

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**EFECTO PROTECTOR DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO PARA FIBROBLASTOS EN UN
MODELO DE ISQUEMIA MIOCÁRDICA EN LA RATA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR M^a Victoria Martínez Coso**

Bajo la dirección del Doctor:
Pedro Cuevas Sánchez

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1703-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**EFFECTO PROTECTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
PARA FIBROBLASTOS EN UN MODELO DE ISQUEMIA
MIOCÁRDICA EN LA RATA**

Tesis presentada por M^a Victoria Martínez Coso para optar al grado de Doctor.

Madrid, septiembre 2001.

M^a Victoria Martínez Coso

Director:

Tutor:

Dr. Pedro Cuevas Sánchez

Dra. Begoña Gómez

A Miguel y a mis hijos, Diego y Carmen.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis me ha dado la posibilidad de tener una experiencia humana incalculable que no aparece en ninguno de los textos, años de esfuerzos compartidos con muchas personas con las que he vivido alegrías y sinsabores, personas que me alentaron desde el comienzo y, que me han supuesto un estímulo permanente. Gracias a todas estas personas he conseguido terminar este trabajo y construir una etapa de mi vida muy importante.

A mi director de tesis, Dr. Pedro Cuevas Sánchez por hacer posible este trabajo.

A la Dra. Begoña Gómez por aceptar tutelar esta tesis doctoral.

Al Dr. Fernando Carceller, por su destacada intervención en la cirugía de los animales, una aportación tan imprescindible como gratificante, sin la cuál hubiera sido imposible realizar este trabajo.

A Maite Gericabeitia, que me ha ayudado tanto, siempre estuvo en el lugar preciso con un apoyo permanente. Gran parte de los experimentos pasaron por sus manos, sobre todo quiero agradecerle su imprescindible colaboración en toda la microscopía, tanto óptica como electrónica.

A la Dra. Diana Reimers, por su colaboración en algunos experimentos y, sobre todo, por sus precisas indicaciones que me mostraron, con más claridad, el camino a seguir.

A todo el personal del Departamento de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas, por su aportación material de FGF, imprescindible para la elaboración de este trabajo.

A Begoña Cuevas y Argentina Fernández, por la elaboración de algunos experimentos.

A Sonia Gabancho, por su irremplazable colaboración en la iconografía, ya que me ayudó y me enseñó a diseñar y mejorar todas las fotografías, diapositivas y esquemas.

A Diana Díaz, por sus críticas y aportaciones al manuscrito de esta tesis.

A Chantal Bourdier, por las correcciones del texto.

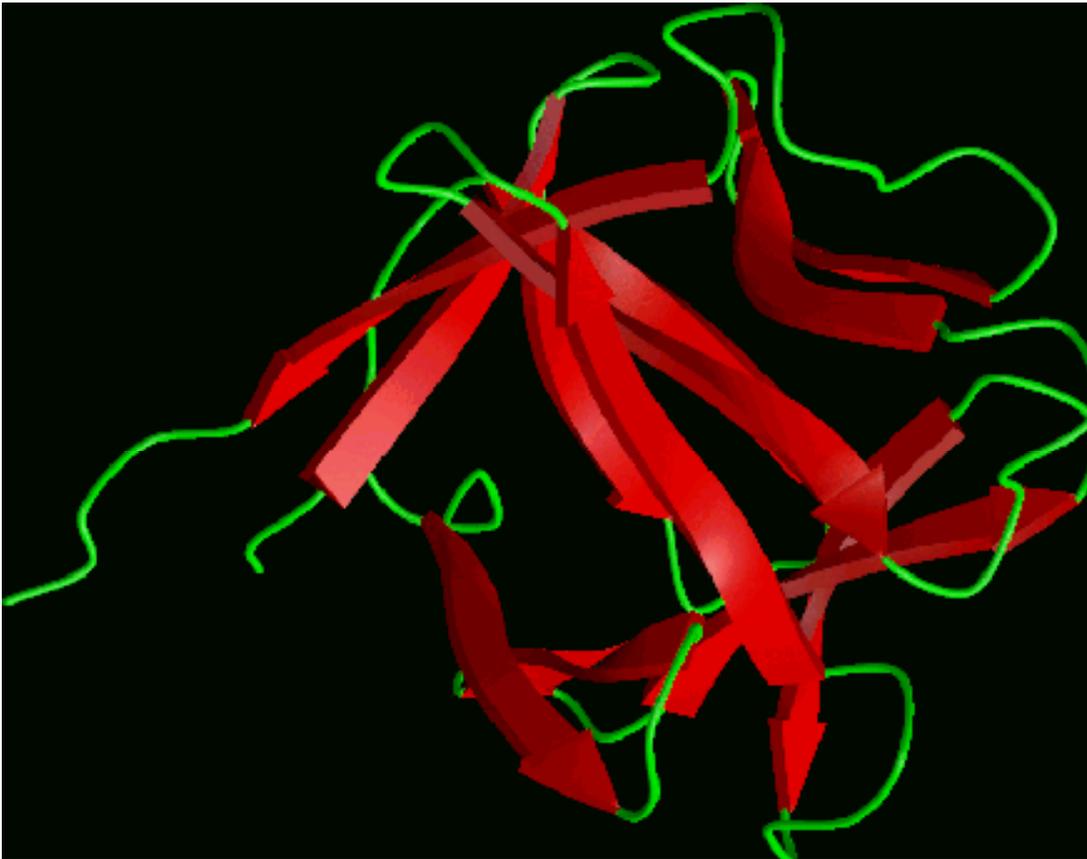
	Pag.
▪ INTRODUCCIÓN	11
▪ Caracterización y aislamiento de los FGFs.....	15
▪ FGFs: Familia y proteínas relacionadas.....	16
▪ Biosíntesis y secreción de los FGFs.....	19
▪ Heparina y su unión a los FGFs.....	21
▪ Receptores de los FGFs.....	23
▪ Receptores de alta afinidad.....	23
▪ Receptores de baja afinidad.....	25
▪ La matriz extracelular y los FGFs.....	27
▪ Actividades biológicas de los FGFs.....	29
▪ Actividades mitogénicas.....	29
▪ Actividades no mitogénicas.....	30
▪ Los FGFs en la isquemia miocárdica.....	31
▪ OJETIVOS	33
▪ MATERIAL Y METODOS	35
▪ Modelo de isquemia transitoria.....	37
▪ Tratamiento.....	39
▪ Histología.....	40
▪ Microscopía óptica.....	40
▪ Microscopía electrónica.....	41

	Pag
▪ Medición de la actividad Creatina Quinasa (CK).....	45
▪ Medición de la actividad Mieloperoxidasa (MPO).....	46
▪ Determinación de Apoptosis.....	48
▪ Medición de la actividad Óxido Nítrico Sintasa (NOS).....	50
▪ Detección inmunohistoquímica de la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS).....	52
▪ Determinación de la fuerza de la contracción.....	54
▪ Análisis estadísticos.....	56
▪ RESULTADOS	57
▪ Histología.....	59
▪ Microscopía óptica.....	59
▪ Microscopía electrónica.....	66
▪ Actividad Creatina Quinasa (CK).....	72
▪ Actividad Mieloperoxidasa (MPO).....	74
▪ Apoptosis.....	76
▪ Actividad Óxido Nítrico Sintasa (NOS).....	80
▪ Detección inmunohistoquímica de la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS).....	83
▪ Fuerza de contracción.....	86
▪ DISCUSIÓN	89

	Pag.
▪ CONCLUSIONES	113
▪ BIBLIOGRAFÍA	117

Introducción

aFGF



Uno de los objetivos importantes en investigación biomédica consiste en la identificación y purificación de las sustancias implicadas en los procesos de multiplicación de las células eucarióticas y sus mecanismos de acción. En el último decenio del siglo pasado se ha estudiado con profusión este tipo de sustancias entre las que destacan los factores de crecimiento para fibroblastos (FGFs). Estas sustancias son de naturaleza peptídica y, algunas de ellas, están relacionadas con los oncogenes.

Los miembros mejor estudiados de la familia de los FGFs son el factor de crecimiento para fibroblastos ácido (FGFa o FGF-1) y el factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb o FGF-2). Estos factores de crecimiento inducen la síntesis de ADN y la división celular, pero también tienen otras funciones no mitogénicas (1,2). Además, se ha logrado obtener, por ingeniería genética, FGFs que tengan solo parte de sus actividades biológicas (3).

Los FGFs o proteínas relacionadas con ellos se encuentran en la mayoría de los tejidos (4). Debido a esta amplia distribución en tejidos y en distintos tipos celulares existían muchos sinónimos de los FGFs (5).

CARACTERIZACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS FGFs

Los primeros estudios para identificar estas sustancias se realizaron en 1940 (6,7). Más tarde, Armelin, en 1973 y Gospodarowicz en 1975 purificaron, de forma parcial, a partir de extractos de cerebro y de pituitaria, una proteína con acción mitogénica para fibroblastos (8,9) que presentaba un punto isoeléctrico muy alto ($PI < 9.0$) y que se denominó factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) (10). En 1980 Thomas y colaboradores aislaron otra proteína con acción mitogénica para los mismos tejidos que la proteína anterior pero con un punto isoeléctrico ácido ($PI = 5.6$) (11). Esta proteína se denominó factor de crecimiento para fibroblastos ácido (FGFa) y así se diferenciaba de la anterior con punto isoeléctrico básico que pasó a llamarse factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb) (11, 12). Posteriormente en 1984, otros autores, consiguieron una mejor purificación, en tejido cerebral, del FGFa y en hipófisis de FGFb (13, 14). Estas proteínas fueron secuenciadas y se observó que, realmente eran proteínas distintas pero con secuencias homólogas, lo que explicaba sus actividades biológicas similares.

La purificación de estos factores se hizo mediante cromatografía de afinidad, utilizando heparin-sefarosa como fase móvil (15). Desde entonces se utiliza este método para identificar factores similares a los FGFs en los distintos

tejidos (5, 16), ya que con esta técnica se obtienen preparaciones puras de factores de crecimiento de forma sencilla y eficaz.

FGFs: FAMILIA Y PROTEÍNAS RELACIONADAS

Además del FGFa o FGF-1 y del FGFb o FGF-2 existen otras proteínas homólogas que forman parte de la familia de los FGFs (2, 4, 17, 18, 19). Los miembros más significativos de la familia de los FGFs incluyen:

- Factor de crecimiento para fibroblastos ácido (FGFa, FGF-1).
- Factor de crecimiento para fibroblastos básico (FGFb, FGF-2).
- Factor de crecimiento para fibroblastos 3 (FGF-3, INT-2).
- Factor de crecimiento para fibroblastos 4 (FGF-4). También llamado HST/Kaposi FGF (HST/K-FGF).
- Factor de crecimiento para fibroblastos 5 (FGF-5).
- Factor de crecimiento para fibroblastos 6 (FGF-6).
- Factor de crecimiento para fibroblastos 7 (FGF-7). Mitógeno para células endoteliales y queratinocitos. También llamado factor de crecimiento para queratinocitos (KGF).

Existen otras muchas moléculas nuevas asignadas a la familia de los FGFs, que se está ampliando constantemente: hasta el momento se han descrito 20 FGFs diferentes (20).

Las semejanzas entre las secuencias de aminoácidos de algunos de estos

factores aparecen en la siguiente figura:

FGF básico	-----	
FGF ácido	-----	
HST/KS 3	-----MSGPGTAAVALLPAVLLALLAPWAGRGGAAAPTAPNGTLEAELERRWESLVALS	54
INT-2	-----MGLIWLLLLSLLEPSW	16
FGF-5	MSLSFLLLLFFSHLILSAWAHGEKRLAPKGQPGAAT DRNPRGSSSRQSSSSAMSSSS	58
FGF básico	MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKR LYC KNG-GFFLRIHPDGRVDGVRE	54
FGF ácido	MAEGEITFTALTEK - - - - FNLPPGNYKKPKL LYC SNG-GHFLRILPDGTVDGTRD	51
HST/KS 3	LARLPVAAQPKEAAVQSGAGDYLLGIKRLRR LYC NVGIGFHLQALPDGRIGGAHA	109
INT-2	PTTGPGTRLRRDAGGRGGVYEHGGAPRRRK LYC ATK - -YHLQLHPSGRVNGSLE	69
FGF-5	ASSSPAASLGSQGSGLQSSFQWSLGARTGS LYC RVGIGFHLQIYPDGKVNCSHE	113
	* * * * *	
FGF básico	KSDPHIKLQLQAEERGV V SIKGVCANRYL AM KED G RL L ASKCVTDE CFF ERLES	109
FGF ácido	RSDQHIQLQLSAESVGE V YIKSTETGQYL AM DTD G LLYGSQTPNEE C FLERLEE	106
HST/KS 3	DTRDSL - L ELSPVERGV V SIFGVASRFFV AM SSK G KLYGSPFFTDE C TFKEILLP	163
INT-2	NSAYSI - L EITAVEVGV V AIKGLFSGRYL AM NKR G RLYASDHYN A CE F VERIHE	123
FGF-5	ANMLSV - L EIFAVSQG V IRGVFSNK FL AMSK G KLHASAKFTDD C KFRERFQE	167
	* * * * *	
FGF básico	NN Y NTY R S R KYTS-----WYVALKRT G QYKL G --SKTGPGQKAI	146
FGF ácido	NH Y NTY I SKKHAEKN-----WFVGLK K NG S CKR G -PRTHYGQKAI	145
HST/KS 3	NN Y N A Y E S Y KYPG-----WFIALSK N G K TK K G -NRVSPTMKVT	200
INT-2	L G YNTY A S R LYRTGSSGPGAQRQPGAQRPWYVSVNG K GR P RR G FKTRRT-QKSS	176
FGF-5	NS Y NTY A S A IHRTEKTGRE-----WYVALNKR G KAKR G CSPRVKPQHIST	212
	* * * * *	
FGF básico	L FLPMSAKS-----	155
FGF ácido	L FLPLVSSD-----	155
HST/KS 3	H FLPRL-----	206
INT-2	L FP R VLGHKDHMVRLLQSSQPRAPGEGSQPRRQKKQSPGDHGMETLSTRA	229
FGF-5	H LP R FRKQSEQPELSFTVTVPEKKNPPSP IKSK IPL SAPRKNTNSVKYRLKFRFG	212
	* * * * *	
FGF básico	-----	
FGF ácido	-----	
HST/KS 3	TPSTQLHTGGLAVA	243
FGF-5	-----	

Las secuencias en rojo señalan las estructuras idénticas, y los asteriscos (*) resaltan las zonas con homología significativa.

El primer estudio de homología se realizó entre los FGFs y la Interleukina-

1 α que son proteínas que evolucionaron a partir de un mismo gen ancestral, pero que no tienen actividades biológicas semejantes (21, 22).

Los FGFs-3, 4, 5, y 6 se han relacionado con el resto por su alta homología y son productos celulares de oncogenes. Estas proteínas parecen actuar solo durante breves periodos del desarrollo embrionario y del recién nacido (23). La mayor semejanza entre los miembros de la familia se localiza en el centro de la molécula, ya que los extremos amino y carboxilo son más variables y algunos son más largos que los del FGFa y FGFb. El extremo amino y su longitud son importantes para algunos FGFs, ya que presenta la típica secuencia señal. Esta secuencia es la responsable de la secreción de la proteína por el aparato de Golgi, donde se realizan los cambios post-transcripcionales de glicosilación.

No parece que los FGFb, FGFa y FGF-3 codifiquen una secuencia señal conocida. Giménez-Gallego y colaboradores observaron que el FGFa no tiene péptido señal, por lo cual, aunque existen secuencias de glicosilación en su estructura primaria, no se glicosila en condiciones normales (24).

Los FGFs ácido y básico se unen a heparina con alta afinidad (5, 16), por lo que se conoce a esta familia de proteínas como factores de crecimiento que unen heparina (25). Existen otros factores que se unen a heparina y no presentan ninguna relación con ellos y otros, dentro de esta familia, que no tienen afinidad por heparina como: INT-2, KGF (19, 26).

BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LOS FGFs

Para el FGFa se ha determinado, por biología molecular, que el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) codifica una proteína de 155 aminoácidos. También el FGFa se puede purificar de formas resultantes del truncamiento de su amino terminal, dando lugar a proteínas de 130 a 155 aminoácidos (27, 28, 29). El FGFb está compuesto de 146 aminoácidos, aunque existe una forma truncada de su amino terminal, con una pérdida de los 15 primeros aminoácidos (30, 31).

Los FGFs (tanto FGFa como FGFb) son secretados por exocitosis por una vía independiente del aparato de Golgi que no requiere el péptido señal (32, 33). Inicialmente se propuso que el heparan sulfato de las cubiertas celulares secuestraba a los FGFs, pero posteriormente se demostró que no los secuestran sino que ellos actúan, precisamente, desde allí (32, 34, 35).

Existen muchas células diana de los FGFs que son también las que los sintetizan. En la siguiente tabla se relacionan las células que sintetizan FGFs como fibroblastos y células endoteliales vasculares y capilares. Estas células secretan los FGFs que, a su vez, estimulan su propio crecimiento.

Células que sintetizan FGF	Abreviatura de los seudónimos	Ref.
Folículo de pituitaria	FGF	(36)
Célula endotelial vaso	FGF	(37)
Célula endotelial capilar	FGF	(38)
Célula endotelial córnea	FGF	(39)
Célula músculo liso	ECGF	(39)
Neurona	BDGF	(40)
Célula córtex adrenal	FGF	(41)
Célula granulosa ovario	FGF	(42)
Fibroblastos	FGF	(43)

Célula epitelial retina	FGF	(44)
Macrófago	FGF	(45)
Hepatoma	FGF	(46)
Meduloblastoma	HBGF	(47)
Rhabdomiosarcoma	FGF	(48)
Retinoblastoma	FGF	(44)
Hela	FGF	(43)
Leucemia	FGF	(43)
Neuroblastoma	BDGF	(40)
Glioma	FGF	(49)

HEPARINA Y SU UNIÓN A LOS FGFs

Los FGFs se diferencian de otras familias de factores de crecimiento por su alta afinidad a heparina (5, 16). La heparina es un polisacárido lineal, altamente sulfatado, formado por residuos de ácido urónico (L-idurónico, D-idurónico), y D-glucosamina. La heparina es un glucosaminoglicano sulfatado que representa un componente de las cadenas de proteoglicanos producidos por las células eucariotas y es considerado como un componente fundamental de las matrices peri y extracelulares (50).

Gracias a la afinidad de los FGFs por la heparina su proceso de purificación resultó más fácil. Esta característica diferencia a los FGFs; en efecto el FGFa es mucho más afín por la heparina y unido a ella su actividad se multiplica por 100 (51, 52), considerándose la forma del FGFa unida a heparina como biológicamente activa (53). Esta unión a heparina o glucosaminoglicanos sulfatados de los FGFs les confiere una protección contra la inactivación por degradación proteolítica, por acidificación del medio o por agentes caotrópicos (54, 55, 56, 57,58).

De todo ello se deduce que el mecanismo por el que la heparina potencia la actividad de los FGFs puede deberse a la prevención de modificaciones proteolíticas y a la estabilización de la estructura terciaria de la proteína (59, 60). Existe una función potenciadora específica de la heparina y sus derivados

(heparan-sulfatos y dextran-sulfatos), mientras que otros componentes de la matriz extracelular, como son el ácido hialurónico, el condroitin-sulfato y el dermatán-sulfato, no lo hacen. Esta potenciación de la heparina en el caso del FGFa es especialmente importante, ya que le otorga la misma actividad que el FGFb (61, 62, 63, 64).

RECEPTORES DE LOS FGFs

Existen dos tipos de receptores que se caracterizan por su distinta afinidad por los FGFs en la superficie celular: receptores de alta afinidad y receptores de baja afinidad.

En 1987 se demostró que las células de riñón de cría de hámster (BHK) tenían unos 80.000 receptores de alta afinidad por célula con una $K_D=20$ pM y 600.000 de baja afinidad con una $K_D=2$ nM (65).

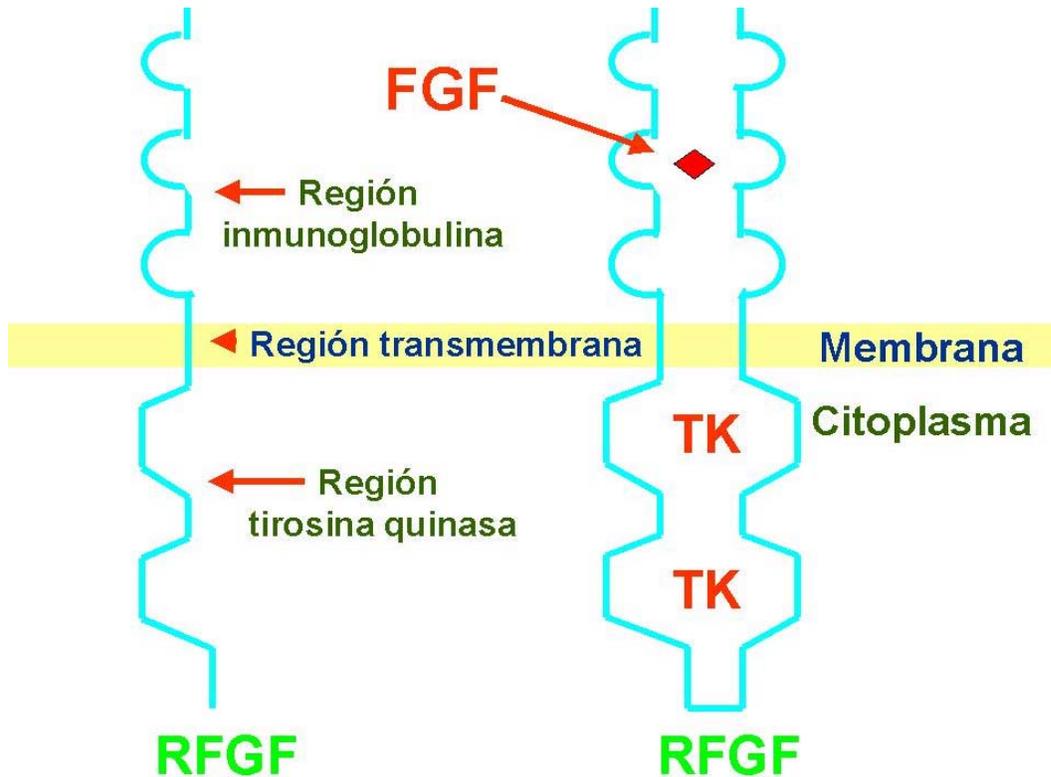
Receptores de alta afinidad

Los receptores de alta afinidad de los factores de crecimiento para fibroblastos (RFGF) son proteínas transmembranosas con actividad tirosina quinasa. Existen cuatro genes diferentes que codifican cuatro receptores distintos: R1 a R4. Todos los receptores de FGF tienen una estructura general compuesta de:

- Una región extracelular constituida por tres dominios de tipo inmunoglobulina (Ig I, Ig II, Ig III). Los dominios Ig II e Ig III son esenciales para la unión del FGF a su receptor.
- Una región intracitoplásmica con actividad catalítica formada por dos dominios quinasa.
- Una región transmembranosa que atraviesa la membrana plasmática (66,

67).

