Lester A, Bourne D, Stocco DM. Ouabain production by cultured adrenal cells. *Endocrinology* 1996; 137: 533-539.
33. Edens E. Über digitaliskumulation und langdauernde Strophantinbehandlung. *Klin Wchschr* 1936; 15: 1829.
34. Fedorova OV, Bagrov AY. Inhibition of Na/K-ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin. Evidence of interaction with different  $\alpha$ -subunits isoforms. *Am J Hypertens* 1997; 10: 929-935.
35. Fraenkel A. Chronische herzinsuffizienz und intravenöse strophanthin-therapie. *Munch Med Wchschr* 1912; 6: 7.
36. Fraenkel A. Behandlung finaler stadien chronischer herzinsuffizienz. *Verh Dtsch Ges F Kreislauffschg* 1928; 1: 55-62.
37. Frasser TR. On the Kombé arrow poison of Africa. *Proc Roy Soc Edinburg* 1869; 7: 99-100.
38. Frasser TR. The action and uses of digitalis and its substitute with reference to strophantus. *Brit Med J* 1985; 11: 904.
39. Gilbert NC, Fenn GK. Effect of digitalis on coronary flow. *Arch Intern Med* 1932; 50: 663-683.
40. Gómez AM, Guatimosin S, Dilly KW, Vassort G, Lederer WJ. Heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104: 688-693.
41. Goto A, Yamada K, Ishii M, Yoshioka M, Ishiguro T, Eguchi C, Sugimoto T. Existence of a polar digitalis-like factor in mammalian hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 953-958.
42. Goto A, Yamada K. Purification of endogenous digitalis-like factors from normal human urine. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 551-556.
43. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Matheus WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 81: 6259-6263.
44. Hamlyn JM, Lu Z, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, et al. Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 523-533.
45. Huang BS, Kudlac M, Kumarthasan R, Leenen FH. Digoxin prevents ouabain and high salt intake-induced hypertension in rats with sinoaortic denervation. *Hypertension* 1999; 34: 733-738.
46. Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert J, et al. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6654-6659.
47. Kisch B. Strophantin. The Brooklyn Medical Press Inc. New York; 1945.
48. Kitano S, Morimoto S, Nishibe A, Fukuo K, Hirofani A, Nakahashi T, et al. Exogenous ouabain is accumulated in the adrenals and mimics the kinetics of endogenous digitalis-like factor in rats. *Hypertens Res* 1998; 21: 47-56.
49. Koniya Y, Nishimura N, Munakata M, Mori T, Okuda K, Nishimo N, et al. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC 12 cells. *J Hypertens* 2001; 19: 229-236.
50. Koniya Y, Nishimura N, Nishino N, Okuda K, Munakata M, Kosada C, et al. Purification and characterization of ouabain-binding protein in human plasma. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 683-690.
51. Lapicque L. L'action de la strophantine sur le coeur et son action musculaire en général. *Compt R Soc Biol Paris* 1923; 89: 315-322.
52. Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM. Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinol* 1994; 135: 794-797.
53. Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells. Role of zona glomerulosa and zona fasciculata. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 487-493.
54. Laredo J, Shah JR, Lu Z, Hamilton BP, Hamlyn JM. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cortical cells via angiotensin II receptors. *Hypertension* 1997; 29: 401-407.
55. Li SQ, Eim C, Kirch U, Lang RE, Schoner W. Bovine adrenals and hypothalamus are a major source of proscillaridin A- and ouabain-immuno-reactivities. *Life Sci* 1998; 62: 1023-1033.
56. Lichstein D, Steinitz M, Gati I, Samuelov S, Deusch J, Orly J. Biosynthesis of digitalis-compound in rat adrenal cells: hydroxicholesterol as a precursor. *Life Sci* 1998; 62: 2109-2126.