Receptor FGF



Hay un gran número de isoformas de los RFGF puesto que varias formas diferentes son codificados por un solo gen que puede dar distintos productos, debido a procesos de "splicing" alternativo del ARNm durante la síntesis de proteínas y también deleciones, incorporación de distintos exones, etc.

De forma característica las familias de los FGFs y de sus receptores presentan doble redundancia debido a su complejidad, porque un mismo factor se

puede unir a distintos receptores y, un mismo receptor puede ser activado por diferentes FGFs (66, 67).

La siguiente tabla presenta la relación de cada FGF con los distintos receptores de alta afinidad:

FGFs	RFGF1	RFGF2	RFGF3	RFGF4
FGFa	+	+		+
FGFb	+	+		-
INT2			+	
FGFK	+	+		+
FGF-5				-
FGF-6				+
KGF		+		-

Receptores de baja afinidad

Los receptores de baja afinidad de los FGFs son los glucosaminoglicanos de los proteoglicanos heparan-sulfatados (HSPG) expuestos en la superficie de la célula y presentes en la matriz mitocondrial (68, 69). En 1990 fue aislado el primer receptor de baja afinidad: el sindecán, proteína transmembranosa, de 309 residuos. En su extremo extracelular tiene un sitio de glicosilación y cinco sitios de

unión con glucosaminoglicanos, fundamentalmente heparan-sulfatos (70).

En 1992 se demostró que el 5 % del FGF localizado en la matriz extracelular está unido a HSPGs, fijados a la membrana celular (71). También se había observado que la unión del FGF a su receptor de alta afinidad requería HSPG (68). A partir de estos estudios se han desarrollado dos modelos para explicar la actuación de los HSPGs:

1. El HSPG sería la molécula presentadora del FGF a los receptores de alta afinidad, ya que habría un cambio conformacional del FGF al unirse, o bien a los HSPGs, o a la heparina libre, que sería capaz de emular el efecto de los HSPGs (72).
2. El FGF unido a los HSPGs actuaría como reservorio a nivel de la matriz extracelular, y las endoglicosilasas, proteasas o fosfolipasas C liberarían los FGFs generando un efecto autocrino y paracrino.

Todo esto implica que la unión de los FGFs al receptor es muy compleja y parece comprometer a más de un receptor en la célula diana.

LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LOS FGFs

Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de los FGFs es su unión a la matriz extracelular (50, 73, 74, 75). La matriz extracelular está compuesta por proteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Esta estructura no solo proporciona la base sobre la que se realiza la proliferación y diferenciación de las células (50, 76) si no que, además posee una función importante en la regulación de estos procesos (46, 77).

Debido a los mecanismos autocrino y paracrino de los FGFs hacen posible la comunicación intercelular, proporcionando un nuevo sistema de información celular y facilitando la adhesión celular a la matriz extracelular (50). El heparan sulfato de la matriz extracelular que se une al FGF potencia y alarga la actividad del FGF (25, 50, 78), facilitando su unión a los receptores específicos, proporcionando protección frente a la proteólisis y almacenándolo unido a la membrana para su posterior liberación (54, 55, 56, 73, 79).

Los factores de crecimiento, incluidos los FGFs y su conexión con la matriz extracelular, están relacionados con los fenómenos de reparación y curación de lesiones y con el control de las células del sistema inmune en los procesos infecciosos (76). En efecto, los tejidos lesionados inician unas respuestas celulares a nivel de la matriz extracelular que incluyen la liberación de FGF (50, 76).

La matriz extracelular también actúa como una vía de facilitación del traslado de determinadas células al área de lesión. Las células implicadas responden a los factores de crecimiento, originando cambios en las integrinas (receptores diméricos de la membrana celular, altamente específicos para unirse a determinados componentes de la matriz) o liberando determinados productos que faciliten su llegada a la zona lesionada. Un tipo celular que migra a la zona afectada es el fibroblasto que se ve afectado por la matriz o por los FGFs (76).

Las células en el lugar de la lesión responden a los FGFs que son liberadas desde la matriz extracelular (50, 76). En definitiva, en el lugar de la lesión, inicialmente, al dañarse la matriz extracelular los FGFs promueven la proliferación de los fibroblastos, que producirían el colágeno necesario para restaurar la matriz y disminuir el daño (76).

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS FGFs

Los FGFs, debido a su amplia distribución en los tejidos, tienen diversas actividades que podríamos resumir en dos actividades básicas: mitogénicas y no mitogénicas.

ACTIVIDADES MITOGÉNICAS

Los FGFs inducen la proliferación, diferenciación y quimiotaxis de una gran variedad de células originarias, tanto del mesodermo como del neuroectodermo, como son: fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas, miocitos, condrocitos, queratinocitos, mioblastos, osteoblastos, neuroblastos, neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann, hepatocitos y, sobre todo, células tumorales (2). Los FGFs inducen mitogénesis en muchos tumores (80, 81, 82, 83, 84).

También se ha demostrado que son capaces de inducir la formación de nuevos vasos en modelos animales "in vivo" (85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93). Además, al estimular la proliferación y diferenciación celular, están implicados en procesos reparativos de diferentes órganos (94), de las lesiones en las paredes vasculares (95) y en las heridas (96, 97). Por último, algunos autores han observado que los FGFs son osteogénicos (98, 99, 100).

ACTIVIDADES NO MITOGÉNICAS

Los FGFs poseen una serie de actividades no mitogénicas similares a las hormonas (101), como por ejemplo:

- Modulan el efecto endocrino de TRH (hormona que libera la hormona estimulante del tiroides) en la hipófisis (102).
- Modulan la FSH (hormona estimulante del folículo) en la secreción de estrógenos y progesterona por las células de la granulosa del ovario (103).
- Regulan el apetito (104).
- Promueven el sueño y la analgesia (105, 106).
- Decreten la actividad locomotora (107).
- Tienen una potente acción vasodilatadora e hipotensora (3).
- Tienen una potente acción antiepiléptica (108).
- Protegen frente al daño producido por isquemia en distintos órganos como: cerebro (109, 110, 111), riñón (112, 113), retina (113, 114), corazón (115, 116, 117, 118) y músculo esquelético (119).

LOS FGFs EN LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA

Los FGFs están presentes en el corazón normalmente, tanto en los miocitos (120, 121, 122), como en las células endoteliales (37, 38). Recientemente se ha relacionado la administración de FGF exógeno con una mejora en la isquemia cardiaca, no solamente por su efecto angiogénico (85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93), sino también por un efecto cardioprotector (115, 116, 117, 118).

Se ha demostrado que cortos periodos de isquemia, antes de una isquemia prolongada, causa una disminución, significativa del daño producido por la isquemia miocárdica (123, 124, 125), fenómeno llamado preconditionamiento. Algunos autores han demostrado que el FGF protege el miocardio isquémico de una manera comparable al fenómeno del preconditionamiento (126).

La isquemia seguida de reperfusión incrementa el daño producido en el tejido con la isquemia solamente (127, 128, 129, 130), por lo que actualmente se buscan terapias y/o tratamientos para paliar este daño, que se puede producir después de una angioplastia, terapia trombolítica o puentes coronarios.

En estudios preliminares de isquemia transitoria, realizados en nuestro laboratorio hemos comprobado que el FGF atenúa el daño producido por isquemia seguida de reperfusión, a través de los canales de potasio dependientes de ATP (116), y reduciendo las arritmias de reperfusión (131).

También existen evidencias recientes de que el preconditionamiento está mediado por los canales de potasio dependientes de ATP (126) y la regulación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (132). Además se ha demostrado que el FGF puede regular la expresión de esta enzima (133, 134, 135).

OBJETIVOS

Utilizando distintas técnicas histológicas, bioquímicas y funcionales, este estudio se planteó con los siguientes objetivos:

1. Estudiar la protección ejercida por el FGF en el miocardio de rata sujeto a 20 minutos de isquemia seguido de 24 horas de reperfusión.
2. Dilucidar el mecanismo de actuación del FGF en la cardioprotección.

Material y Métodos

Los animales empleados en este estudio provenían del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) y los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Ético del mismo para animales de experimentación. La cirugía se ajustó a las directrices de la Unión Europea para reducir el dolor y las incomodidades en los animales de experimentación (136).

MODELO DE ISQUEMIA TRANSITORIA

Con el fin de inducir una isquemia transitoria (137), 165 ratas Sprague-Dawley de ambos sexos entre 300 y 350 gramos (6-8 meses), fueron anestesiadas, intraperitonealmente, con una mezcla de clorhidrato de ketamina (Ketolar Parke-Davis) 25 mg/ml, valium (Roche) 2 mg/ml y sulfato de atropina (Antibióticos Pharma S.A.) 0.1 mg/ml. Los animales fueron entubados y ventilados con aire, por medio de un ventilador artificial (Harvard Apparatus, Natick, Ma), utilizando un volumen aproximado de 1.2 ml por cada 100 gramos de peso y una frecuencia de 65 respiraciones por minuto. Con la ayuda de un microscopio quirúrgico (Zeiss), el corazón fue expuesto por medio de una toracotomía intercostal izquierda y se efectuó una pericardiotomía. Seguidamente la arteria coronaria izquierda fue ocluida con una ligadura de 7-0 (Surgilene American Cyanamic Co. Danbury, Ct.06810) atravesando el tejido miocárdico. Los cabos de la ligadura fueron introducidos en un tubo de plástico de pequeño diámetro y se cerró la cavidad torácica. Posteriormente, se traccionó la ligadura y el tubo se clampó exteriormente para producir la isquemia. Después de 20 minutos se retiró

la ligadura de la arteria coronaria y se realizó la reperfusión.

La misma cirugía fue realizada en los animales simulados, excepto la inducción de la isquemia.

Los animales fueron devueltos al animalario con acceso libre a comida y agua. Después de 24 horas fueron reanestesiados y procesados para su estudio.

TRATAMIENTO

Se utilizó la forma recombinante humana del FGFa obtenida por ingeniería genética (138). El aFGF o el vehículo se administraron en los primeros segundos de la reperfusión miocárdica (116). Los animales tratados con FGFa recibieron 2.6 µg de proteína en 50 µl de PBS 0.1 M con heparina (Rovi) al 0.1% (139), en un bolo único, por la vena yugular y los animales tratados con vehículo recibieron 50 µl de PBS con heparina en la misma proporción y en el mismo tiempo.

La dosis de FGFa utilizada para este estudio se eligió de acuerdo con estudios anteriores de dosis-respuesta que inducen hipotensión (3).

Los animales pretratados con dexametasona (inhibidor específico de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible) (140) recibieron, intraperitonealmente, 3 mg de este corticoide por kilo de peso, antes de inducir la isquemia miocárdica.

HISTOLOGÍA

-MICROSCOPIA ÓPTICA-

Para el estudio histológico hemos utilizado 21 animales: 7 simulados, 7 tratados con vehículo y 7 tratados con FGFa. Los animales fueron perfundidos, retrógradamente, a través de la aorta abdominal con PBS 0.1 M, pH=7.2-7.4, conteniendo heparina (Rovi) al 0.1%, hasta que fluyera, a través de la vena cava inferior, líquido de perfusión desprovisto de sangre. Seguidamente, los animales fueron perfundidos con una solución de 2,3,5- clorhidrato de trifeníl tetrazolio (TTC) (Sigma) al 1% en PBS 20 mM, pH=7.4 a 37°C. La zona del miocardio no infartado se tiñó de color rojo indicando la presencia de un precipitado de formazán que se formó por la reducción del TTC por las deshidrogenasas del tejido viable (141). El tejido infartado presentaba un color amarillo debido al TTC que no reaccionó con las deshidrogenasas.

Después de 5 minutos, el corazón fue fijado con formaldehído (Quimipur) al 4% en PBS, 0.1 M, pH=7.4 y extirpado. El área de riesgo fue separada cuidadosamente bajo el microscopio y se extrajeron diferentes muestras para su postfijación, dejándolo toda la noche en el mismo fijador. Seguidamente las muestras fueron procesadas para microscopía óptica, deshidratando el tejido con alcoholes e incluyéndolo en paraplast. Finalmente, las muestras fueron seccionadas (6 µm) en un microtomo (Leitz) y posteriormente coloreadas con

hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

La estructura del miocardio fue analizada en 8 campos de un mm² de área de 6 secciones diferentes de tejido, separadas cada una por 40 µm.

Los parámetros valorados fueron los siguientes:

- **Necrosis** - Porcentaje de cardiomiocitos necróticos con respecto a los observados en 6 secciones diferentes.
- **Edema** - La extensión y el número de zonas edematosas entre dos células adyacentes, fue cuantificada en cada sección.
- **Capilares congestionados** - Se evaluó el porcentaje de cada 100 capilares observados por sección.
- **Neutrófilos infiltrados** - Número total de neutrófilos fue contado en cada sección.

-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA-

Se utilizaron 8 animales: 4 tratados con vehículo y 4 tratados con FGFa. Los animales fueron perfundidos del mismo modo descrito anteriormente, con una solución de lavado compuesta por: polivinil pirrolidona 40000 (PVP) (Sigma) 25 gr/L, NaCl (Merck) 9 gr/L, Procaina HCl (Merck) 5 gr/L y Heparina (Rovi) al 0.01% en PBS 0.1 M, pH=7.2-7.4. A continuación fueron perfundidos con una solución

de fijación compuesta por: paraformaldehído (Merck) al 4%, glutaraldehído (Merck) al 4%, PVP (Sigma) 25 gr/L en PBS 0.1 M, pH=7.2-7.4. Seguidamente el corazón fue extraído y postfijado toda la noche en el mismo fijador. El ventrículo izquierdo isquémico y el tabique interventricular se disecaron y fueron utilizados como control. Posteriormente se cortó realizando bloques de 100 μ m (40 bloques por ventrículo) y se eligieron 10 bloques de cada pieza para los diferentes estudios.

Para microscopía electrónica y cortes semifinos las piezas de tejido se lavaron con cacodilato sódico (Merck) 0.1 M, pH=7.2 y se postfijaron con tetróxido de ósmio (Sigma) al 1% y ferrocianuro potásico (Sigma) al 3%. Finalmente los fragmentos tisulares se deshidrataron e incluyeron en Epon 812 (Serva) (142).

Una parte de las muestras fue utilizada para cortes semifinos de 1 μ m y coloreadas con azul de toluidina (Merck) al 1%. Otra parte fue procesada para cortes finos de 50-60 nm (Ultramicrotomo LKB IV) y teñidas con acetato de uranilo (Merck) al 5% y citrato de plomo (Merck) al 6%.

Para la localización del calcio en el tejido (143) los animales fueron perfundidos con la misma solución de lavado y una solución de fijación formada por: glutaraldehído (Merck) al 3% y oxalato potásico (Merck) 90 mM ajustando el pH a 7.2-7.4 con hidróxido potásico (Merck) 1 N. Una vez extraído el tejido, fue postfijado toda la noche en el mismo fijador y procesado del mismo modo que

para los estudios de microscopía electrónica. Una vez lavado con oxalato potásico 90 mM, fue postfijado con piroantimoniato potásico (Merck) (que produce un precipitado con el calcio libre) al 2%, ácido acético (Merck) 0.1 ml y centrifugado a 1.000 rpm durante 10 minutos. En esta solución mezclada con tetróxido de ósmio (Sigma) al 2% en proporción 1:1, se incubó el tejido durante 2 horas en la oscuridad a 4°C. Seguidamente la muestra fue lavada con agua desionizada a pH=10.02, deshidratándola con alcohol para su posterior inclusión en Epon 812 (Serva). Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo (LKB IV) a 50-60 nm y teñidos con acetato de uranilo (Merck) al 5% y citrato de plomo (Merck) al 6%, o bien, se dejaron sin teñir. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico (Phillips 301).

El análisis consistió en el estudio por bloque de 5 secciones de cortes semifinos (1 de cada 20 secciones seriadas) y 8 secciones de cortes ultrafinos (1 de cada 20 secciones seriadas). Los parámetros valorados fueron los siguientes:

- **Agrupación de la cromatina** – Porcentaje de 200 células observadas por sección.
- **Edema citosólico** – Porcentaje de 200 células observadas por sección.
- **Capilares dañados** – Porcentaje de 100 capilares observados por sección.
- **Capilares con eritrocitos** – Porcentaje de 100 capilares observados por sección.
- **Capilares con material floculento** – Porcentaje de 100 capilares observados por sección.

- **Edema extracelular entre dos células adyacentes** – Número total de edemas por sección.
- **Células extravasadas** – Número de áreas por sección en las que había acumuladas más de 3 células extravasadas.
- **Depósitos de calcio extracelular** – Número de depósitos por animal en todos los cortes ultrafinos.
- **Alteraciones de la membrana basal y rotura del citoplasma** - Número de alteraciones por animal en todos los cortes ultrafinos.
- **Alteraciones del retículo sarcoplásmico** – Número de alteraciones por animal en todos los cortes ultrafinos.
- **Mitocondrias con depósitos de calcio y cristales anormales** – Número total observado en todos los cortes ultrafinos.
- **Estructura miofibrilar anormal** – Número de estructuras anormales observadas en 100 células seccionadas longitudinalmente en todos los cortes ultrafinos.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD CREATINA QUINASA

La actividad creatina quinasa (CK) es un índice de daño tisular en el miocardio. Para el estudio de esta actividad fueron utilizados 30 animales: 10 simulados, 10 tratados con vehículo y 10 tratados con FGFa. El tejido se extrajo del animal e inmediatamente se congeló a -70°C para su almacenaje. Seguidamente se descongeló y homogeneizó en frío, en un potter con 4-5 ml de PBS 0.1 M, pH=7.3, centrifugándolo a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C (144). Se recogió el sobrenadante, y se procedió a la medición de la actividad creatina quinasa con el Kit CK-NAC-activated 763870 (Boehringer Mannheim). Por último se leyó en un espectrofotómetro a 340 nm (Beckman DU-6). Los datos fueron expresados como UI/mg de proteína mediante el método de Bradford (145). El incremento de CK se obtuvo restando a los valores del ventrículo izquierdo los del septum, y se expresó como diferencia CK.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA

La enzima mieloperoxidasa (MPO) se encuentra localizada en los granos azurófilos de los leucocitos, por lo cual es un índice de la actividad de los neutrófilos (146). Para el estudio de esta actividad fueron utilizados 21 animales: 7 simulados, 7 tratados con vehículo y 7 tratados con FGFa. Los animales fueron perfundidos retrógradamente, por aorta abdominal, con PBS 0.1 M, pH=7.2-7.4, hasta que apareció un fluido claro a través de una incisión en la vena cava inferior (alrededor de 2 minutos), con el fin de eliminar las células sanguíneas que podrían interferir en la reacción. Una vez extraídos los corazones, y separados el septum del ventrículo izquierdo, se congelaron a -70°C . Seguidamente se homogeneizaron en 20 ml de buffer potásico 5mM, pH=6 a 30.000 g durante 30 minutos a 4°C . El pellet fue disuelto, según peso, 1/10 en bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) (Sigma) al 0.5% disuelto en buffer potásico 50 mM, pH=6, a 4°C durante 2 minutos y congelado a -40°C . A continuación se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación con intervalos de sonicación de 10 segundos a 25°C y, fue incubado a 4°C durante 20 minutos y centrifugado a 12.500 g durante 15 minutos a 4°C . Se extrajeron 0.1 ml del sobrenadante que se mezclaron con 2.9 ml de buffer potásico 50 mM que contenía 0.167 mg/ml de dihidrocloruro o-dianisidina (Sigma) y 0.0005% de H_2O_2 (Merck). Seguidamente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 460 nm (Beckman DU-6) (146).

Una unidad de MPO se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1

mmol de peróxido por minuto a 25°C y se expresó como U/g de tejido.

El incremento de MPO se obtuvo restando a los valores del ventrículo izquierdo los del septum y fue expresado como MPO diferencia.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

Para la detección de células apoptóticas utilizamos la técnica del TUNEL (Terminal Deoxynucleotidil Transferase-mediated dUTP Nick end- Labeling). Fueron utilizados 21 animales: 7 simulados, 7 tratados con vehículo y 7 tratados con FGFa. Los animales fueron perfundidos y fijados retrógradamente, por aorta abdominal con PBS 0.1 m, pH=7.2-7.4, conteniendo heparina (Rovi) al 0.1 %, de idéntico modo al descrito anteriormente. En base a la localización del área de riesgo analizada por la técnica del TTC, se seleccionaron regiones del área de riesgo que fueron postfijadas 48 horas, en el mismo fijador, a 4°C para su posterior inclusión en parafina, para obtener cortes transversales de 10 µm en un microtomo (Leitz).

La técnica consistió (148) en la reacción enzimática de la terminal transferasa sobre el ADN nuclear fragmentado, por la cual éste incorpora el mononucleótido dUTP marcado con biotina. Para ello el tejido fue desparafinado a 60°C, durante 30 minutos, con posterior hidratación y permeabilización con metanol-acetona 1:1, durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se consiguió añadiendo a cada dos cortes seriados 5 unidades de enzima terminal transferasa (Nucleósido-trifosfato: DNA deoxinucleotidil transferasa EC 2.7.7.31 Boehringer Mannheim) y 10 µg de biotina-dUTP (Biotina-16-2' deoxiuridina-5' trifosfato Boehringer Mannheim) en un tampón Tris ClH (Sigma) 0.25 mg/ml y cloruro de cobalto (Merck) 1 mM. Los cortes fueron

incubados durante una hora a 37°C en esta solución (*). Posteriormente se trataron con un tampón que interrumpe dicha reacción, consistente en citrato sódico (Merck) 30 mM y cloruro sódico (Merck) 300 mM, pH=7. Para detectar la biotina unida al dUTP incorporado en los fragmentos de ADN, se utilizó el kit de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain, Vector Laboratories). El revelado de la peroxidasa se realizó con H₂O₂ (Merck) al 0.009% y diaminobencidina (Sigma) al 0.05%. Todos los cortes fueron pretratados con H₂O₂ al 2% en un paso previo a la reacción enzimática, con el fin de inhibir la peroxidasa endógena del tejido.

Las células teñidas con la técnica del TUNEL se consideran dañadas en su ADN y, por tanto son células en proceso apoptótico. Las células apoptóticas se reconocieron como miocitos, por la apariencia morfológica de su citoplasma (en secciones contrateñidas con eosina), y en su distribución histológica en el miocardio. Para la cuantificación de los miocitos TUNEL positivos con respecto al número total de miocitos se seleccionaron secciones contrateñidas con hematoxilina, en las que se analizaron como mínimo 20 áreas de 1 mm² de superficie. La relación entre el número de miocitos TUNEL-positivos y el número total de miocitos fue calculada y expresada como porcentaje de miocitos TUNEL-positivos en cada grupo.

(*) Para realizar los controles de la técnica fue incubado el tejido con todos los componentes descritos, excepto la terminal transferasa.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS)

La técnica de la óxido nítrico sintasa se basa en la medición del guanidilmono-fosfato (GMPc) liberado en la célula por la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que produce óxido nítrico (NO), activando a la enzima guanilato ciclasa (GC). Fueron utilizados 28 animales: 7 tratados con vehículo, 7 tratados con FGFa, 7 simulados tratados con vehículo y 7 pretratados con dexametasona (149), con isquemia y tratados con FGFa. El tejido extraído del animal fue inmediatamente congelado a -70°C para su almacenaje. Posteriormente se descongeló para su homogeneización a 4°C en 3 ml de ácido tricloro acético (TCA) (Merck) al 6%. Seguidamente fue centrifugado a 2.000 g durante 20 minutos a 4°C recogiendo el sobrenadante para la medición del GMPc. El pellet fue utilizado para la determinación de proteínas, pudiéndose almacenar a -20°C hasta su utilización.

Es necesario eliminar el TCA de la muestra porque puede interferir en la detección del GMPc. Para ello fue necesario extraerlo con éter dietílico (Panreac) saturado de agua, 4 veces, con 4 veces el volumen de la muestra. Fue agitado con vortex y se separó la capa superior, que corresponde al éter con el TCA (150). A continuación las muestras fueron liofilizadas para la determinación del GMPc por inmunoensayo con Cyclic GMP Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemical).

Para la determinación de proteínas los pellets fueron solubilizados en 1 ml

de hidróxido sódico (NaOH) 1N (Merck) calentándolos al baño maría a 80°C durante una hora con agitaciones periódicas. Seguidamente se centrifugaron a 1.000 g durante 20 minutos, el sobrenadante fue diluido 10 veces con agua destilada. La cantidad de proteínas en mg/ml fue determinada por el método de Lowry (151), expresando la cantidad de GMPc como pmol/mg de proteína.

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO

SINTASA INDUCIBLE (iNOS)

Con el fin de detectar inmunohistológicamente la actividad óxido nítrico sintasa fueron utilizados 6 animales: 2 tratados con vehículo, 2 tratados con FGFa y 2 pretratados con dexametasona y, posteriormente, tratados con FGFa. Los animales fueron perfundidos retrógradamente, como en los estudios previamente mencionados. En base a la localización del área de riesgo analizada por la técnica del TTC, se seleccionaron regiones del área de riesgo que fueron postfijadas 48 horas, en el mismo fijador para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes transversales en un microtomo (Leizt) a 10 μm , montándolos en portas xilanizados, desparafinándolos e hidratándolos para realizar la detección de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el tejido.

La técnica consistió en un primer tratamiento con H_2O_2 al 1% durante 5 minutos, para neutralizar la peroxidasa endógena. Seguidamente se añadió un anticuerpo policlonal primario anti-iNOS (mac NOS; Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky) con una dilución de 1/200 en buffer potásico 0.02 M, pH=7.4, conteniendo Triton X-100 (Boehringer Mannheim) al 0.1%. Después de 48 horas de incubación a 4°C, las secciones fueron tratadas con un anticuerpo secundario biotinizado, seguido de incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories Inv). Finalmente se reveló la peroxidasa con diaminobencidina (DAB) (Sigma) al 0.05% y H_2O_2 al 0.005% y las

secciones fueron contrastadas con hematoxilina.

Para la unión no específica del anticuerpo primario anti-iNOS fueron incubadas secciones paralelas con buffer sin el anticuerpo primario y luego fueron tratadas de forma similar a las otras secciones.

DETERMINACIÓN DE LA FUERZA DE CONTRACCIÓN

Para estudiar la fuerza de contracción fueron utilizados 32 animales: 8 simulados, 8 tratados con vehículo, 8 tratados con FGFa y 8 pretratados con dexametasona y, posteriormente, tratados con FGFa. Los animales fueron sacrificados por decapitación y seguidamente el corazón fue extraído y depositado en una placa Petri conteniendo el medio Tyrode-Burn (*), continuamente gaseado con 95 % de O₂ y 5 % CO₂; pH=7.4, a 25°C. Se diseccionaron dos muestras de ventrículo izquierdo, de un tamaño uniforme, uniéndolas mediante un hilo al transductor de fuerza. Las muestras de ventrículo fueron suspendidas verticalmente en un baño de 8 ml en la solución Tyrode-Burn gaseada con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂; pH=7.4, a 34°C. La tensión en reposo fue ajustada a 1 gr antes de comenzar el experimento y las muestras fueron estabilizadas durante 1 hora. La fuerza de contracción fue detectada con un transductor (Grass FT 03, Warwick RI) y registrada en un programa digital (MacLab 8 AD Instruments Castle Hill, NSWQ 2154, Australia), con un ordenador Macintosh (Apple computer, Cupertino, CA). La fuerza de contracción fue medida en gramos.

Los electrodos de registro fueron introducidos en la capa muscular y el electrodo de estimulación fue situado junto al electrodo de registro, apoyado sobre el ventrículo, sin penetrar en la masa muscular y conectado al estimulador (Stimulator CS-9, Cibertec). La estimulación eléctrica se realizó con pulsos

rectangulares de 5 milisegundos (ms) de duración a una frecuencia de 1 Hertzio (Hz), 100 miliamperios (mA) durante 1 minuto.

(*) El medio Tyrode-Burn está compuesto de: ClNa 149 mM, ClK 2.7 mM, Cl₂Ca. 2 H₂O 3.6 mM, SO₄Mg. 7 H₂O 0.2 mM, P O₄H₂K 0.4 mM, CO₃HNa 11.9 mM y glucosa 5 mM.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los datos se presentan como la media \pm SEM. La significación estadística fue determinada con un análisis de varianza (ANOVA) por medio de un test de Student no pareado considerándose los valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

Resultados

Los resultados obtenidos después de 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión fueron bastante significativos en todos los estudios realizados.

-HISTOLOGÍA

-MICROSCOPIA OPTICA

Las observaciones histológicas de los animales simulados no presentaban infiltración leucocitaria apareciendo algún leucocito en el espacio vascular pero no adherido al endotelio. Los miocitos, en estos animales, aparecían normales con las bandas típicas del músculo estriado cardíaco.

Las preparaciones de los animales tratados con vehículo presentaban una gran infiltración de neutrófilos en el área de riesgo, a todo lo largo del ventrículo. Se observó necrosis de las células miocárdicas y un gran edema, apareciendo, también, eritrocitos extravasados y capilares congestionados (figuras 1, 2 y 3). Con la técnica del tricómico de Masson, los miocitos no viables presentan un citoplasma de color azul verdoso, con necrosis y roturas celulares. En los animales tratados con 2.6 μg de FGFa se observó una gran reducción de los leucocitos de las áreas necróticas en el ventrículo (figuras 4, 5 y 6). Con la técnica del tricómico de Masson, los miocitos tienen una apariencia normal con un color

rosa intenso.

En la tabla siguiente se describen las alteraciones observadas en todos los parámetros estudiados en las distintas secciones, siendo las diferencias muy significativas entre los distintos grupos de animales.

Alteraciones miocárdicas	Ratas IM/R	
	Tratados 2.6 µg FGFa	Vehículo
Necrosis	4.6 ± 1.4	39.6 ± 3.2 ****
Edema	3.6 ± 1.5	27.0 ± 4.1 ***
Capilares congestionados	1.7 ± 1.3	25.9 ± 4.3 ***
Neutrófilos infiltrados	12.7 ± 3.8	133.0 ± 28.0 **

** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001

La estructura del miocardio fue analizada en 8 campos de un mm² de área de 6 secciones diferentes de tejido, separadas cada una por 40 µm. Los parámetros valorados fueron los siguientes:

- **Necrosis** - Porcentaje de cardiomiocitos necróticos con respecto a los observados en 6 secciones diferentes.
- **Edema** - La extensión y el número de zonas edematosas entre dos células adyacentes, fue cuantificada en cada sección.

- **Capilares congestionados** - Se evaluó el porcentaje de cada 100 capilares observados por sección.
- **Neutrófilos infiltrados** - Número total de neutrófilos fue contado en cada sección.

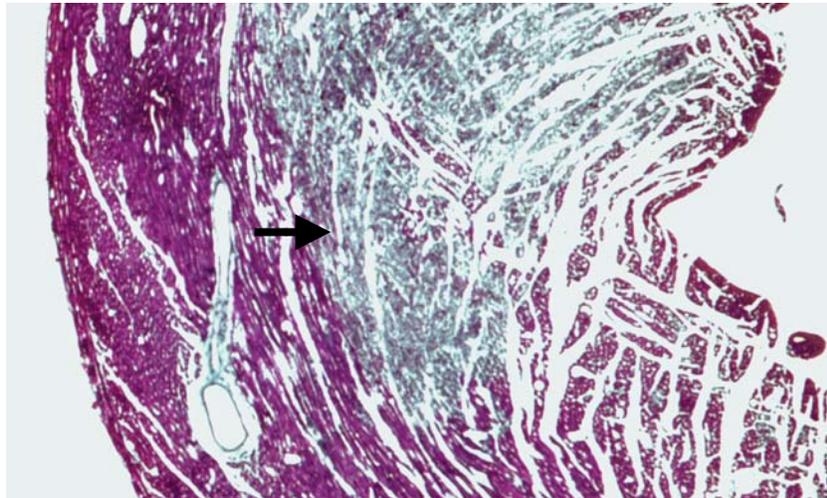


Figura 1

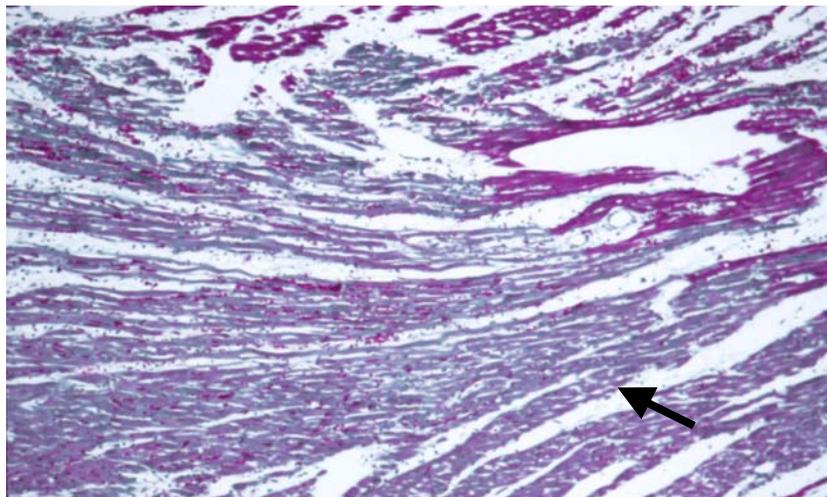


Figura 2

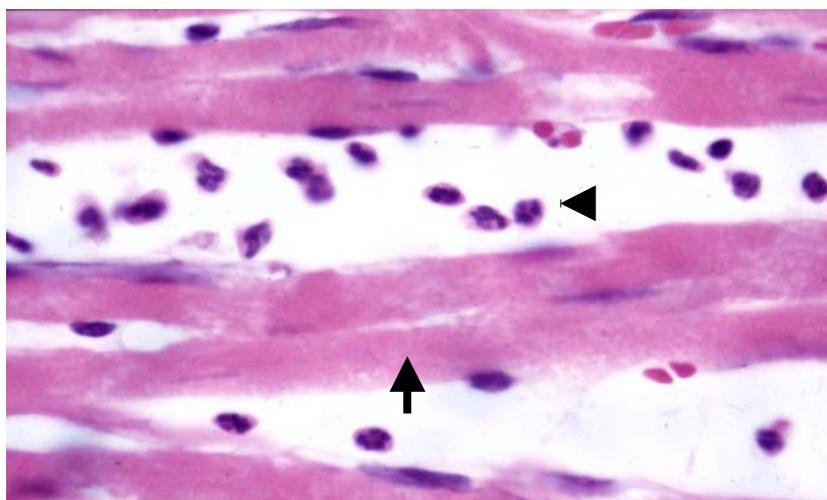


Figura 3

Figura 1: Fotografía de microscopía óptica (x80) de todo el espesor del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con vehículo (PBS con heparina al 0.001 %) y teñido con tricrómico de Masson. Se observan las células dañadas por la isquemia, en color verde. Las células teñidas de rosa son viables.

Figura 2: Fotografía de microscopía óptica (x160) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con vehículo (PBS con heparina al 0.001 %) y teñida con tricrómico de Masson. Se observan las células necróticas, gran infiltración leucocitaria y un gran edema en el tejido. Las células teñidas de rosa son las células viables.

Figura 3: Fotografía de microscopía óptica (x800) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con vehículo (PBS con heparina al 0.001 %) y teñida con hematoxilina-eosina. Se observa una necrosis muy clara con edema intracelular, contracción de las miofibrillas y pérdida nuclear de las células miocárdicas (punta de flecha). Hay una clara infiltración de neutrófilos (flecha), eritrocitos atrapados y edema.

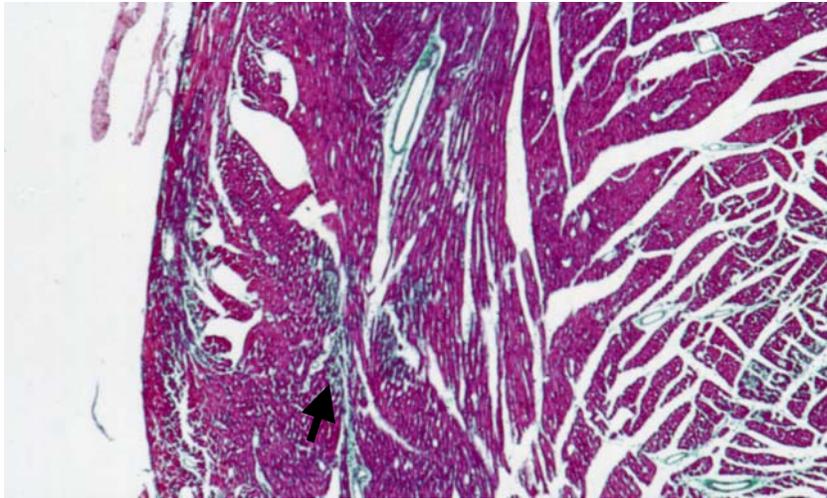


Figura 4

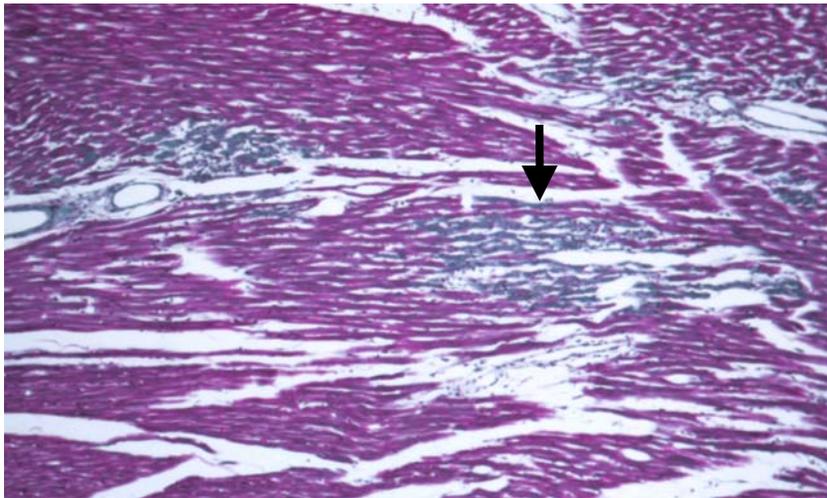


Figura 5

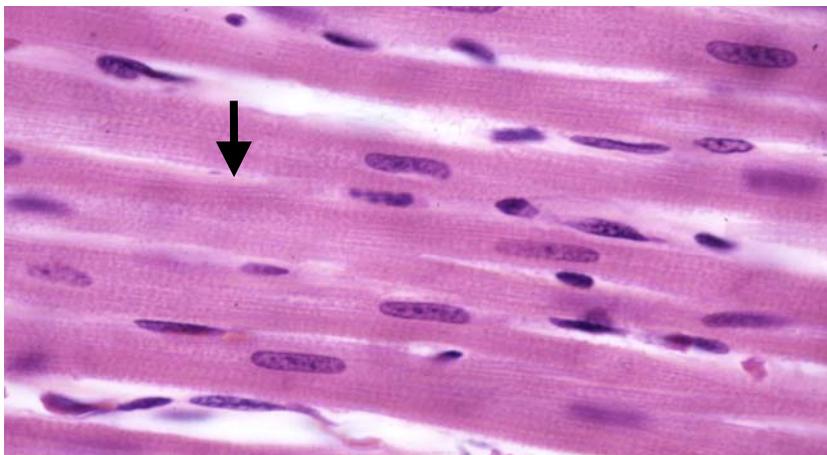


Figura 6

Figura 4: Fotografía de microscopía óptica (x80) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con 2.6 µg de FGFa y teñida con Tricrómico de Masson. Se observan algunas zonas teñidas de verde que serían las células dañadas pero los miocitos, en general, están preservados y tienen una apariencia normal.

Figura 5: Fotografía de microscopía óptica (x160) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con 2.6 µg de FGFa y teñida con tricrómico de Masson. No se observa extravasación de neutrófilos y la mayoría de las células miocárdicas están, aparentemente normales.

Figura 6: Fotografía de microscopía óptica (x800) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con 2.6 µg de FGFa y teñida con hematoxilina-eosina. Se observan células miocárdicas normales, con las estriaciones típicas y los núcleos están bien preservados. Hay escasa infiltración leucocitaria y ausencia de edema.

-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Al microscopio electrónico no se observaron, prácticamente, alteraciones en los animales tratados con 2.6 μg de FGFa (figura 7). Sin embargo, en los animales tratados con vehículo las alteraciones en los miocitos fueron muy evidentes, incluyendo: edema citosólico, contracción de las bandas (con una evidente banda H y una banda I difusa) y rotura de miofibrillas. También se observaron depósitos de calcio (figura 8) y edema entre las miofibrillas. Los capilares presentan alteraciones.

La siguiente tabla presenta las alteraciones detectadas y las diferencias entre los animales tratados con FGFa y los tratados con vehículo, observándose en todos los casos diferencias altamente significativas.

<u>Alteraciones miocárdicas</u>	<u>Tratados 2.6 μg FGFa</u>	<u>Ratas IM/R</u> <u>Vehículo</u>
Agrupación de la cromatina	34.3 \pm 3.5	1.8 \pm 1.1****
Edema citosólico	36.8 \pm 3.9	4.1 \pm 1.3 ***
Capilares dañados	63.1 \pm 5.3	5.2 \pm 2.6 ****
Capilares con eritrocitos	24.9 \pm 4.4	1.8 \pm 1.3 ****
Capilares con material floculento	47.2 \pm 4.2	5.4 \pm 1.8 **
Edema entre dos células adyacentes	28.0 \pm 4.2	3.3 \pm 1.8 **

Células extravasadas	12.4 ± 3.1	1.6 ± 1.2 *
Depósitos de calcio extracelular	65.4 ± 4.3	5.3 ± 1.6 ****
Alteraciones de la membrana basal y rotura del citoplasma	240.0 ± 9.0	4.3 ± 1.9 ****
Alteraciones del retículo sarcoplásmico	720.0 ± 17	105 ± 13 ****
Mitocondrias con depósitos de calcio y cristales anormales	355	5 ****
Estructura miofibrilar anormal	65	16 ****

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001

El análisis consistió en el estudio por bloque de 5 secciones de cortes semifinos (1 de cada 20 secciones seriadas) y 8 secciones de cortes ultrafinos (1 de cada 20 secciones seriadas). Los parámetros valorados fueron los siguientes:

- **Agrupación de la cromatina** – Porcentaje de 200 células observadas por sección.
- **Edema citosólico** – Porcentaje de 200 células observadas por sección.
- **Capilares dañados** – Porcentaje de 100 capilares observados por sección.
- **Capilares con eritrocitos** – Porcentaje de 100 capilares observados por sección.
- **Capilares con material floculento** – Porcentaje de 100 capilares observados por sección.
- **Edema extracelular entre dos células adyacentes** – Número total de

edemas por sección.

- **Células extravasadas** – Número de áreas por sección en las que había acumuladas más de 3 células extravasadas.
- **Depósitos de calcio extracelular** – Número de depósitos por animal en todos los cortes ultrafinos.
- **Alteraciones de la membrana basal y rotura del citoplasma** - Número de alteraciones por animal en todos los cortes ultrafinos.
- **Alteraciones del retículo sarcoplásmico** – Número de alteraciones por animal en todos los cortes ultrafinos.
- **Mitocondrias con depósitos de calcio y cristales anormales** – Número total observado en todos los cortes ultrafinos.
- **Estructura miofibrilar anormal** – Número de estructuras anormales observadas en 100 células seccionadas longitudinalmente en todos los cortes ultrafinos.