57. Livingstone D, Livingstone C. Narrative of an expedition to the Zambesi. London: Murray, 1865. p. 464-468.
58. Ludens JH, Clark MA, Robinson FG, DuCharme DW. Rat adrenal cortex is a source of a circulating ouabainlike compound. *Hypertension Dallas* 1992; 19: 721-724.
59. Manunta P, Evans G, Hamilton BP, Gann D, Resau J, Hamlyn JM. A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor (Abstract). *J Hypertens* 1992; 10 (suppl. 4): S27.
60. Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BC, Hamlyn JM. Ouabain induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J Hypertens* 1994; 12: 549-560.
61. Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BC, Hamlyn JM. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin. International Symposium on Natriuretic and Digitalis-like Factors. Chitose, Hokkaido Japan, 1999. p. 1324.

62. Manunta P, Hamilton J, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. *Hypertens Res* 2000; 23 (Suppl): S77-S85.
63. Manunta P, Hamilton BP, Hamlyn JM. Structure-activity relations for the hypertensinogenic activity of ouabain. Role of the sugar and lactone ring. *Hypertension* 2001; 37(Part 2): 472-477.
64. Marín J, Sánchez-Ferrer CF, Salas M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br J Pharmacol* 1988; 93: 43-52.
65. Martinka E, Galajada P, Ochodnický M, Lichardus B, Straka S, Mokaň M. Endogenous digoxin-like immunoactivity and diabetes mellitus: facts and hypothesis. *Med Hypothesis* 1997; 49: 271-275.
66. Ordoñez JH, Dueñas VH, Rubio E. Indicaciones y contraindicaciones de la aplicación de estrofantina K en pacientes digitalizados previamente. *An Soc Biol Bogotá* 1982; 3: 133-140.
67. Ordoñez JH. Long-term treatment (month and years) of chronic heart failure with strophantoin. *Memorias del VIII Congreso Interamericano de Cardiología*. Lima, 1968.
68. Ordoñez JH. Tratamiento prolongado de la insuficiencia cardíaca con ouabaina. *Rev Col Cardiol* 1988; 2: 432-438.
69. Pacheco ME, Marín J, Manso AM, Rodríguez-Martínez MA, Briones A, Salas M, Redondo J. Nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18: 877-884.
70. Pélikan EW. Sur un nouveau poison du coeur provenant de l'Inée ou Arrage et employé au Gabon (Afrique Occidentale) comme poison des fleches. *C R Acad Sci Paris* 1865; 60: 1209-1211.
71. Peng M, Huang L, Xie Z, Huang WH, Askari A. Partial inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by ouabain induces the Ca<sup>2+</sup>-dependent expression of early response genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 10372-10378.
72. Perrin A, Brasmes B, Chambaz EM, Defaye G. Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. *Molec Cell Endocrinol* 1997; 7: 7-15.
73. Polailon, Carville. Etude physiologique sur les effets toxiques de l'Inée poison des pahouins (Gabon). *Arch Phys* 1871; 4: 523-532.
74. Putney Jr. JW. Calcium signaling: up, down, up, down... What's the point? *Science* 1998; 279: 191-192.
75. Reuter H, Blaustein MP, Hausler G. Na-Ca exchange and tension development in arterial smooth muscle. *Trans R Soc Lond B Biol* 1973; 265: 87-94.
76. Ringer S. Regarding the influence of the organic constituents of the blood on the contractility of the ventricle. *J Physiol* 1885; 6: 361-381.
77. Rossoni LV, dos Santos L, Barker LA, Vassallo DV. Ouabain changes arterial blood pressure and vascular reactivity to phenylephedrine in L-NAME-induced hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 105-116.
78. Rossoni LV, Cunha V, França A, et al. The influence of nanomolar ouabain on vascular pressor responses is modulated by the endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 887-982.
79. Saunders R, Scheiner-Bobis G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1054-1062.
80. Schatzmann HJ. Herzglycoside als hemmstoffe für den aktiven kalium und natrium transport durch die erythrocytenmembran. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 1953; 11: 346-354.