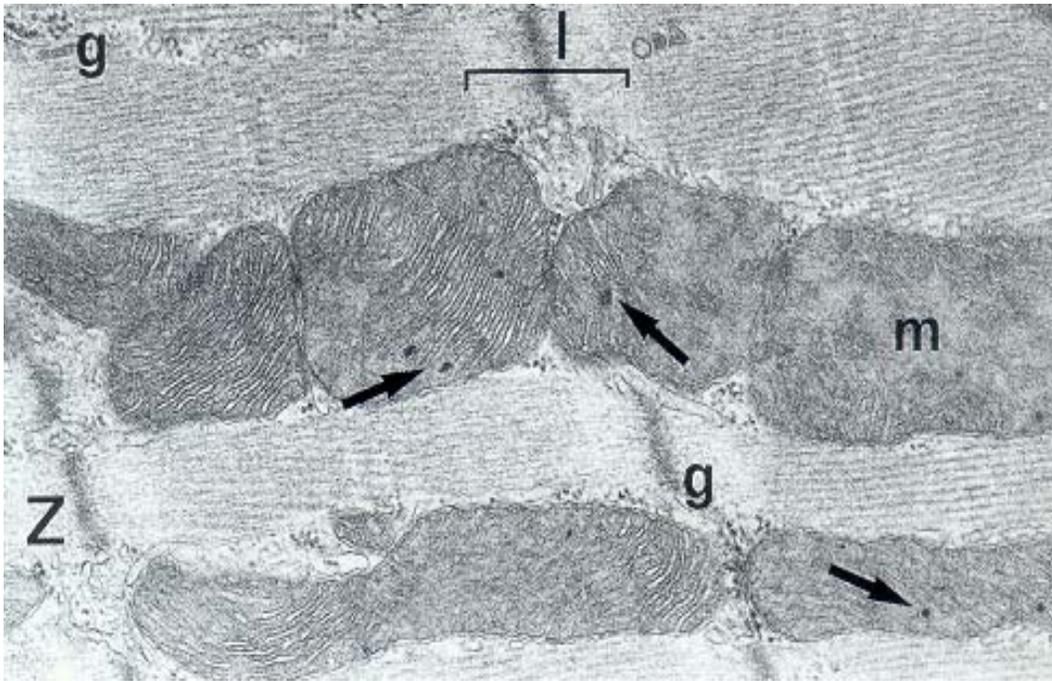


Figura 7

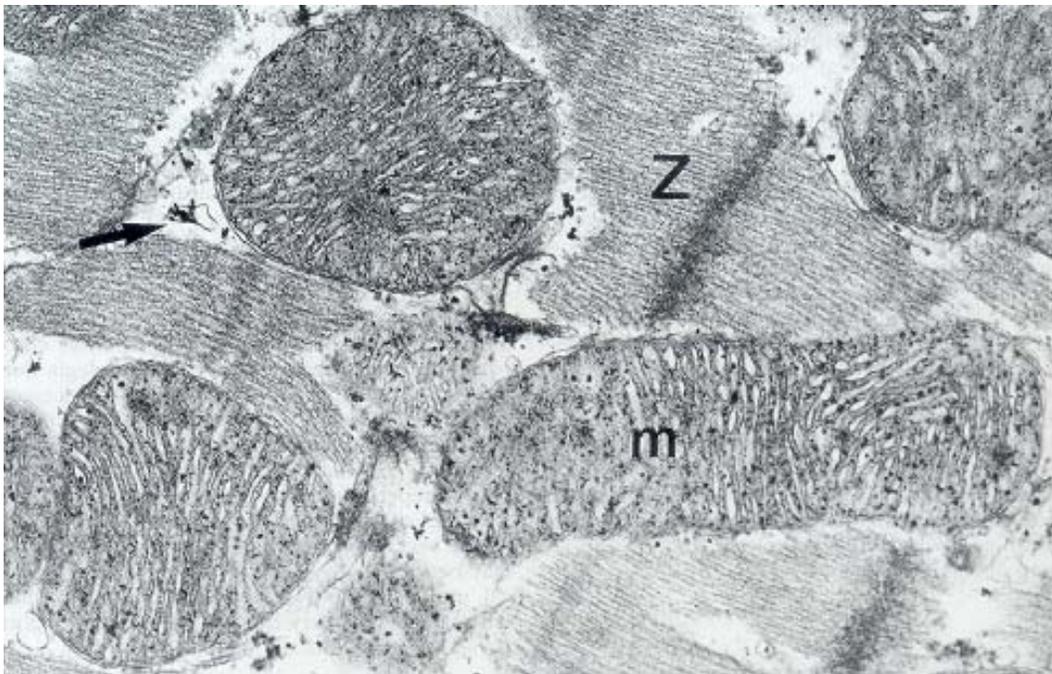


Figura 8

Figura 7: Fotografía de microscopía electrónica (x98000) de una pieza del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con 2.6 µg de FGFa y teñida con la técnica del piroantimoniato para ver los depósitos de calcio. No se observan alteraciones en la célula miocárdica, ni en las mitocondrias. **I:** banda I, **Z:** banda Z, **g:** gránulos de glucógeno, **m:** mitocondria. Las flechas indican gránulos de la matriz mitocondrial.

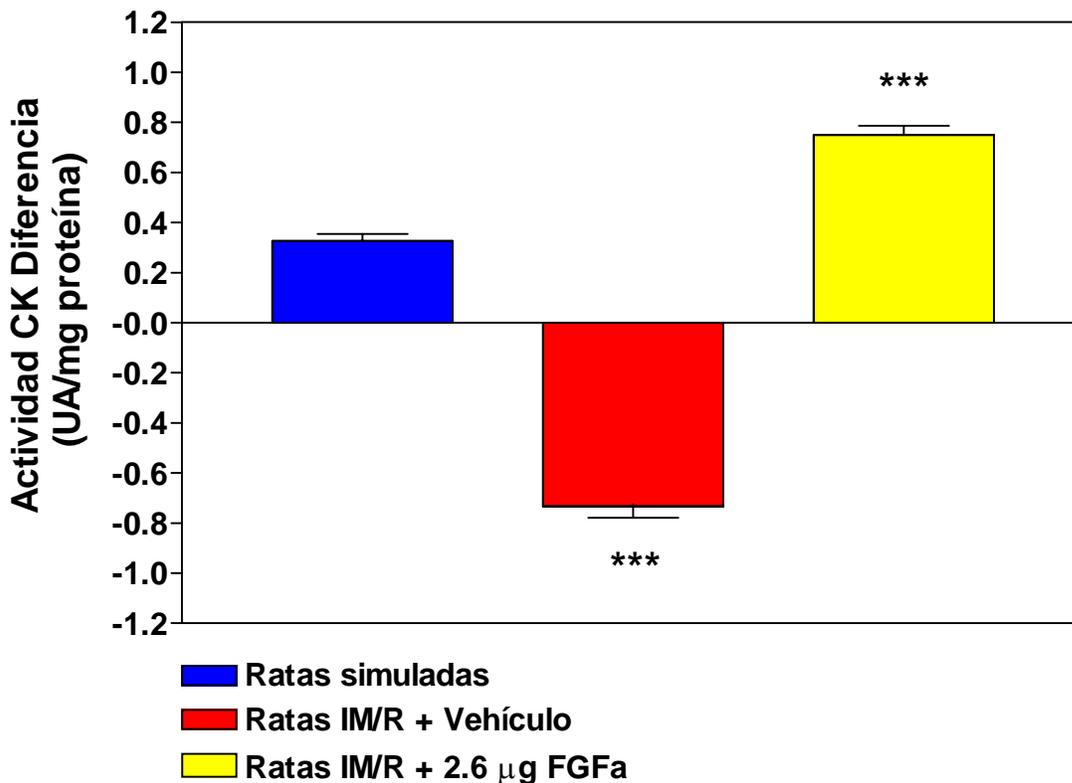
Figura 8: Fotografía de microscopía electrónica (x98000) de una pieza del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con vehículo (PBS con heparina al 0.01 %) y teñida con la técnica del piroantimoniato para ver los depósitos de calcio. Se observan alteraciones en las células miocárdicas con una línea Z contraída, edema entre las miofibrillas y depósitos de calcio que, también, se encuentran en la matriz mitocondrial. **Z:** línea Z, **m:** mitocondria. La flecha indica los depósitos de calcio.

-ACTIVIDAD CREATINA QUINASA (CK)

Los niveles de actividad CK medidos en los corazones presentaron diferencias muy significativas (Gráfica 1). En los animales que no recibieron tratamiento los niveles fueron de -0.733 ± 0.046 UA/mg de proteína, mientras que en los animales simulados fueron de 0.32 ± 0.028 UA/mg de proteína, teniendo pues, un nivel de significación de $p < 0.001$.

Se observaron unas diferencias muy claras entre los animales tratados con FGFa con 0.75 ± 0.036 UA/mg de proteína y los animales sin tratamiento con -0.733 ± 0.046 UA/mg de proteína.

Gráfica 1

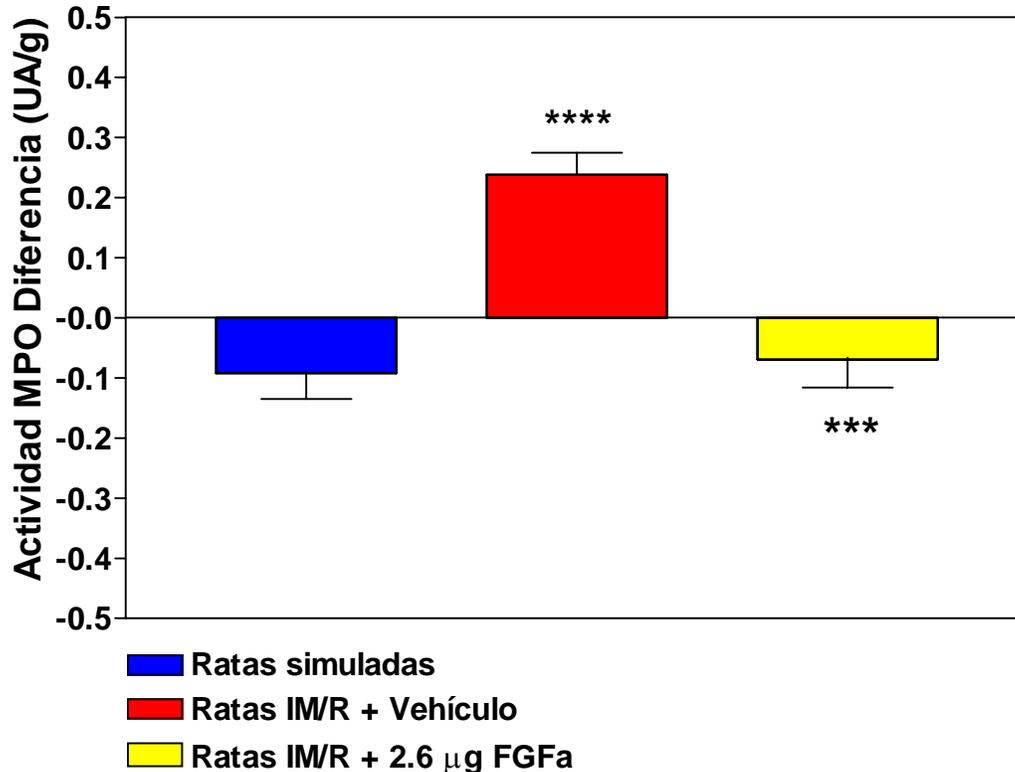


Gráfica 1: Diagrama de barras representando la cantidad de la enzima creatina quinasa, calculada restando el valor en el ventrículo izquierdo el valor en el tabique interventricular, en unidades de absorbancia por mg de proteína, en 30 ratas (10 para cada grupo experimental) sometidas a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. Los valores del contenido enzimático en los distintos grupos fueron: 0.32 ± 0.028 UA/mg de proteína en los animales simulados (sometidos a la misma manipulación quirúrgica que los demás grupos experimentales, pero sin inducir la isquemia) (barra azul); -0.733 ± 0.046 UA/mg de proteína en los animales tratados con vehículo (barra roja); 0.75 ± 0.036 UA/mg de proteína en los animales tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra amarilla). Se observaron diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre los animales simulados y los tratados con vehículo y entre estos y los animales tratados con FGFa.

-ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO)

Los valores de la actividad MPO en el miocardio de los animales simulados (Gráfica 2) fueron de -0.092 ± 0.04 UA/g de tejido y aumentó significativamente en los animales tratados con vehículo hasta 0.237 ± 0.03 UA/g de tejido, con un nivel de significación de $p < 0.0001$. Sin embargo, en los animales tratados con FGFa los valores fueron muy parecidos a los animales simulados (-0.069 ± 0.04 UA/g de tejido) y muy diferentes significativamente de los animales tratados con vehículo ($p < 0.001$).

Gráfica 2

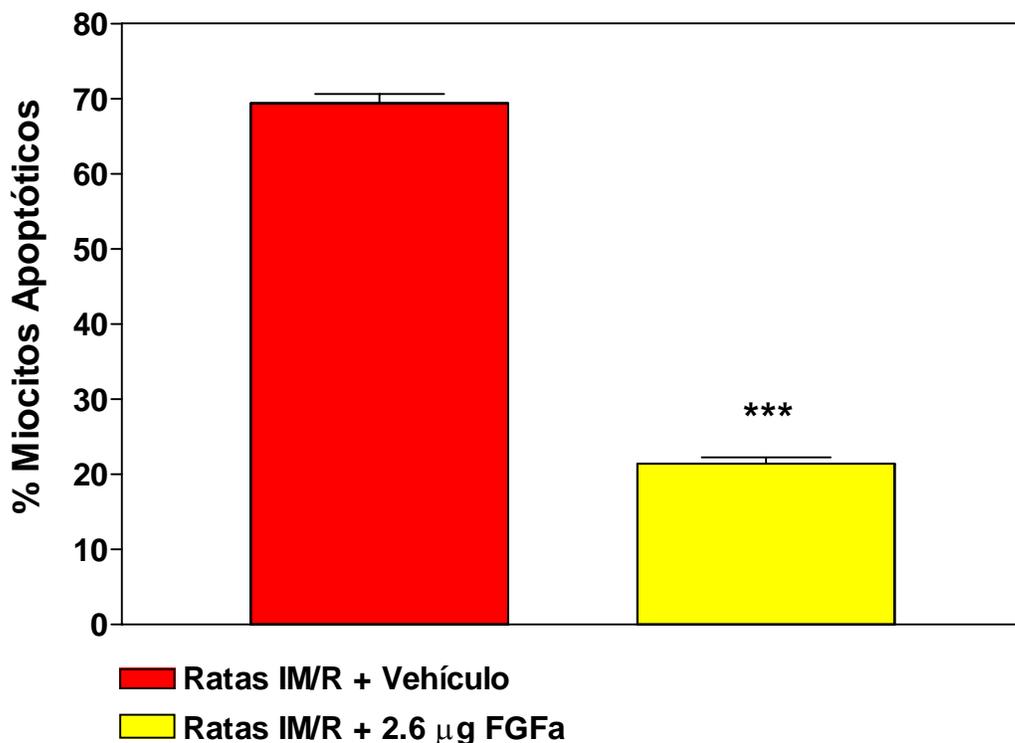


Gráfica 2: Diagrama de barras representando el incremento de la enzima mieloperoxidasa calculada restando al valor en el ventrículo izquierdo el valor en el tabique interventricular, en unidades de absorbancia por gramo de tejido, en 21 ratas (7 para cada grupo experimental) sometidas a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. Los valores de actividad enzimática en los distintos grupos fueron: -0.092 ± 0.04 UA/g de tejido en los animales simulados (sometidos a la misma manipulación quirúrgica que los demás grupos experimentales, pero sin inducir la isquemia) (barra azul); 0.237 ± 0.03 UA/g de tejido en los animales tratados con vehículo (barra roja); -0.069 ± 0.04 UA/g de tejido en los animales tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra amarilla). Se observaron diferencias muy significativas con una $p < 0.0001$ entre los animales simulados y los tratados con vehículo y con una $p < 0.001$ entre los animales tratados con FGFa y los animales tratados con vehículo.

-APOPTOSIS

El análisis y la distribución de la tinción de d-UTP-biotina mostró que los cardiomiocitos son el principal tipo celular que sufre un proceso apoptótico. Sin embargo, algunos leucocitos infiltrados y células endoteliales, también mostraron tinción positiva. Los resultados de la técnica del TUNEL fueron muy significativos (Gráfica 3), ya que en las áreas de riesgo del miocardio sometido a isquemia y reperfusión vimos que el porcentaje de miocitos apoptóticos en los animales tratados con vehículo (Figura 9) alcanza un $69.1 \pm 0.98 \%$ frente a $21.89 \pm 0.67 \%$ en los animales tratados con FGFa ($p < 0.001$) (Figura 10). Por lo tanto, se observó una significativa reducción de los miocitos apoptóticos en los animales tratados con FGFa.

Gráfica 3



Gráfica 3: Diagrama de barras representando el porcentaje de miocitos apoptóticos en 14 ratas (7 de cada grupo experimental) sometidas a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. Los porcentajes de miocitos apoptóticos en los distintos grupos fueron: 69.1 ± 0.98 % de miocitos apoptóticos en los animales tratados con vehículo (barra roja); 21.89 ± 0.67 % de miocitos apoptóticos en los animales tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra amarilla). Las diferencias son muy significativas entre ellos, ya que tienen una $p < 0.001$. Los animales simulados no están representados porque no presentaban apoptosis.

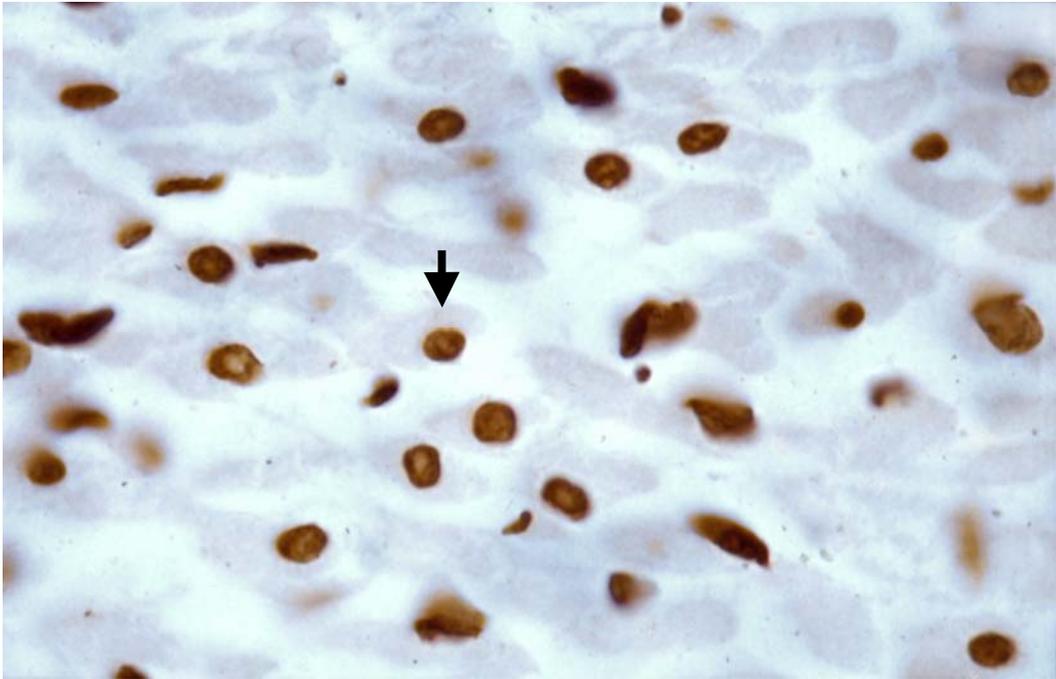


Figura 9

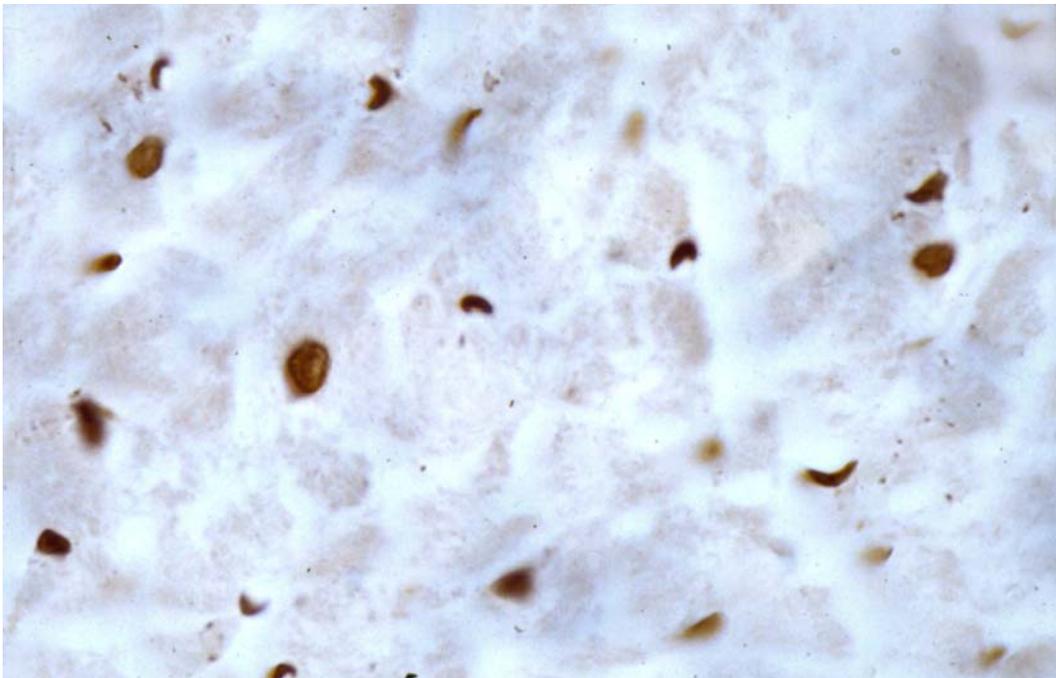


Figura 10

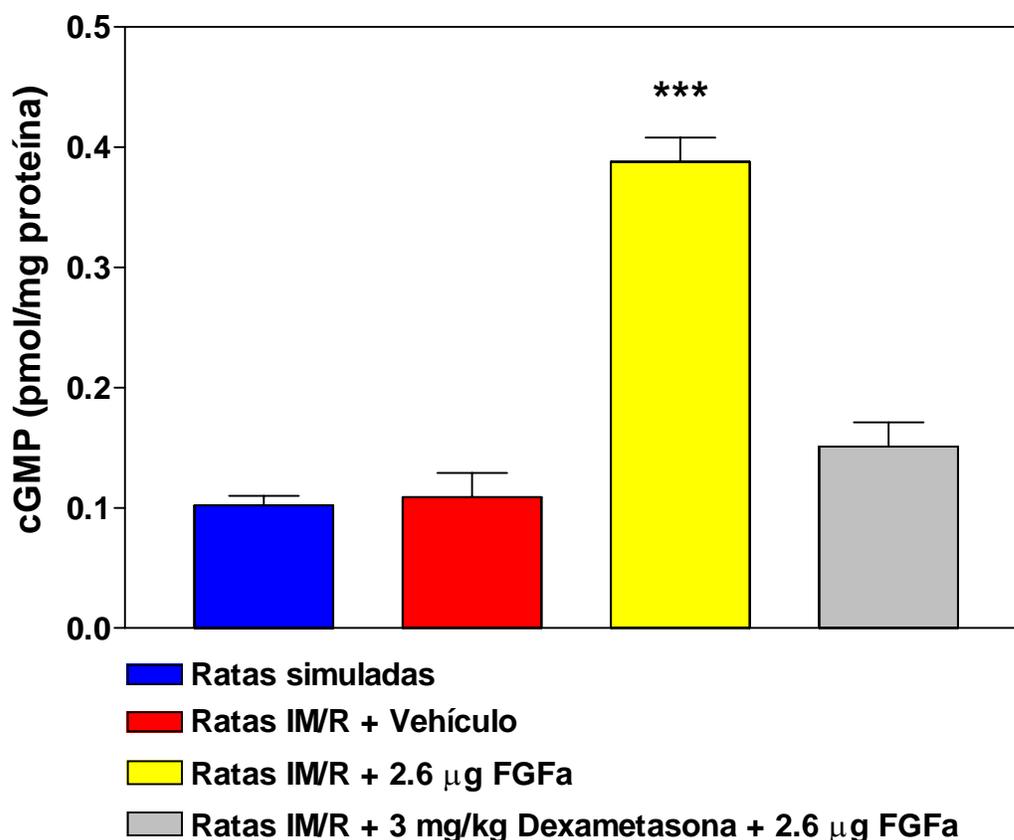
Figura 9: Fotografía de microscopía óptica (x1030) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con vehículo (PBS con heparina al 0.001 %) en la que se ha realizado la técnica del TUNEL para ver células apoptóticas. Se observa un gran número de miocitos apoptóticos. La flecha señala un núcleo apoptótico.

Figura 10: Fotografía de microscopía óptica (x1030) del ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con 2.6 µg de FGFa en la que se ha realizado la técnica del TUNEL para ver células apoptóticas. Se observan pocos núcleos apoptóticos en el área similar a la representada en la figura 9.

-ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS)

Para valorar si el FGFa activa a la enzima óxido nítrico sintasa en nuestro modelo experimental, valoramos los niveles de GMPc en el tejido, ya que es un segundo mensajero en el efecto de esta enzima. Los niveles de GMPc en el miocardio de los animales simulados (Gráfica 4) fueron de 0.102 ± 0.008 pmol/mg de proteína no son significativamente diferentes de los niveles de los animales tratados con vehículo con 0.109 ± 0.02 pmol/mg de proteína. Sin embargo, fueron significativamente diferentes de los tratados con FGFa, 0.388 ± 0.002 pmol/mg de proteína, con un nivel de significación de $p < 0.001$.

Gráfica 4



Estos resultados indican que la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es estimulada por el FGFa. Para intentar dilucidar que tipo de isoforma de óxido nítrico sintasa era estimulada por FGF, varios animales fueron pretratados con 3 mg/kg de dexametasona (inhibidor específico de la enzima óxido nítrico sintasa inducible). Los resultados de los niveles de GMPc en los animales pretratados con dexametasona fueron de 0.151 ± 0.02 pmol/mg de proteína y no diferían significativamente de los animales simulados, ni de los animales isquémicos tratados con vehículo. Sin embargo, sí diferían significativamente de los animales tratados con FGFa con una $p < 0.001$, lo que nos sugiere que la enzima estimulada por FGFa es la óxido nítrico sintasa inducible.

Gráfica 4: Diagrama de barras representando la cantidad de GMPc, en pmol/mg de proteína, que contienen los miocitos como índice de actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se utilizaron 28 animales (7 para cada grupo experimental) que se sometieron a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. Los valores de GMPc en los distintos grupos fueron de: 0.102 ± 0.008 pmol/mg de proteína en los animales simulados (sometidos a la misma manipulación quirúrgica que los demás grupos experimentales, pero sin inducirles la isquemia) (barra azul); 0.109 ± 0.02 pmol/mg de proteína en los animales tratados con vehículo (barra roja); 0.388 ± 0.002 pmol/mg de proteína en los animales tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra amarilla); 0.151 ± 0.02 pmol/mg de proteína en los animales pretratados con dexametasona (inhibidor de la iNOS) y tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra gris). Se observan diferencias muy significativas entre los animales tratados con FGFa y todos los demás con una $p < 0.001$.

DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO

SINTASA INDUCIBLE (iNOS)

Las observaciones histoquímicas indicaron un aumento en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en los animales tratados con 2.6µg de FGFa, en comparación con los animales tratados con vehículo. Los cardiomiocitos de los corazones sometidos a isquemia-reperfusión y tratados con FGFa presentan tinción positiva para iNOS en, prácticamente, todas las células viables del área de riesgo (figura 11). Los miocardios de animales simulados y tratados con vehículo (figura 12) no mostraron inmunotinción en los cardiomiocitos del área de riesgo. Los macrófagos en el área infartada mostraron inmunotinción intensa. Las secciones de miocardio de los animales pretratados con dexametasona no presentan tinción inmunohistoquímica de iNOS y fueron similares a las de los animales simulados (figura 13).

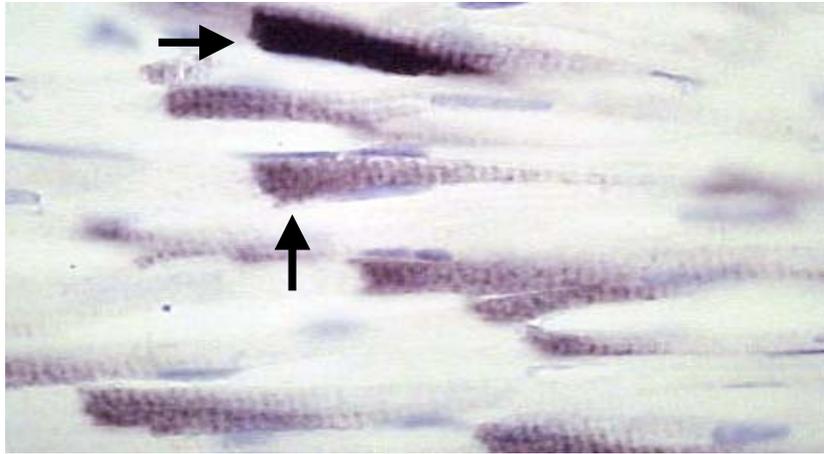


Figura 11

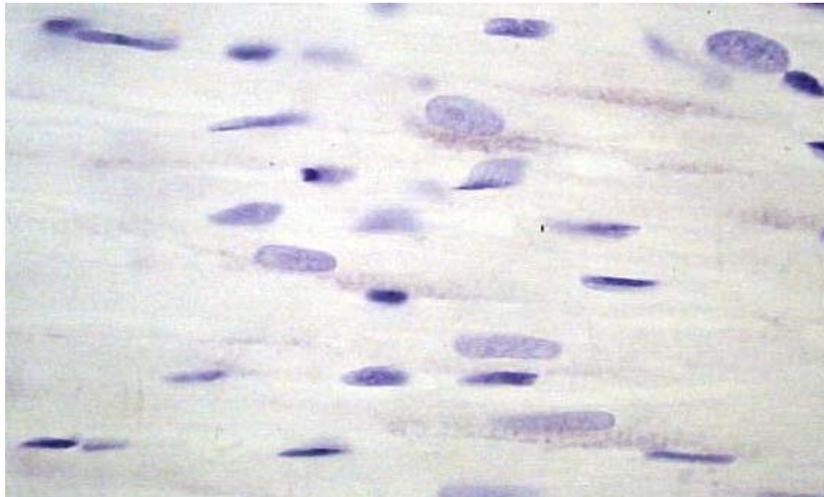


Figura 12

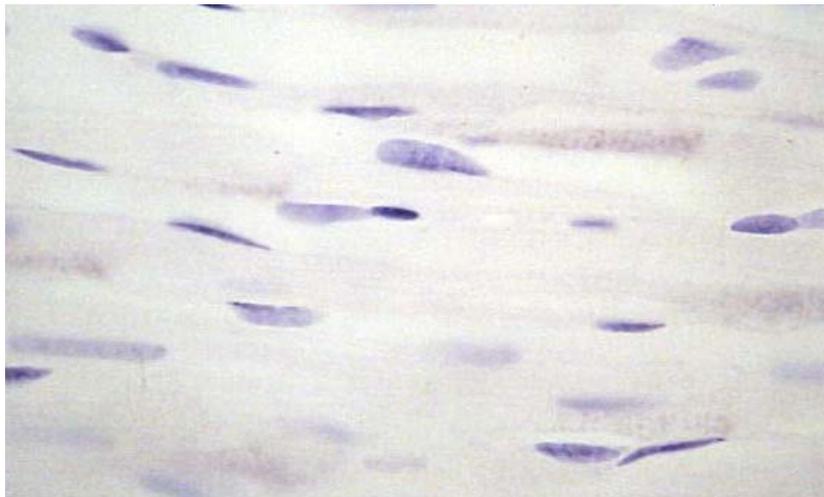


Figura 13

Figura 11: Fotografía de microscopía óptica (x1030) del área de riesgo de ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con 2.6 μg de FGFa, mostrando la identificación inmunohistoquímica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Se observa una tinción muy marcada en el citoplasma de la mayoría de los cardiomiocitos de estos animales.

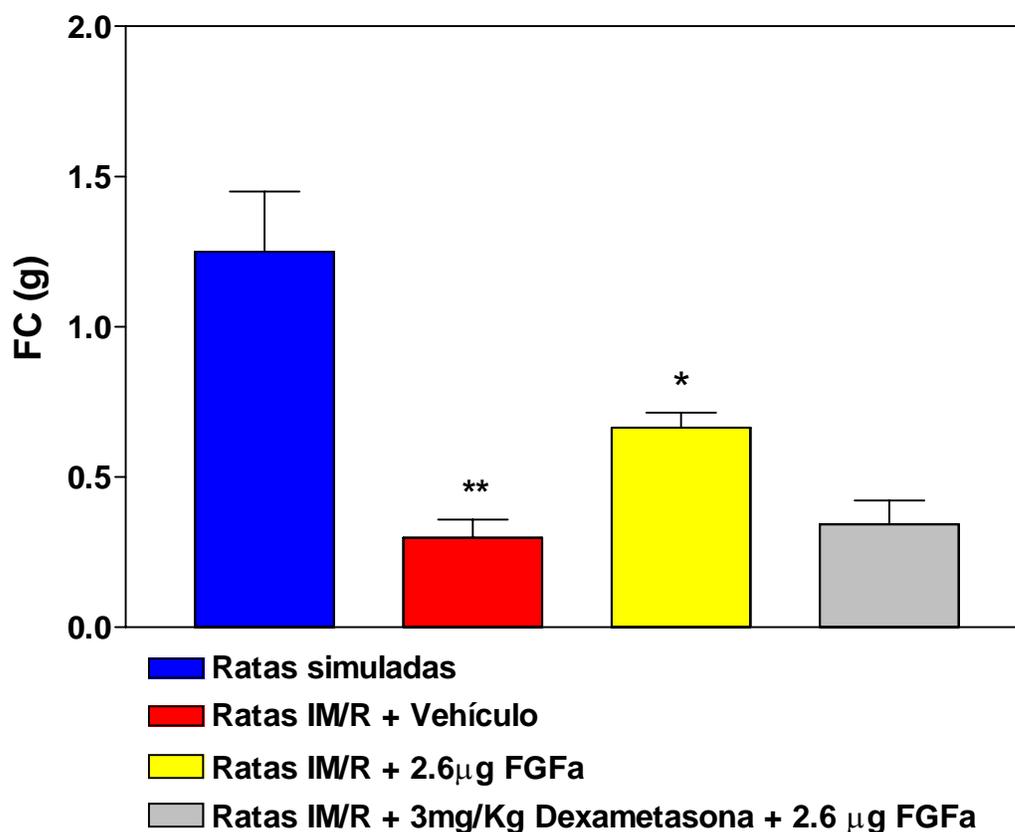
Figura 12: Fotografía de microscopía óptica (x1030) del área de riesgo de ventrículo izquierdo de rata sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, tratada con vehículo, procesada para la inmunodetección de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Se observa una tinción muy leve en el citoplasma de los cardiomiocitos de estos animales.

Figura 13: Fotografía de microscopía óptica (x1030) del área de riesgo de ventrículo izquierdo de rata pretratada con 3 mg/kg de dexametasona (inhibidor de la iNOS), sometida a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión y tratada con 2.6 μg de FGFa. En estos animales, también se observa una muy baja expresión de la iNOS.

FUERZA DE CONTRACCIÓN

Los resultados de los estudios de la fuerza de contracción fueron altamente significativos (Gráfica 5), ya que los animales simulados presentaron una fuerza de 1.25 ± 0.2 g, frente a los 0.298 ± 0.06 g de los animales tratados con vehículo, con un nivel de significación de $p < 0.01$. Sin embargo, en los animales tratados con FGFa la fuerza de contracción se incrementó dos veces con respecto a los tratados con vehículo (0.664 ± 0.05 vs 0.298 ± 0.06 , $p < 0.05$), aunque este valor representó la mitad del valor registrado en los animales simulados.

Gráfica 5



Por otra parte, los animales pretratados con dexametasona presentaron una fuerza de contracción similar a los tratados con vehículo (0.342 ± 0.08 vs 0.298 ± 0.06). Esta aparente inhibición por la dexametasona del efecto protector del FGFa sobre la fuerza de contracción indica, también, una implicación de la iNOS en el mecanismo de protección del miocardio por el FGF.

Gráfica 5: Diagrama de barras representando la fuerza de contracción de los ventrículos de los distintos grupos experimentales valorada en ensayos "in vitro". Se utilizaron 32 animales (8 para cada grupo experimental) que se sometieron a 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. Los valores de fuerza (en gramos) de los distintos grupos fueron: 1.25 ± 0.2 gramos en los animales simulados (sometidos a la misma manipulación quirúrgica que los demás grupos experimentales, pero sin inducirles la isquemia) (barra azul); 0.298 ± 0.06 gramos en los animales tratados con vehículo (barra roja); 0.664 ± 0.05 gramos en los animales tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra amarilla); 0.342 ± 0.08 gramos en los animales pretratados con 3 mg/kg de dexametasona y tratados con $2.6 \mu\text{g}$ de FGFa (barra gris). Las diferencias significativas fueron entre los animales simulados y los tratados con vehículo con una $p < 0.01$ y entre los animales tratados con FGFa y los tratados con vehículo con una $p < 0.05$.

Discusión

Los resultados de nuestros experimentos demuestran que, en este modelo experimental, el FGFa reduce drásticamente el daño producido en el miocardio después de 20 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. Esta protección es comparable, en intensidad y duración, a la que se obtiene en el miocardio con el preconditionamiento isquémico (125).

El preconditionamiento se consigue sometiendo al corazón a breves periodos de isquemia y reperfusión que aumentan la resistencia del miocardio a un periodo isquémico prolongado posterior (123). El preconditionamiento consta de dos fases distintas: la fase temprana que es muy corta (2-3 horas), seguida de una fase tardía que empieza entre 12 y 24 horas y se mantiene hasta, al menos 72 horas (123, 124). La fase temprana del preconditionamiento da lugar a una respuesta inmediata debida a la activación de la proteína G asociada a los receptores de membrana de la célula. La fase tardía del preconditionamiento requiere síntesis de nuevas proteínas e implica la generación de óxido nítrico y la subsecuente activación de la proteína quinasa C y las proteínas tirosina quinasa. Nuestros resultados serían compatibles con los de otros autores que, utilizando una infusión intramiocárdica de FGF, mimifican el efecto de la fase tardía del preconditionamiento isquémico (125).

Varios investigadores han demostrado que el FGF, administrado intracoronariamente o intrapericardialmente, en el corazón de perros y cerdos con isquemia, estimula la angiogénesis provocando una mejora de la función cardiaca

y una disminución del tamaño del infarto (85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93).

En nuestro trabajo, el tiempo transcurrido entre el periodo de isquemia y el procesamiento del corazón para los distintos experimentos es de 24 horas, tiempo claramente insuficiente para producir angiogénesis o regeneración del miocardio. Además, en estudios anteriores en nuestro laboratorio, con una forma truncada del FGFa, llamada no-mitogénica porque no estimula la mitosis en fibroblastos, hemos comprobado la protección del miocárdio en un modelo experimental similar al de este trabajo (115, 116). Otros autores indican que el FGF podría proteger contra el daño en la isquemia miocárdica en un estadio temprano, ya que los corazones tratados con FGF tienen menos lesión inmediatamente después de la isquemia y la reperfusión (117, 118). Estos datos, junto con los de nuestro laboratorio, confirmarían que los efectos del FGF en el miocardio dañado deben ser considerados, en este modelo experimental, como protectores y no como angiogénicos o regeneradores.

Para que el FGF ejerza su efecto cardioprotector, demostrado en este trabajo, es necesario que tenga acceso a las regiones isquémicas en el momento del inicio de la reperfusión, como hemos comprobado en estudios previos (116). Puesto que la vida media de este factor en la sangre es muy corta (menos de 60 segundos, cuando es inyectada con heparina) (152) su administración intravascular debe coincidir con el inicio de la reperfusión. Por otro lado hemos añadido heparina (0.1 % de concentración final) a la solución de FGF utilizada

para el tratamiento, debido a la fuerte afinidad de los FGFs por la heparina y el heparan sulfato (2, 4, 153).

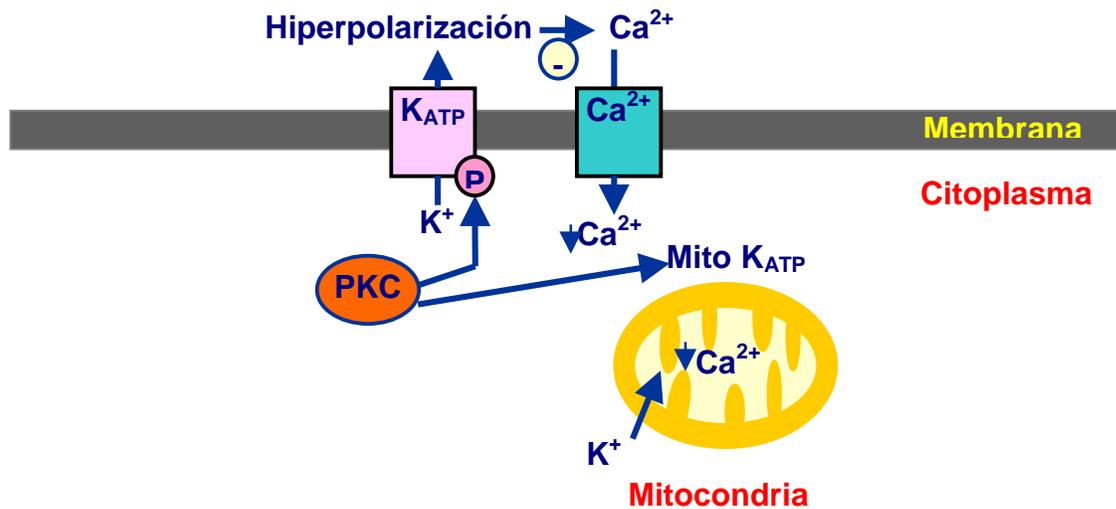
Se ha demostrado que la unión del FGF a heparina o heparán sulfato es imprescindible para que reconozca al receptor tirosina quinasa específico de la superficie celular que es el responsable de la transducción de la señal (154, 155, 156). Por ejemplo, en el caso del efecto mitogénico del FGF, la unión a heparina es absolutamente imprescindible para que tenga actividad (24). También se ha demostrado que la inyección intravenosa de heparina puede proteger del daño producido por el infarto agudo de miocardio (157, 158); sin embargo la cantidad de glicosaminoglicano requerida para que esta protección sea efectiva preservando el miocardio es muy alta (11.000 UI por perro) comparada con la de nuestros experimentos que es 2 UI/Kg. Por lo tanto creemos que la heparina, a estas dosis, no tiene ningún efecto protector sobre el miocardio infartado porque, además algunos autores demuestran que la heparina a altas dosis no tiene efecto para reducir el tamaño del infarto en perros sujetos a 90 minutos de isquemia seguidos de 6 horas de perfusión (159). Por otra parte, en estudios anteriores, realizados en nuestro laboratorio, comprobamos que la administración del vehículo con o sin heparina no tiene efectos ni en la vasodilatación (2) ni en la protección del miocardio infartado (115, 116).

Uno de los posibles mecanismos de cardioprotección del FGF se basa en su capacidad de abrir los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}). Desde

1983 (160) en que se descubrieron estos canales en los miocitos de cerdos, se hipotetizó que estos canales participaban en la actividad eléctrica de la membrana y en el metabolismo del miocardio. Más tarde se ha demostrado que varios compuestos que abren los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) tienen un efecto beneficioso en el miocardio en numerosos modelos de isquemia (161). Experimentalmente se puede bloquear el efecto cardioprotector de los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) con inhibidores de estos canales como la glibenclamida (3, 162, 163, 164).

La salida de potasio fuera de la célula origina la hiperpolarización de la membrana. La apertura de los canales de potasio, al producir la hiperpolarización de la membrana previenen de la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo L y de la bomba de intercambio sodio-calcio e inhiben la liberación del calcio unido a membrana (165, 166, 167, 168). No sólo los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) de la membrana citoplásmica ejercen un efecto cardioprotector sino también, al parecer, los de la mitocondria y los del retículo sarcoplásmico (169).

HIPERPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA PRODUCIDA POR LOS CANALES DE K_{ATP}



Nosotros hemos demostrado, con microscopía electrónica y la técnica del piroantimoniato, que el FGF disminuye significativamente los depósitos de calcio en los cardiomiocitos sometidos a isquemia-reperfusión, tanto en las mitocondrias como en el espacio intracelular. Esta disminución del calcio podría ser debida al efecto del FGF sobre los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}^+), que provocan la despolarización de la membrana previniendo la entrada de calcio. Entre otros mecanismos relacionados con la degeneración de los cardiomiocitos podría estar implicado el aumento de calcio intracelular que sigue a la perfusión (como, por ejemplo la acumulación de calcio en la mitocondria), éste aumento podría activar endonucleasas que romperían el ADN provocando la apoptosis celular (170). Por tanto si, como indican nuestros resultados, el FGF tiene una

función en la homeostasis del calcio en los miocitos del corazón isquémico y reperfundido podría, prevenir la apoptosis en estas células.

Apoptosis y necrosis son dos mecanismos distintos de muerte celular. La necrosis se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana, la digestión tardía del ADN y la lisis celular. La apoptosis ocurre sin rotura de la membrana y se caracteriza por la condensación de la cromatina y la contracción celular con preservación de orgánulos celulares. La secuencia de acontecimientos que ocurren durante la apoptosis requiere energía y sigue un programa determinado internamente que implica la activación de endonucleasas. Estas últimas degradan el ADN de los cromosomas en fragmentos oligosomales que son múltiplos de 180-200 pares de bases, y forman las bandas de ADN características en la electroforesis en gel de agarosa. Además, el programa implica la expresión de múltiples genes que promueven o aumentan la muerte celular y la expresión de genes para proteasas implicados en la destrucción celular (171). Los miocitos cardiacos apoptóticos se distinguen por sus estriaciones características, su inmunoreactividad para la actina muscular y la aparición de miocitos intactos con núcleo hipercromático o fragmentado (172).

Tanto la necrosis como la apoptosis ocurren durante la isquemia (172) y estudios previos demuestran que la reperfusión dispara o acelera la apoptosis (173, 174), ya que la fragmentación del ADN es significativamente mayor después de la isquemia seguida de reperfusión que después de la isquemia sin reperfusión.