81. Scherlag BJ, Abelleira JL, Narula OS, Samet P. The differential effects of ouabain on sinus, A-V nodal, His bundle and idioventricular rhythms. *Am Heart J* 1971; 81: 227-234.
82. Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, Schoner W. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem* 1988; 273: 784-792.
83. Schoner W. Endogenous digitalis-like factors. *Clin Exp Hypertens. Part A Theory Pract* 1992; A14: 767-814.
84. Sheu SS, Blaustein MP. Sodium/Calcium exchange and the control of cell calcium and contractility in cardiac and vascular smooth muscles. In: *The Heart and Cardiovascular System*. (2<sup>nd</sup> ed.), edited by Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE. New York: Raven; 1992. p. 903-943.
85. Shima H, Blaustein MP. Modulation of evoked contractions in rat arteries by ryanodine, thapsigargin, and cyclopiazonic acid. *Circ Res* 1992; 70: 968-977.
86. Skou JC. The influence of some cations on and adenosinetriphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 1957; 23: 394-401.
87. Stoll A. Über K-strophantosid. *Münch Med Wchnschr* 1939; 86: 761-770.
88. Sturek M, Kunda K, Hu Q. Sarcoplasmic reticulum buffering of myoplasmic calcium in bovine coronary artery smooth muscle. *J Physiol Lond* 1992; 451: 25-48.
89. Sweadner K. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 185-220.
90. Szent-Györgyi A. Chemical physiology of contraction in body and heart muscle. New York: Academic, 1953. p. 135.
91. Tamura M, Lam TT, Inagami T. Isolation and characterization of a specific endogenous Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor from bovine adrenals. *Biochemistry* 1988; 27: 4244-4253.
92. Tanford C. Equilibrium state of ATP-driven ion pumps to physiological ion concentration gradients. *J Gen Physiol* 1981; 77: 223-229.
93. Van Huysse JW, Leenen FH. Role of endogenous brain «ouabain» in the sympathoexcitatory and pressor effects of sodium. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 657-667.
94. Vaquez H, Lutembacher L. Ouabaine. *Arch Mal Coeur* 1917; 10: 197.
95. Vassale M, Lee CO. The relationship among sodium activity, calcium, and strophantidin inotropic in canine cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1984; 83: 287-307.
96. Wier WG, Hess P. Excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje fibers. Effects of cardiotonic steroids on the intracellular [Ca<sup>2+</sup>] transient, membrane potential and contraction. *J Gen Physiol* 1984; 83: 395-415.
97. Wiggers CJ, Stimson B. Studies on the cardiodynamic actions of drugs. III Mechanism of cardiac stimulation by digitalis and g-strophantoin. *J Pharmacol Exp Therap* 1927; 30: 251-259.
98. Woolfson RG, Poston L. Effect of ouabain on endothelium-dependent relaxation of human resistance arteries. *Hypertension Dallas* 1991; 17: 619-625.
99. Xiao AY, Wei L, Xia S, Rothman S, Yu SP. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J Neurosci* 2002; 22 (4): 1350-1362.
100. Xie J, Wang Y, Summer WR, Greenberg SS. Ouabain enhances basal release of nitric oxide from carotid artery. *Am J Med Sci* 1993; 305: 157-163.
101. Xie J, Kometiani P, Liu J, Shapiro JI, Askari A. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 19323-19328.
102. Xie J, Askari A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2434-2439.
103. Yamada K, Goto A, Hui C, Sugimoto T. Endogenous digitalis-like factor as a stimulator of endothelin secretion from endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 178-183.
104. Yamada H, Naruse M, Naruse K, Demura K, Takahashi M, Yoshimura M, et al. Histological study on ouabain immunoreactivities in the mammalian hypothalamus. *Neurosci Lett* 1992; 141: 143-146.
105. Zhu Z, Tepel M, Neusser M, et al. Low concentrations of ouabain increase cytosolic free calcium concentration in rat vascular smooth muscle. *Clin Sci* 1996; 90: 9-12.