En este estudio demostramos con la técnica del TUNEL una reducción drástica de los miocitos apoptóticos en los animales tratados con FGF que podría deberse a la inhibición de la entrada de calcio, como señalamos anteriormente.

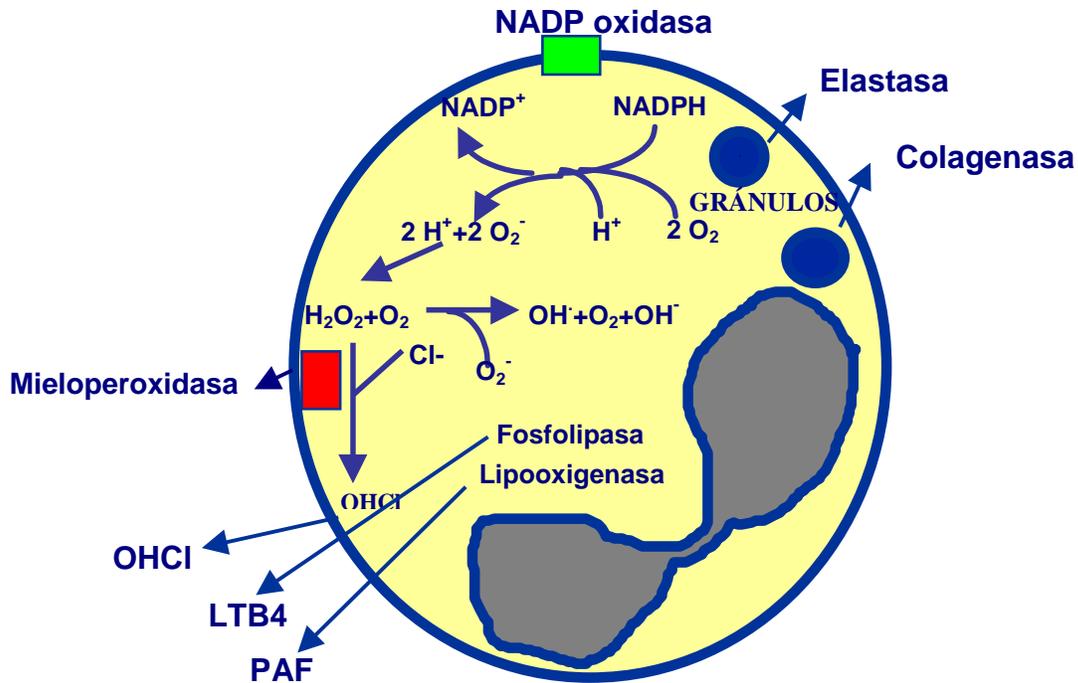
Diversos estudios han demostrado, en distintos tipos celulares, que la privación de FGF de células sensibles a este factor provoca su apoptosis. Este mecanismo autocrino de actuación de FGF es indispensable para mantener la supervivencia celular (175, 176). Además, se ha demostrado que la apoptosis producida por la privación de FGF es prevenida por la oncoproteína Bcl-2 (177) y, que el FGF retrasa la apoptosis aumentando la expresión de Bcl-2 (178, 179), sugiriendo una posible implicación de la interacción FGF-Bcl-2 en la prevención de la apoptosis. Por ejemplo, en células NIH 3T3, si se aumenta el mecanismo de expresión del FGF, aumenta la supervivencia celular y se elevan los niveles celulares de Bcl-2 (180). También, se ha demostrado en cultivos de células endoteliales, que la adición de FGF inhibe la apoptosis por dos tipos de mecanismos: uno dependiente de Bcl-2, induciendo su síntesis y otro mecanismo independiente (179). De forma análoga al papel antiapoptótico ejercido por el FGF sobre el corazón isquémico y reperfundido, estudios recientes demuestran que el preconditionamiento isquémico, también reduce la apoptosis (181), así como la acumulación de neutrófilos (182) por mecanismos todavía no aclarados.

El daño producido en el miocardio infartado se acompaña siempre de

inflamación (183, 184). En esta respuesta inflamatoria se acumulan los neutrófilos en el miocardio isquémico participando activamente en el daño producido por la isquemia y la reperfusión. En nuestros experimentos observamos en los corazones sometidos a isquemia y reperfusión tratados con vehículo, un gran acúmulo de neutrófilos asociado a un importante índice de necrosis en los miocitos.

Los neutrófilos contienen un gran armamento citotóxico y pueden destruir el tejido actuando sinérgicamente con sus gránulos de exocitosis y la generación de radicales libres de oxígeno (185, 186). Estos radicales libres tienen varias vías de generación: se produce la activación de la NADPH oxidasa asociada a la membrana del neutrófilo debido a la entrada brusca de oxígeno y la generación del anión superóxido (O_2^-). Este anión superóxido dismuta a agua oxigenada (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD), el cual a través de la reacción de Haber-Weis, interacciona con los aniones peróxido para formar radicales hidroxilo (OH^-) altamente reactivos.

NEUTRÓFILO ACTIVADO



La mayor parte del estímulo del neutrófilo causa la liberación de los gránulos azurófilos que contienen la enzima mieloperoxidasa (MPO). Ésta toma el agua oxigenada (H_2O_2) catalizando la reacción con cloro para formar ácido hipocloroso (OHCl). Este ácido es un potente oxidante y es el primer responsable de la toxicidad provocada por los neutrófilos (185, 186). Por lo tanto, la enzima MPO es un marcador importante para cuantificar los neutrófilos en el tejido y es un índice de daño tisular. Es por esto por lo que en nuestros experimentos hemos analizado esta enzima, comprobando que con el tratamiento con FGF se reduce drásticamente la cantidad de MPO en el miocardio infartado, evitando los daños que produce la acción de esta enzima.

Los neutrófilos, además, producen una vasoconstricción por la inactivación del óxido nítrico endotelial debido al anión superóxido que producen (187, 188). Los oxidantes derivados de los neutrófilos pueden causar depresión en el transporte de calcio del retículo sarcoplásmico de los miocitos (189) y, en células endoteliales, promueven la liberación de metabolitos proinflamatorios dependientes del ácido araquidónico (190). También, estos radicales libres de oxígeno pueden oxidar a las LDL y multiplicar las propiedades proaterogénicas de los neutrófilos (191). En nuestros experimentos hemos observado que el FGF, además de reducir la infiltración de neutrófilos en el tejido miocárdico, activa la expresión de la enzima iNOS, que produciría un aumento de óxido nítrico. Ambos fenómenos actúan protegiendo de, al menos en parte, los efectos nocivos producidos por los radicales libres, promoviendo la vasodilatación, aumentando el transporte de calcio, evitando la liberación de metabolitos proinflamatorios y la oxidación de las LDL.

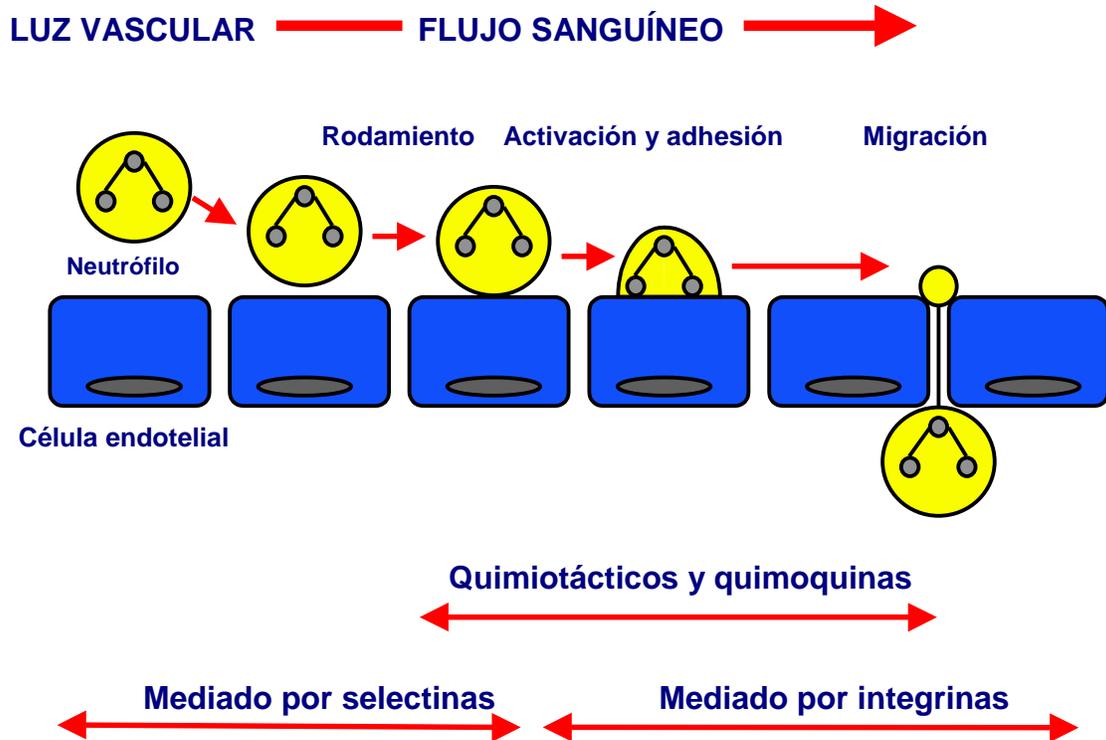
La degranulación de los neutrófilos libera enzimas proteolíticas como la elastasa (187) que, actuando sinérgicamente con los radicales libres (como el ácido hipocloroso producido por la MPO), puede inactivar a las potentes antiproteinasas presentes en el plasma y el fluido extracelular (185, 192). Además, los radicales libres generados por los neutrófilos pueden promover la activación de metaloproteinasas latentes como la colagenasa y la gelatinasa (185, 193). La elastasa puede aumentar el deterioro celular por citólisis (194, 195).

Además, la migración de los neutrófilos a través del endotelio vascular puede ser dependiente de elastasa (196). La fragmentación de las moléculas de la matriz intersticial por colagenasa y elastasa puede generar fragmentos peptídicos que son quimiotácticos para los monocitos (197) provocando un posible aumento de la inflamación en el miocardio isquémico. Como hemos observado en nuestros experimentos, el tratamiento con FGF reduce drásticamente todos estos efectos nocivos sobre el miocardio sometido a isquemia y reperfusión, ya que este factor inhibe o previene la infiltración leucocitaria.

La extravasación de los neutrófilos se produce, al menos, en tres etapas secuenciales (198):

1. Rodamiento inicial del neutrófilo a lo largo del endotelio.
2. Activación del neutrófilo, fortalecimiento de la adhesión y finalización del rodamiento.
3. Migración transendotelial.

EXTRAVASACIÓN DEL NEUTRÓFILO



La infiltración de neutrófilos en el tejido lesionado es un proceso complejo mediado por diversas moléculas.

El rodamiento de los neutrófilos está mediado por moléculas de adhesión de la familia de las selectinas: E-selectinas, L-selectinas y P-selectinas (199). Las selectinas inician el rodamiento y la unión de los neutrófilos circulantes a la superficie endotelial y facilitan la exposición a varios activadores de neutrófilos como: PAF (factor activador de plaquetas) (200, 201) y IL-8 (interleuquina 8) (202,

203).

La unión firme de los neutrófilos a la célula endotelial y la migración transendotelial están mediadas por las integrinas $\beta 2$ (198, 204). Las integrinas se unen a receptores tipo inmunoglobulinas presentes en la célula endotelial, denominadas moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que constituyen las moléculas principales de unión de los neutrófilos al endotelio. La molécula ICAM-1 está regulada por la estimulación de citoquinas (205) y, además, el aumento de la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, después de la exposición del endotelio a radicales libres (206) y a anoxia-reoxigenación, (207) es dependiente de la ICAM-1.

Los miocitos cardiacos adultos expresan la ICAM-1 después de la estimulación con citoquinas (208) o linfocitos cardiacos postisquémicos (209). La adhesión de neutrófilos a estas células es dependiente de la ICAM-1 (208, 209). La adherencia de los neutrófilos a los miocitos cardiacos, estimulados por citoquinas, activa la explosión respiratoria que da lugar a la oxidación del miocito. La anoxia-reoxigenación del miocito parece depender de la ICAM-1, ya que se ha encontrado inducción de ARNm de la ICAM-1 en el corazón postisquémico durante la reperfusión temprana (210). La reperfusión rápida induce la expresión de ARNm de ICAM-1 en la zona miocárdica viable alrededor de las regiones necróticas (asociada a una infiltración intensa de neutrófilos) (211). La acumulación de neutrófilos se acelera con la reperfusión, ocurre preferentemente

en la región subendocárdica (212, 213) y se correlaciona con el tamaño del infarto (214), como hemos observado en nuestros experimentos. Es posible que el efecto antiinflamatorio del FGF observado en nuestros resultados en el miocardio isquémico y reperfundido esté mediado, en parte, a través de la regulación de la expresión o función de algunas de las moléculas referidas en este apartado, que tiene importantes efectos sobre los neutrófilos.

Los neutrófilos, más grandes y mucho más rígidos que los eritrocitos, participan en el fenómeno de "no-reflujo" vascular, contribuyendo a la oclusión vascular. El atrapamiento de los neutrófilos en los microvasos miocárdicos puede aumentar debido a otras alteraciones microvasculares postisquémicas como: la agregación de neutrófilos y la reducción de la presión de perfusión miocárdica. En nuestros experimentos, al reducirse drásticamente la cantidad de neutrófilos en el miocardio isquémico y reperfundido de los animales tratados con FGF se evitaría el atrapamiento de los neutrófilos y, por lo tanto, el fenómeno de "no reflujo" con sus efectos nocivos para el tejido.

Se ha demostrado que la disminución de la liberación basal de óxido nítrico por las células endoteliales después de la isquemia miocárdica podría promover la adherencia de neutrófilos (215, 216). Estos trabajos son importantes para la interpretación de nuestros resultados, pues nos permiten inferir que, probablemente, el FGF inhibe la infiltración leucocitaria a través de su efecto promotor de la síntesis de óxido nítrico. Tanto los resultados obtenidos de la

valoración del GMPc, como de la inmunodetección de iNOS en los corazones tratados con FGF, apoyan esta posibilidad.

Las enzimas óxido nítrico sintasa (217, 218) están presentes en los miocitos cardiacos, y el óxido nítrico puede regular la expresión y la adhesión de moléculas a estas células y a las células endoteliales. En este aspecto, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico da lugar a un incremento de la adherencia de neutrófilos a vénulas postcapilares, pudiendo ser prevenida con óxido nítrico exógeno (219). También se ha demostrado, en un modelo de isquemia-reperfusión en el bazo, que la administración de óxido nítrico reduce el rodamiento del neutrófilo, mediado por la P-selectina, a lo largo del endotelio (220). Otros autores han descrito que el aumento de los niveles de óxido nítrico con donadores del mismo reduce la expresión de la ICAM-1 en cultivo de células endoteliales de aorta humana (221).

A semejanza con nuestros propios resultados, otros estudios han demostrado que el FGF preserva la liberación de óxido nítrico en los microvasos coronarios (222, 223). Por otro lado, el FGF puede tener un papel en la expresión de las moléculas de adhesión como las integrinas (223, 224).

En resumen, proponemos que un posible mecanismo de protección del FGF en el miocardio isquémico reperfundido está mediado por la estimulación por este factor de la liberación de óxido nítrico, evitando la acumulación de los

neutrófilos (216, 219). También podría evitar el rodamiento del neutrófilo mediado por las selectinas y la agregación plaquetaria (220, 226) y reducir la expresión de la ICAM-1 (222).

Recientemente se ha descrito que el óxido nítrico activa los canales dependientes de ATP (K_{ATP}) de la mitocondria (227), por lo que, según lo descrito anteriormente, el FGF podría abrir los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) a través de dos mecanismos distintos: uno, directo, debido a la unión a su receptor, activando a la proteína quinasa C, y otro, indirecto, a través de la activación de la iNOS, dando lugar al óxido nítrico.

Según el esquema siguiente el óxido nítrico, cuya generación puede ser estimulada por el FGF, produciría:



Nuestros resultados demuestran un aumento claro en la expresión de iNOS en los miocitos de los corazones isquémicos y reperfundidos tratados con FGF. Según demuestran otros autores la regulación de esta enzima es de principal importancia en la prevención del daño miocárdico.

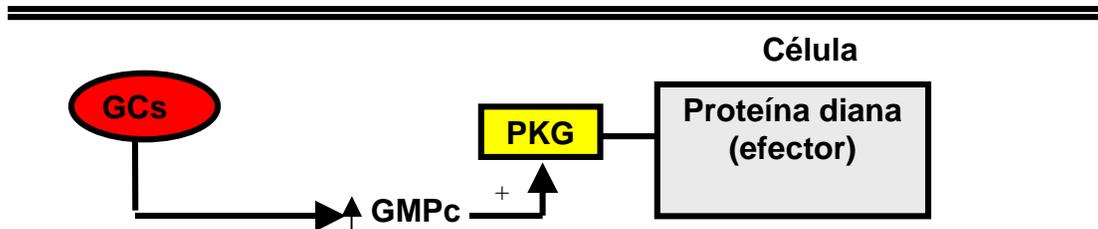
En el corazón existen tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (171): NOS neuronal (nNOS, NOS1), NOS inducible (iNOS, NOS2), NOS endotelial (eNOS, NOS3). Todas utilizan, como sustrato, L-arginina para formar L-citrulina y óxido nítrico, y necesitan como cofactores NADPH y tetrahidrobiopterina (THB₄). Las dos sintasas constitutivas (nNOS, eNOS) requieren calcio y calmodulina como cofactores y generan bajas cantidades de óxido nítrico. La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) no requiere calcio ni calmodulina como cofactores y genera grandes cantidades de óxido nítrico.



El óxido nítrico liberado por las células interacciona con la guanil ciclasa soluble (GCs) para incrementar la formación de GMPc en las células diana, que

actuaría como mediador de sus efectos biológicos, a través de la proteína quinasa G (PKG).

ACTIVACIÓN DE LA GUANILATO CICLASA



Recientemente, se ha descrito, en estudios de preconditionamiento isquémico, que el mecanismo de protección del miocardio actuaría a través de la inducción de la enzima NOS. Bolli y colaboradores, en sus estudios de preconditionamiento miocárdico, llegan a la conclusión de que el factor responsable de la protección es la iNOS (127, 128, 228, 229).

Estos autores, utilizando ratones deficientes en iNOS sometidos a isquemia cardiaca y reperfusión, demuestran que la iNOS es responsable del mecanismo de cardioprotección en la fase tardía del preconditionamiento (132). Recientemente, también, demostraron que existe una respuesta bifásica en la actividad de la enzima NOS en el corazón sometido a preconditionamiento isquémico, de tal manera que se produciría una activación inmediata de la eNOS, seguida de una activación tardía de la iNOS que dispararía la señal generadora

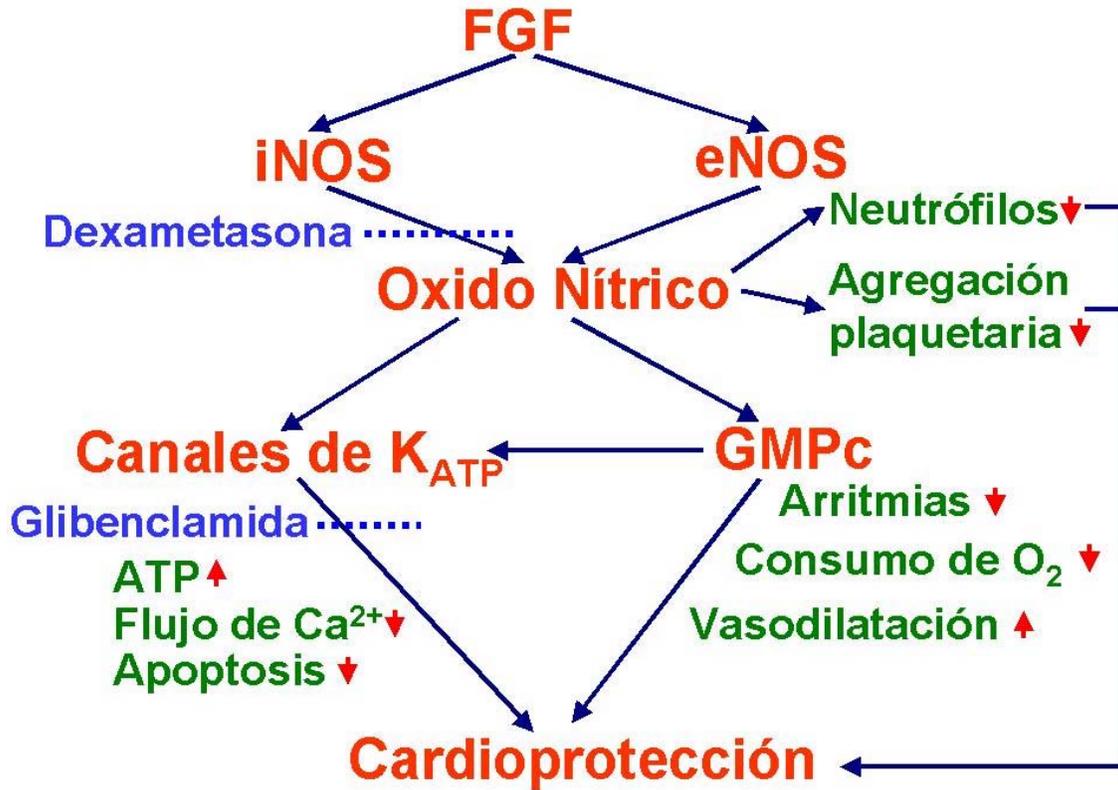
de óxido nítrico y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (230). Otros estudios, utilizando este mismo tipo de ratones, demuestran que el FGF reduce el aturdimiento cardíaco producido por la isquemia-reperfusión (231) a través de su acción de estimulación de la iNOS. Este mismo mecanismo de acción podría explicar la protección debida al FGF sobre las arritmias de perfusión, observada en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (131). Estos datos estarían en concordancia con nuestros resultados, ya que nosotros comprobamos que el FGF aumenta la expresión de la iNOS en el corazón sometido a isquemia y perfusión, y por tanto parece actuar de forma similar al acondicionamiento isquémico y protegiendo al miocardio infartado.

La iNOS es una enzima que tradicionalmente fue descrita como mediadora del daño tisular (232, 233). Sin embargo, los resultados de Bolli conjuntamente con los nuestros pueden cambiar la calificación de la iNOS como citotóxica. Actualmente, se considera que el papel fisiológico de esta enzima es mucho más complejo. Parece ser que puede jugar un papel beneficioso o perjudicial dependiendo de la intensidad de su inducción (132).

De acuerdo con nuestros resultados, el FGF, activando la inducción de la iNOS, podría proteger el miocardio isquémico de la misma forma que el acondicionamiento. Esta inducción sería lo suficientemente baja para proteger el miocardio y no aumentar el daño tisular.

En el siguiente cuadro se resume la cardioprotección producida por el FGF.

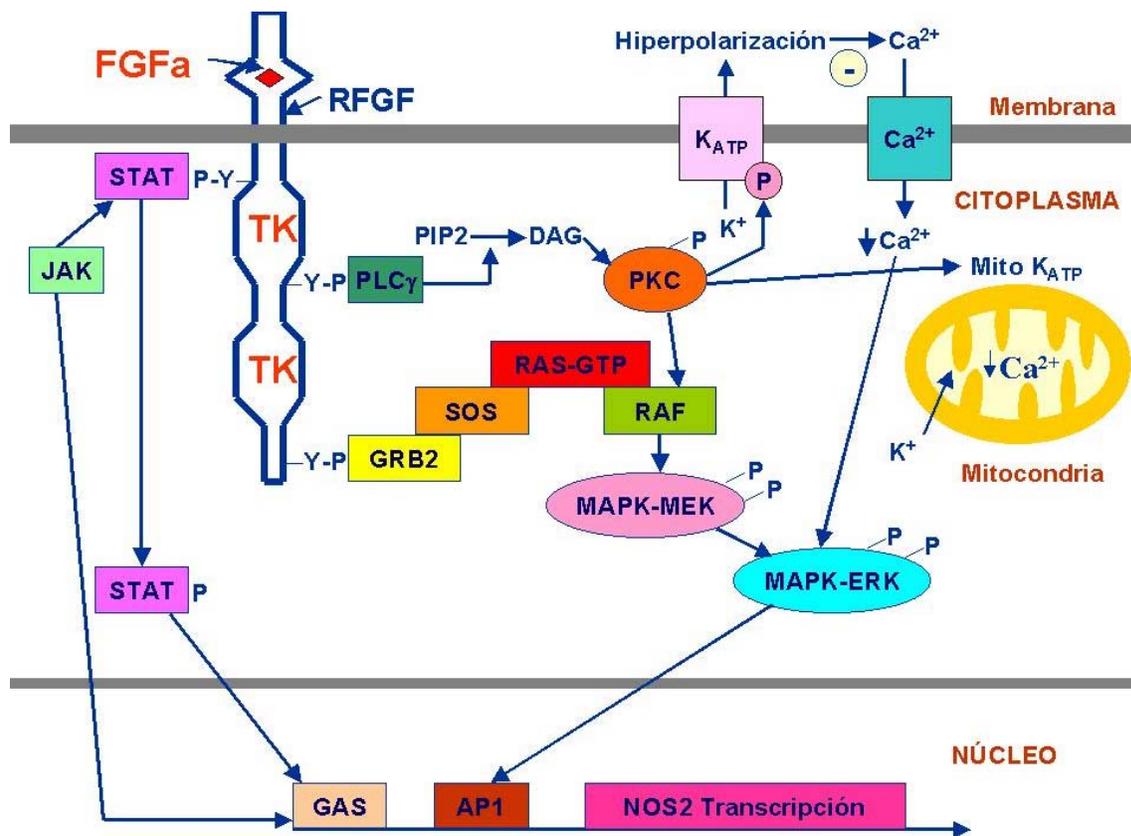
CARDIOPROTECCIÓN PRODUCIDA POR FGF



Proponemos que la cardioprotección ejercida por el FGF estaría mediada por su unión a su receptor tirosina quinasa específico (234) que fosforila a la proteína quinasa C (PKC) y a toda la cascada de quinasas, activando los factores de transcripción.

Experimentalmente se ha demostrado que la activación del receptor tirosina quinasa específico por FGF infundido en el miocardio isquémico produce la activación de la cascada de quinasas y de la proteína quinasa C (PKC), protegiendo de la misma forma que el preconditionamiento miocárdico (125).

Acción del FGF



AP1: Factor de transcripción.

Ca²⁺: Calcio libre.

DAG: Diacilglicerol.

GAS: Factor de transcripción.

GRB2: Proteína adaptadora.

JAK: Proteína que se transloca al núcleo y activa la transcripción.

K⁺: Potasio libre.

K_{ATP}: Canal de potasio dependiente de ATP de la membrana plasmática.

MAPK-ERK: Proteína serina-treonina quinasa que se transloca al núcleo para fosforilar factores de transcripción.

MAPK-MEK: Proteína serina-treonina-tiroxina quinasa.

Mito K_{ATP}: Canal de potasio dependiente de ATP de la membrana de la mitocondria.

PIP2: Fosfatidil inositol.

PKC: Proteína quinasa C.

PLC_γ: Fosfolipasa C gamma.

RAF: Proteína efectora de RAS.

Ras-GTP: Proteína interruptor de la cascada de quinasas.

SOS: Intercambiador de nucleótidos GDP/GTP.

STAT: Proteína citoplásmica que se transloca al núcleo y activa la transcripción.

Conclusiones

Este trabajo experimental demuestra que el FGF protege el miocardio isquémico sometido a 20 minutos de isquemia seguido de 24 horas de reperfusión.

La protección del miocardio isquémico por el FGF se produce a través de varios mecanismos:

1. Regulación de los canales de potasio dependientes de ATP (K^+_{ATP}) provocando una hiperpolarización de la membrana que:
 - a) Evita la entrada de calcio en la célula.
 - b) Aumenta la reserva de ATP.
 - c) Disminuye la apoptosis.

2. Inducción de la enzima óxido nítrico sintasa que a través de su producto, el óxido nítrico:
 - a) Disminuye la agregación plaquetaria en el miocardio.
 - b) Disminuye la acumulación de neutrófilos en el miocardio.
 - c) Reduce las arritmias.
 - d) Aumenta la vasodilatación coronaria.
 - e) Disminuye el consumo miocárdico de oxígeno.

Bibliografía

1. **Sporn M.B., Roberts A.B.** (1988) Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*. 332: 217-219.
2. **Giménez-Gallego G., Cuevas P.** (1994) Fibroblast growth factor, proteins with a broad spectrum of biological activities. *Neurol. Res.* 16: 313-316.
3. **Cuevas P., Carceller F., Ortega S., Zazo M., Nieto I., Giménez-Gallego G.** Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science*. 254: 1208-1210.
4. **Baird A., Böhlen P.** (1990) Fibroblast growth factors. In: Sporn M.B., Roberts A.B. (Eds). *Peptide growth factors*. Springer-Verlag, New York: 369-417.
5. **Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L., Neufeld G.** (1987) Structural characterisation and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8: 95-114.
6. **Trowell O.A., Chir B., Willmer E.N.** (1939) Growth of tissues in vitro. VI. The effects of some tissue extracts on the growth of periosteal fibroblasts. (1939) *J. Exp. Biol.* 16: 60-70.
7. **Hoffman R.S.** (1940) The growth-activating effect of extracts of adult and

- embryonic tissues of the rat on fibroblast colonies in culture. *Growth*. 4: 361-376.
8. **Armelin H.A.** (1973) Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70: 2702-2706.
 9. **Gospodarowicz D.** (1974) Localization of a fibroblasts growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*. 249: 123-127.
 10. **Gospodarowicz D., Moran J.** (1974) Effect of a fibroblast growth factor in the control of 3Y3 growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70: 2702-2706.
 11. **Thomas K.A., Riley M.C., Lemmon S.K., Baglan N.C., Bradshaw R.A.** Brain fibroblast growth factor: non-identity with myelin basic protein fragments. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 5517-5520.
 12. **Gambarini A.G., Armelin H.A.** (1982) Purification and characterisation of an acidic fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J. Biol. Chem.* 257: 9692-9697.
 13. **Thomas K.A., Rios-Candelore M., Fitzpatrick S.** (1984) Purification and characterisation of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 357-361.

14. **Bhölen P., Baird A., Esch F., Ling N., Gospodarowicz D.** (1984) Isolation and partial molecular characterisation of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5364-5368.
15. **Shin Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsbrun M.** (1984) Heparin affinity: purification of a tumour-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 223: 1296-1299.
16. **Baird A., Esch F., Mormede P., Ueno N., Bölen P., Ying S.Y., Wehrenberg W.B., Guillemin R.** (1986) Molecular characterisation of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. *Rec. Prog. Horm. Res.* 42: 143-205.
17. **Thomas K.A., Giménez-Gallego G.** (1986) Fibroblast growth factor: Broad-spectrum mitogens with potent angiogenic activity. *Trends Biochem. Sci.* 11: 81-84.
18. **Dickson C., Acland P., Smith R., Dixon M., Deed R., MacAllan D., Walter W., Fuller Pace F., Kiefer P., Peters G.** (1990) Characterisation of Int-2: A member of the fibroblast growth factor family. *J. Cell Sci. Suppl.* 13: 87-96.
19. **Paterno G.D., Gillerpie L.L., Dixon M.S., Slack J.M., Heat J.K.** (1989)

Mesoderm-inducing properties of Int-2 and KFGF: two oncogene-encoded growth factors related to FGF. *Development*. 106: 79-83.

20. **Kirikoshi H., Sagara N., Saitoh T., Tanaka K., Sekihara H., Shiokawa K., Katoh M.** (2000) Molecular cloning and characterisation of human FGF-20 on chromosome 8p21.3-p22. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274 (2): 337-343.

21. **Giménez-Gallego G., Rodkey J., Bennett C., Rios-Candelore M., DiSalvo J., Thomas K.** (1985) Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete aminoacid sequence and homologies. *Science*. 230: 1385-1388.

22. **Zhu X., Komiya H., Chirino A., Faham S., Fox G.M., Arakawa T., Hsu B.T., Rees D.C.** (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*. 251: 90-93.

23. **Thomas K.A.** (1988) Transforming potential of fibroblast growth factor genes. *Trends. Biochem. Sci.* 13: 327-328.

24. **Giménez-Gallego G., Conn G., Hatcher V., Thomas K.A.** (1986) The complete aminoacid sequence of human brain-derived acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 611-617.

25. **Burgess W. H., Maciag T.** (1989) The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606.
26. **Rubin J.S., Osada H., Finch P.W., Taylor W.G., Rudikoff S., Aaronson S.A.** (1989) Purification and characterisation of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 802-806.
27. **Gautschi P., Fräter-Schroeder M., Müller T., Böhlen P.** (1986) Chemical and biological characterisation of a truncated form of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 160: 357-361.
28. **Gautschi-Sova P., Jiang Z.P., Fräter-Schroeder M., Böhlen P.** (1987) Acidic fibroblast growth factor is present in nonneural tissue: isolation and chemical characterisation from bovine kidney. *Biochemistry.* 26: 5844-5847.
29. **Burgess W.H., Mehlman T., Marshak D.R., Fraser B.A., Maciag T.** (1986) Structural evidence that endothelial cell growth factor beta is the precursor of both endothelial cell growth factor alpha and acidic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 7216-7220.
30. **Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G.M., Baird A., Esch F., Böhlen P.** (1985) Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology.* 118: 82-90.

31. **Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill F., Denoroy L., Kleper D., Gospodarowicz D., Guillemin R.** (1985) Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6507-6511.
32. **Mignatti P., Morimoto T., Rifkin D.B.** (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J. Cell Physiol.* 151: 81-93.
33. **Abraham J.A., Whang J.L., Tumolo A., Mergia A., Friedman J., Gospodarowicz D., Fiddes J.C.** (1986) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organisation. *EMBO J.* 5: 2523-2528.
34. **Moscatelli D.** (1988) Metabolism of receptor-bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* 197: 753-759.
35. **Rapraeger A.C., Krufka A., Olwin B.B.** (1991) Requirement of heparan sulphate for bFGF-mediated fibroblast growth factor and myoblast differentiation. *Science.* 252: 1705-1798.

36. **Ferrara N., Schweigerer L., Neufeld G., Mitchell R., Gospodarowicz D.**
(1987) Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 5773-5777.
37. **Schweigerer L., Neufeld G., Friedman J., Abraham J.A., Fiddes J.C., Gospodarowicz D.** (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature.* 325: 257-259.
38. **Schweigerer L., Ferrara N., Haaparanta T., Neufeld G., Gospodarowicz D.**
(1988) Basic fibroblast growth factor: expression in culture cells derived from corneal endothelium and lens epithelium. *Exp. Eye Res.* 46: 71-80.
39. **Winkles J.A., Freisel R., Burgess W.H., Howk R., Mehlman T., Weinstein R., Maciag T.** (1987) Human vascular smooth muscle cells both and respond to heparin-binding growth factor (endothelial growth factor). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7124- 7128.
40. **Huang S.S., Tsai C.C., Adams S.P., Huang J.S.** Neurone localization and neuroblastoma cell expression of brain-derived growth factor. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 81-87.

41. **Schweigerer L., Neufeld G., Friedman J., Abraham J.A., Fiddes J.C., Gospodarowicz D.** (1987) Basic fibroblast growth factor: production and growth stimulation in culture adrenal cortex cells. *Endocrinology*. 120: 796-800.
42. **Neufeld G., Ferrara N., Schweigerer L., Mitchell R., Gospodarowicz D.** (1987) Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*. 121: 597-603.
43. **Moscatelli D., Presta M., Joseph-Silverstein J., Rifkin D.B.** (1986) Both normal and tumour cells produce basic fibroblast growth factor. *J. Cell Physiol*. 129: 273-276.
44. **Schweigerer L., Neufeld G., Gospodarowicz D.** (1985) Basic fibroblast growth factor is present in cultured human retinoblastoma cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 1838-1843.
45. **Baird A., Mormede P., Böhlen P.** (1985) Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 358-364.
46. **Klagsbrun M., Sasse J., Sullivan R., Smith J.A.** (1986) Human tumour cells synthesise an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic

fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 2448-2452.

47. **Lobb R.R., Rybak S.M., St Clair D.K., Fett J.W.** (1986) Lysates of two established human tumour lines contain heparin-binding growth factor related to bovine acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 861-867.

48. **Schweigerer L., Neufeld G., Mergia A., Abraham J.A., Fiddes J.C., Gospodarowicz D.** (1987) Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 842-846.

49. **Liberman T.A., Friesel R., Jaye M., Lyall R.M., Westermark B., Drohan W., Schmidt A., Marciag T., Schlessinger J.** (1987) An angiogenic growth factor is expressed in human glioma cells. *EMBO J.* 6: 1627-1632.

50. **Taipale J., Keski-Oja J.** (1997) Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 11: 51-59.

51. **Schreiber A.B., Kenney J., Kowalski W.J., Thomas K.A., Giménez-Gallego G., Rios-Candelore M., DiSalvo J., Barritault D., Courty J., Courtois Y., Moenner M., Loret C., Burgess W.H., Friesel R., Johnson W., Maciag T.**

- (1985) A unique family of endothelial cell polypeptide mitogens: the antigenic and receptor cross-reactivity of bovine endothelial cell growth, brain-derived acidic fibroblast growth factor, and eye-derived growth factor-II. *J. Cell Biol.* 101: 1623-1626.
52. **Imamura T., Mitsui Y.** (1987) Heparan sulphate and heparin as a potentiator or a suppressor of growth of normal and transformed vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 172: 92-100.
53. **Lobb R., Sasse J., Sullivan R., Shing Y., D'Amore P., Jacobs J., Klagsbrun M.** (1986) Purification and characterisation of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J. Biol. Chem.* 261: 1924-1928.
54. **Gospodarowicz D., Cheng J.** (1986) Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J. Cell Physiol.* 128: 475-484.
55. **Saksela O., Moscatelli D., Sommer A., Rifkin D.B.** (1988) Endothelial cell-derived heparan sulphate binds fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J. Cell Biol.* 107: 743-751.
56. **Rosengart T.K., Johnson W.V., Friesel R., Clark R., Maciag Y.** (1988) Heparin protects heparin-binding growth factor-1 from proteolytic inactivation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 432-440.

57. **Burke C.I., Volkin D.B., Mach H., Middaugh C.R.** (1993) Effects of polyanions on the unfolding of acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry*. 32: 6419-6426.
58. **Pineda-Lucena A., Nuñez de Castro I., Lozano R.M., Muñoz-Wilery I., Zazo M., Giménez-Gallego G.** (1994) Effect of low pH and heparin on the structure of acidic fibroblast growth factor. *Eur. J. Biochem.* 222: 425-431.
59. **Müeller S.N., Thomas K.A., Di Salvo J., Levine E.M.** (1989) Stabilisation by heparin of acidic fibroblast growth factor mitogenicity for human endothelial cells in vitro. *J. Cell Physiol.* 140: 439-448.
60. **Ortega S., Shaeffer M.T., Soderman D., Di Salvo J., Linemeyer D.L., Giménez-Gallego G., Thomas K.S.** (1991) Conversion of cysteine to serine residues alters the activity, stability, and heparin dependence of acidic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 266: 5842-5846.
61. **Thomas K.S., Rios-Candelore M., Giménez-Gallego G., Di Salvo J., Bennett C., Rodkey J., Fitzpatrick S.** (1985) Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6409-6413.

62. **Uhlrich S., Lagente M., Lenfant M., Courtois Y.** (1986) Effect of heparin in the stimulation of non-vascular cells by human acidic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 1205-1213.
63. **Wagner J., D'Amore P.A.** (1986) Neurite outgrowth induced by an endothelial cell mitogen isolated from retina. *J. Cell Biol.* 103: 1357-1363.
64. **Rodan S.B., Wesolowski G., Thomas K.A., Rodan G.A.** (1987) Growth stimulation of rat calvaria osteoblastic cells by acidic fibroblast growth factor. *Endocrinology.* 121: 1917-1923.
65. **Moscatelli D.** (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J. Cell Phys.* 131: 123-130.
66. **Coulier F., Ollendorf V., Marics I., Rosnet O., Batoz M., Planche J., Marchetto S., Pebusque M.J., de Lapeyriere O., Bimbaum D.** (1991) The FGF-6 gene within the FGF multigene family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 638: 53-61.
67. **Johson D.E., Williams L.T.** (1993) Structural and functional diversity in the

FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60: 1-41.

68. **Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Leder P., Omitz D.M.** (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 64: 842-848.

69. **Rusnati M., Urbinati C., Presta M.** (1993) Internalisation of basic fibroblast growth factor (bFGF) in cultured endothelial cells: role of the low affinity heparin-like bFGF receptors. *J. Cell Physiol.* 154: 152-161.

70. **Kiefer M.C., Stephans J.C., Crawford K., Okino K., Barr P.J.** (1990) Ligand-affinity cloning and structure of a cell surface heparan sulphate proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6985-6989.

71. **Bashkin P., Neufeld G., Gitay-Goven H., Vlodaysky I.** (1992) Release of cell surface-associated basic fibroblast growth factor by glycosyl phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Cell Physiol.* 151: 126-137.

72. **Klagsburn M., Baird A.** (1991) A dual system is required for basic fibroblast growth factor family. *Cell.* 67: 229-231.

73. **Flaumenhaft R., Rifkin D.B.** (1992) The extracellular regulation of growth

factor action. *Mol. Biol. Cell.* 3: 1057-1065.

74. **Friesel R.E., Maciag T.** (1995) Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASED J.* 9: 919-925.

75. **Schlessinger J., Lax I., Lemmon M.** (1993) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors?. *Cell.* 83:2357-2360.

76. **Skerret P.J.** (1991) "Matrix Algebra" heals Life's wounds. *Science.* 252:1064-1066.

77. **Lin C.Q., Bissell M.J.** (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 7:737-743.

78. **Hardingham T.E., Fosang A.J.** (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6: 861-870.

79. **Aviezer D., Hecht D., Safran M., Eisinger M., David G., Yayon A.** (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis and angiogenesis. *Cell.* 79: 1005-1013.

80. **Ueki T., Koji T., Tamiya S., Nakane P.K., Tsuneyoshi M.** (1995) Expression

of basic fibroblast growth factor receptor in advanced gastric carcinoma. *J. Pathol.* 177: 353-361.

81. **Yamanaka Y., Friess H., Buchler M., Beger H.G., Uchida E., Onda M., Kobrin M.S., Kore M.** (1993) Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumour stage. *Cancer Res.* 53: 5289-5296.

82. **Liuzzo J.P., Moscatelli D.** (1996) Human leukaemia cell lines bind basic fibroblast growth factor (FGF) on FGF receptors and heparan sulphates: downmodulation of FGF receptors by phorbol ester. *Blood.* 87: 245-255.

83. **Meyer G.E., Yu E., Siegal J.A., Petteway J.C., Blumenstein B.A., Brawer M.K.** (1995) Serum basic fibroblast growth factor in men with and without prostate carcinoma. *Cancer.* 76: 2304-2311.

84. **Fujimoto K., Ichimori Y., Kakizoe T., Okajima E., Sakamoto H., Sugimura T., Terada M.** (1995) Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 386-392.

85. **Banai S., Jaklisch M.T., Casscells W., Shou M., Shrivastav S., Correa R., Epstein S.E., Unger E.F.** (1991) Effects of acidic fibroblast growth factor on

normal and ischemic myocardium. *Cir. Res.* 69: 76-85.

86. **Barrios V., Cuevas B., Carceller F., Asin E., Jiménez J.J., Navarro J., García-Segovia J., Moya J.L., Minguez I., Cuevas P.** (1995) Angiogenesis in rat heart induced by local delivery of basic fibroblast growth factor. *Eur. Heart J.* 16(supp) 980 Abstract.
87. **Chleboun J.O., Martins R.N., Mitchell C.A., Chirila T.V.** (1992) bFGF enhances the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 510-516.
88. **Harada K., Grossman W., Friedman M., Edelman E.R., Prasad P.V., Manning W.J., Selke F.W., Simons M.** (1999) Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J. Clin. Invest.* 94: 624-630.
89. **Lazarous D.F., Scheinowitz M., Shou M., Hodge E., Rajanayagam S., Humsberger S., Robinson W.G., Stiber J.A., Correa R., Epstein S.E., Unger E.F.** (1995) Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation.* 91: 145-153.
90. **Yamada Y., Yangisawa-Miwa A., Nakamura F., Yamada K., Tomary T.,**

- Kimura K., Morita T.** (1995) Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparan sulphate: an experimental study. *Am. Heart. J.* 130: 1182-1188.
91. **Unger E.F., Banai S., Shou M., Lazarous D.F., Jacklitsch M.T., Scheinowitz M., Correa R., Klingbeil C., Epstein S.Z.** (1994) Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am. J. Physiol.* 266: H1588-H1595.
92. **Ware J.A., Simons M.** (1997) Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature Med.* 3: 158-164.
93. **Yanagisawa-Miwa A., Uchida Y., Nakamura F., Tanaru T., Kido H., Kamjo T., Sujimoto T., Kayi K., Utsuyama M., Kurashima C., Ito H.** (1992) Salvage of infarcted myocardium by Angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science.* 257: 1401-1403.
94. **Hioki O., Minemura M., Shimizu Y., Kasii Y., Nishimori H., Takahara T., Higuchi K., Yoshitake Y., Nishikawa K., Watanabe A.** (1996) Expression and localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the repair process of rat liver injury. *J. Hepatol.* 24: 217-224.
95. **Cheng G.C., Libby P., Grodzinsky A.J., Lee R.T.** (1996) Induction of DNA

synthesis by a single transient mechanical stimulus of human vascular smooth muscle cells - Role of fibroblast growth factor-2. *Circulation*. 93:99-105.

96. **Nissen N.N., Polverini P.J., Gamelli R.L., DiPietro L.A.** (1996) Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgery*. 119: 457-465.

97. **Fu X., Shen Z., Chen Y., Xie J., Guo Z., Zhang M., Sheng Z.** (1998) Randomised placebo-controlled trial of use of topical recombinant bovine basic fibroblast growth factor for second-degree burns. *Lancet*. 352 (9141): 1661-1664.

98. **Sasse J., Haase B., Cory A., Koss A., Smale G.** (1992) Cartilage-derived growth factors. In: Habal, M.B., Reddi, A.H. (eds). *Bone grafts & bone substitutes*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pags. 53-59.

99. **Izbicka E., Dunstan C., Esparza J., Jacobs C., Sabatini M., Mundy G.R.** (1996) Human amniotic tumour that induces new formation in vivo produces growth-regulatory activity in vitro for osteoblast identified as an extended form of basic fibroblast growth factor. *Cancer Res*. 56: 633-636.

100. **Cuevas P., de Paz V., Cuevas B., Marin-Martínez J., Picón-Molina M., Fernández-Pereira A., Giménez-Gallego G.** (1997) Osteopromotion for

- cranioplasty: an experimental study in rats using acidic fibroblast growth factor. *Surg. Neurol.* 47: 242-246.
101. **Cuevas P.** (1998) Hormone-like effects of fibroblast growth factors (FGFs) in the nervous system. *Surg. Neurol.* 50: 571-573.
102. **Baird A., Mormède P., Ying S.Y., Wehrenberg W.B., Ueno N., Ling N., Guillemin R.** (1985) A non mitogenic pituitary function of fibroblast growth factor: Regulation of thyrotropic and prolactin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 5545-5549.
103. **Baird A., Hseugh A.J.W.** (1986) Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul. Peptides.* 16: 243-250.
104. **Plata-Salaman C.R.** (1989) Growth factors, feeding regulation and the nervous system. *Life Sci.* 45: 1207-1217.
105. **Galan J.M., Cuevas B., Dujovny N., Giménez-Gallego G., Cuevas P.** (1996) Sleep promoting effects of intravenously administered acidic fibroblast growth factor. *Neurol. Res.* 18: 567-569.
106. **Cuevas P., Prieto R., Saenz de Tejada I., Giménez-Gallego G.** (1996)

- Analgesic effects of fibroblast growth factor in the rat. *Neurosci. Lett.* 207: 175-178.
107. **Guaza C., Garcia-Andres C., Sandi C., Muñoz-Willery I., Cuevas P., Giménez-Gallego G.** (1996) Fibroblast growth factor decreases locomotor activity in rats. *Neuroscience.* 75: 805-813.
108. **Cuevas P., Giménez-Gallego G.** (1996) Antiepileptic effects of acidic fibroblast growth factor examined in kainic acid-mediated seizures in the rat. *Neurosci. Lett.* 203: 66-68.
109. **Cuevas P., Carceller F., Reimers D., Saenz de Tejada I., Giménez-Gallego G.** (1998) Acidic fibroblast growth factor rescues gerbil hippocampal neurons from ischemic apoptotic death. *Neurol. Res.* 20: 271-274.
110. **Cuevas P.** (1997) Therapeutic prospects for fibroblast growth factor treatment of brain ischemia. *Neurol. Res.* 19: 355-356.
111. **Cuevas P., Carceller F., Muñoz-Willery I., Giménez-Gallego G.** (1998) Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury. *Surg. Neurol.* 49: 77-84.

112. **Fu X., Cuevas P., Giménez-Gallego G., Wang Y., Sheng Z.** (1998) The effects of fibroblast growth factors on ischemic kidney, liver and gut injuries. *Chin. Med. J. Engl.* 111: 398-403.
113. **Cuevas P., Martínez-Coso V., Fu X., Orte L., Reimers D., Giménez-Gallego G., Forssman W.G., Saenz de Tejada I.** (1999) Fibroblast growth factor protects the kidney against ischemia-reperfusion injury. *Eur. J. Med. Res.* 4 (10): 403-410.
114. **Cuevas P., Carceller F., Redondo-Horcajo M., Lozano R.M., Giménez-Gallego G.** (1998) Systemic administration of acidic fibroblast growth factor ameliorates the ischemic injury of the retina in rats. *Neurosci. Lett.* 255: 1-4.
115. **Cuevas P., Carceller F., Cuevas B., Giménez-Gallego G., Martínez-Coso V.** (1997) A non-mitogenic form of acidic fibroblast growth factor reduces neutrophil infiltration in rat ischemic reperfused heart. *Eur. J. Med. Res.* 2: 239-143.
116. **Cuevas P., Carceller F., Lozano R.M., Crespo A., Zazo M., Giménez-Gallego G.** (1997) Protection of rat myocardium by mitogenic and non-mitogenic fibroblast growth factor during post-ischemic reperfusion. *Growth Factors.* 15: 29-40.

117. **Horrigan M.C.G., MacIsaac A.I., Nicolini I.A., Vince D.G., Lee P., Ellis S.G., Topol E.J.** (1996) Reduction in myocardial infarct size by fibroblast growth factor after temporary coronary occlusion in a canine model. *Circulation*. 94: 1927-1933.
118. **Horrigan M.C.G., Malycky J.L., Ellis S.G., Topol E.J., Nicolini F.A.** (1999) Reduction in myocardial infarct size by basic fibroblast growth factor following coronary occlusion in a canine model. *Int. J. Cardiol.* 68(suppl): S85-S91.
119. **Fu X., Yang Y., Li X., Sun T., Wang Y., Sheng Z.** (1998) Ischemia and reperfusion impair the gene expression of endogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) in rat skeletal muscles. *J. Surg. Res.* 80 (1): 88-93.
120. **Kardami E., Fandrich R.P.** (1989) Basic fibroblast growth factor in atria and ventricles of the vertebrate heart. *J. Cell Biol.* 109: 1865-1875.
121. **Casscells W., Speir E., Sasse J., Klagsbrun M., Allen P., Lee M., Calvo B., Chiba M., Haggroth L., Folkman J., Epstein S.E.** (1990) Isolation, characterisation and localization of heparin-binding growth factors in the heart. *J. Clin. Invest.* 85: 433-441.
122. **Quinkler W., Maasberg M., Bernotat-Danielowski S., Lutte N., Sharma**

- H.S., Schaper W.** (1989) Isolation of heparin-binding growth factors from bovine, porcine and canine hearts. *Eur. J. Biochem.* 181: 67-73.
123. **Bolli R., Manchikalapudi S., Tang X.L., Takano H., Qiu Y., Guo Y., Zhang Q., Jadoon A.K.** (1997) The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by Nitric Oxide Synthase. Evidence that Nitric Oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 81: 1094-1107.
124. **Takano H., Tang X.L., Qiu Y., Guo Y., French B.A., Bolli R.** (1998) Nitric Oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ. Res.* 83: 73-84.
125. **Htun P., Ito W.D., Hofer I.E., Schaper J., Schaper W.** (1998) Intramyocardial infusion of FGF-1 mimics ischemic preconditioning in pig myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 867-877.
126. **Yao Z., Gross G.R.** (1994) Activation of ATP-sensitive potassium channels lowered threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Am. J. Physiol.* 36: H1888-H1894.
127. **Boddeke E., Hugtenburg J., Jap W., Heynis J., Van Zwieten P.** (1989)

New anti-ischemic drugs: cytoprotective action with no primary haemodynamic effects. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 397-400.

128. **Braunwald E., Kloner R.A.** (1985) Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76: 1713-1719.
129. **Nayler W.G., Panagiotopoulos S., Elz J.S., Daly M.J.** (1988) Calcium-mediated damage during post-ischemic reperfusion. *J. Mol. Cell Cardiol.* 20, Suppl II: 41-54.
130. **Sullivan A.T., Baker D.J., Drew G.M.** (1991) Effect of calcium channel blocking agents on infarct size after ischemia-reperfusion in anaesthetised pigs: relationship between cardioprotection and cardiodepression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17: 707-716.
131. **Cuevas P., Carceller F., Hernández-Madrid A., Cuevas B., Martínez-Coso V., Giménez-Gallego G.** (1997) Protective effects of acidic fibroblast growth factor against cardiac arrhythmias induced by ischemia and reperfusion in rats. *Eur. J. Med. Res.* 2:33-36.
132. **Guo Y., Jones K., Zuan Y.T., Tang X.L., Boa W., Wu W.J., Han H., Laubach V.E., Ping P., Yang Z., Qin Y., Bolli R.** (1999) The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible

NO synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11507-11512.

133. **Colasanti M., Di-Pucchio T., Persichini T., Sogos V., Presta M., Lauro G.M.** (1995) Inhibition of inducible nitric oxide synthase mRNA expression by basic fibroblast growth factor in human microglial cells. *Neurosci. Lett.* 195: 45-48.
134. **Goureau O., Lepoivre M., Becquet F., Courtois Y.** (1993) Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor β in bovine retinal pigmented epithelial cells: inverse correlation with cellular proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4276-4280.
135. **Scott-Burden T., Schini V., Elizondo E., Junquero D.C., Vanhoutte P.** (1992) Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation. *Cir. Res.* 71: 1088-1100.
136. **Off J. Eur. Communities** (1986) The Council of European Communities Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. (86/609/EEC) 29: 1-27.

137. **Selye H., Bajusz E., Grasso S., Mendell P.** (1960) Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rats. *Angiology*. 11: 398-407.
138. **Zazo M., Lozano R.M., Ortega S., Varela J., Diaz-Orejas R., Ramirez J.M., Giménez-Gallego G.** (1992) High-level synthesis in *Escherichia coli* of shortened and full-length human acidic fibroblast growth factor and purification in a form stable in aqueous solutions. *Gene*. 113: 231-238.
139. **Rosengart T.K., Kuperschmid J.P., Maciag T., Clark R.E.** (1989) Pharmacokinetics and distribution of heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor) in the rat. *Circ. Res.* 64: 227-234.
140. **Dudek R.R., Wildhirt S., Pinto V., Giesler G., Bing R.J.** (1994) Dexamethasone inhibits the expression of an inducible nitric oxide synthase in infarcted rabbit myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 202: 1120-1126.
141. **Knight B.** (1967) Early myocardial infarction: practical methods for its post-mortem demonstration. *J. Forensic. Med.* 14: 101-107.
142. **Cuevas P., González A.M., Carceller F., Baird A.** (1991) Vascular response to basic fibroblast growth factor when infused onto the normal adventitia or into the injured media of the rat carotid artery. *Circ. Res.* 69: 360-

372.

143. **Gutierrez-Díaz J.A., Cuevas P., Reimers D., Dujovny M., Díaz F.G., Ausman J.I.** (1985) Quantitative electron microscopic study of calcium accumulation in cerebral ischemia mitochondria. *Surg. Neurol.* 24: 67-72.
144. **Miranda A.F., Babiss L.E., Fisher P.B.** (1986) Measurement of the effect of interferons on cellular differentiation of human skeletal muscle cells. In *Methods in Enzymology*, Pestka, S.ed.Orlando. (Academic Press), 119: 619-628.
145. **Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 246-254.
146. **Mullane K., Kraemer R., Smith B.** (1985) Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Meth.* 14: 157-167.
147. **Griswold D.E., Hillegas L.M., Hill D.E., Egan J.M., Smith E.F.** (1988) Method for quantification of myocardial infarction and inflammatory cell infiltration in rat cardiac tissue. *J. Pharmacol. Meth.* 20: 225-235.

148. **Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A.** (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119: 493-501
149. **Liu S., Adcock I.M., Old R.M., Barnes P.J., Evans T.M.** (1993) Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1208-1213.
150. **Kim N., Vardi Y., Padmz-Nathan H., Daley J., Golstein I., Saéñz de Tejada I.** (1993) Oxygen tension regulates the oxide pathway. Physiological role in penile erection. *J. Clin. Invest.* 91: 437-442.
151. **Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
152. **Rosengart T.K., Kuperschmid J.P., Maciag T., Clark R.** (1989) Pharmacokinetics and distribution of heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor) in the rat. *Circ. Res.* 64: 227-234.
153. **Burgess W.H., Maciag T.** (1989) The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606.

154. **Jaye M., Shlessinger J., Dionne C.A.** (1992) Fibroblast growth factor receptor tyrosine Kinases—molecular analysis and signal transduction. *Biochem. Biophys. Acta.* 1135: 185-199.
155. **Rapraeger A.C., Krufka A., Olwin B.B.** (1991) Requirement of heparan sulphate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science.* 252: 1705-1708.,
156. **Yayon A., Klagsbrun M., Esko J.D., Leder P., Ornitz D.M.** (1991) Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 64: 841-848.
157. **Saliba M.J., Covel J.W., Bloor C.M.** (1976) Effects of heparin in large doses on the extent of myocardial ischemia after acute coronary occlusion in the dog. *Am. J. Cardiol.* 37: 599-604.
158. **Kouretas P.C., Kim I.D., Cahill P.A., Myers A.K., To L.N., Wang Y.N., Sitzmann J.V., Hannan R.L.** (1999) Nonanticoagulant heparin prevents coronary endothelial dysfunction after brief ischemia-reperfusion injury in the dog. *Circulation.* 99(8): 1062-1066.
159. **Libersan D., Khalil A., Dagenais P., Quan E., Delorme F., Uzan A., Latour J.G.** (1998) The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits

- infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc. Res.* 37(3): 656-666.
160. **Noma A.** (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature.* 305: 147-148.
161. **Grover G.J.** (1997) Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel (KATP) openers in models of myocardial ischemia and reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 309-315.
162. **Gross G., Auchampach J.** (1992) Blockade of the ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning. *Cir. Res.* 70: 223-233.
163. **Auchampach J., Grover G., Gross G.** (1992) Blockade of ischemic preconditioning in dogs by the novel ATP-dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc. Res.* 26: 1054-1062.
164. **Garret J.G., Ryan M.F.** (1999) Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Cir. Res.* 84: 973-979.
165. **Quast U., Cook N.S.** (1989) Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* 10: 431-435.

166. **Colle W.C., McPherson C.D., Sontag D.** (1991) ATP regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ. Res.* 69: 571-581.
167. **Yokota R., Tanaka M., Yamasaki K., Araki M., Miyame M., Maeda T., Koga K., Yabuuchi Y., Sasayama S.** (1998) Blockade of ATP-sensitive K⁺ channels attenuates preconditioning effect on myocardial metabolism in swine: Myocardial metabolism and ATP-sensitive K⁺ channels. *Int. J. Cardiol.* 67: 225-236.
168. **Bers D.M., Pérez-Reyes E.** (1999) Ca²⁺ channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release. *Cardiovasc. Res.* 42: 339-360.
169. **Gross G.J., Fryer R.M.** (1999) Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ. Res.* 84: 973-979.
170. **Héron A., Pollard H., Dessi F., Moreau J., Labennes F., Ben-Ari Y., Charriant-Marlangue C.** (1993) Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J. Neurochem.* 61: 1973-1976.
171. **Cannon P., Yang X., Szabolcs M.J., Ravalli S., Sciacca R.R., Michler**

- R.E.** (1998) The role of inducible nitric oxide synthase in cardiac allograft rejection. *Cardiovasc. Res.* 38: 6-15.
172. **Kajstura J., Cheng W., Reiss K., Clark W.A., Sonnenblick E.H., Krajewski S., Reed J.C., Olivetti G., Anversa P.** (1996) Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Invest.* 74 :86-107.
173. **Gottlieb R.A., Burleson K.O., Kloner R.A., Babior B.M., Engler R.L.** (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J.Clin. Invest.* 94: 1621-1628.
174. **Piot C., Wolfe C.L.** (1997) Apoptosis: a new mechanism of lethal myocardial reperfusion injury? *J. Tromb. Thrombol.* 4: 67-68.
175. **Miyamoto T., Leconte I., Swain J.L., Fox J.C.** (1998) Autocrine FGF signalling is required for vascular smooth muscle cell survival in vitro. *J. Cell. Physiol.* 177(1): 58-67.
176. **Guillonneau X., Bryckaert M., Launay-Longo C., Courtois Y., Mascarelli F.** (1998) Endogenous FGF1-induced activation and synthesis of extracellular signal-regulated Kinase 2 reduce cell apoptosis in retinal-pigmented epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273(35): 22367-22373.

177. **Kondo S., Yin D., Aoki T., Takahashi J.A., Morimura T., Takeuchi J.** (1994) Bcl-2 gene prevents apoptosis of basic fibroblast growth factor-deprived murine aortic endothelial cells. *Exp. Cel. Res.* 213: 428-432.
178. **Weider R., Wang H., Shirke S., Wang Q., Menzel T., Feirt N., Jakubowski A.A., Gabrilove J.L.** (1997) Low level expression of basic FGF upregulates bcl-2 and delays apoptosis, but high intracellular levels are required to induce transformation in NIH3T3 cells. *Growth Factors.* 15: 41-60.
179. **Karsan A., Yee E., Poirier G.G., Zhou P., Craig R., Harlan J.M.** (1997) Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by bcl-2-dependent and independent mechanisms. *Am. J. Pathol.* 151(6): 1775-1784.
180. **Wieder R., Wang H., Shirke S., Wang Q., Menzel T., Feirt N., Jakubowski A.A., Gabrilove J.L.** (1997) Low level expression of basic FGF upregulates bcl-2 and delays apoptosis, but high intracellular levels are required to induce transformation in NIH 3T3 cells. *Growth Factors.* 15(1): 41-60.
181. **Piot C.A., Padmanaban D., Ursell P.C., Sievers R.E., Wolfe C.L.** (1997) Ischemic preconditioning decrease apoptosis in rat hearts in vivo. *Circulation.* 96: 1598-1604.

182. **Wang N.P., Bufkin B.L., Nakamura M., Zhao Z.Q., Wilcox J.N., Hewan-Lowe K.O., Guyton R.A., Vinten-Johansen J.** (1999) Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann. Thorac. Surg.* 67: 1689-1695.
183. **Hearse D., Bolli R.** (1992) Reperfusion induced injury: manifestations, mechanism, and clinical relevance. *Cardiovasc. Res.* 26: 106-108.
184. **Opie L.H.** (1989) Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation.* 80: 1049-1062.
185. **Weiss S.J.** (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320: 365-376.
186. **Badwey J.A., Karnovsky M.L.** (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 695-726.
187. **Gryglewski R.J., Palmer R.M.J., Moncada S.** (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 320:454-456.
188. **Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M.** (1986) Superoxide anions and hyperoxia

inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250: H822-H827.

189. **Rowe G.T., Manson N.H., Caplan M., Hess M.L.** (1983) Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum: participation of the cyclooxygenase pathway. *Circ. Res.* 53: 584-591.
190. **Harlan J.M., Callahan K.S.** (1984) Role of hydrogen peroxide in the neutrophil-mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 74: 442-448.
191. **Ross R.** (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362: 801-809.
192. **Weiss S.J., Regiani S.** (1984) Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alfa-1-proteinase inhibitor: cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites. *J. Clin. Invest.* 73: 1297-1303.
193. **Weiss S.J., Peppin G.J.** (1986) Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil: characteristics, regulation and potential function in vivo. *J. Clin. Invest.* 35: 3189-3197.

194. **Inauen W., Granger D.N., Meininger C.J., Schelling M.E., Granger H.J., Kvietys P.R.** (1990) Anoxia-reoxygenation-induced, neutrophil-mediated endothelial cell injury: role of elastase. *Am. J. Physiol.* 259: H925-H931.
195. **Westlin W.F., Gimbrone M.A. Jr.** (1993) Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium: role of cytokines. *Am. J. Pathol.* 142: 117-128.
196. **Zimmerman B.J., Granger D.N.** (1990) Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. *Am. J. Physiol.* 259: H390-H394.
197. **Norris D.A., Clark R.A.F., Swigart L.M., Huff J.C., Weston W.L., Howell S.E.** (1982) Fibronectin fragment(s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 129: 1612-1618.
198. **Adams D.H., Shaw S.** (1994) Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet.* 343: 831-836.
199. **Bevilacqua M.P., Nelson R.M.** (1993) Selectins. *J. Clin. Invest.* 91:379-387.
200. **Kuijpres T.W., Hakkert B.C., Hoogerwerf M., Leeuwenberg J.F.M., Roos D.** (1991) Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells:

- endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J. Immunol.* 147: 1369-1376.
201. **Zimmerman G.A., McIntyre T.M., Mehra M., Prescott S.M.** (1994) Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell. Biol.* 110: 529-540.
202. **Huber A.R., Kunkel S.L., Todd R.F. III, Weiss S.J.** (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science.* 250: 99-102.
203. **Rot A.** (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today.* 13: 291-294.
204. **Lawrence M.B., Springer T.A.** (1991) Leukocytes roll on selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 65:859-873.
205. **Bevilacqua M.P., Pober J.S., Wheeler M.E., Cotran R.S., Gimbrone M.A. Jr.** (1985) Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* 76: 2003-2011.

206. **Gasic A.C., McGuire C., Krater S., Farhood A.I., Goldstein M.A., Smith C.W., Entman M.L., Taylor A.A.** (1991) Hydrogen peroxide pre-treatment of perfused canine vessels induced ICAM-1 and CD18-dependent neutrophil adherence. *Circulation*. 84: 2154-2166.
207. **Yoshida N., Granger D.N., Anderson D.C., Rothlein R., Lane C., Kvietys P.R.** (1992) Anoxia-reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 262: H1891-H1898.
208. **Smith C.W., Entman M.L., Lane C.L., Beaudet A.L., Ty T.I., Youker K., Hawkins H.K., Anderson D.C.** (1991) Adherence of neutrophil to canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesion molecule-1. *J. Clin. Invest.* 88: 1216-1223.
209. **Youker K., Smith C.V., Anderson D.C., Miller D., Michael L.H., Rossen R.D., Entman M.L.** (1992) Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes: induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J. Clin. Invest.* 89: 602-609.
210. **Kukielka G.L., Hawkins H.K., Michael L.H., Manning A.M., Lane C.L., Entman M.L., Smith C.V., Anderson D.C.** (1993) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J. Clin. Invest.* 92: 1504-1516.

211. **Youker K.A., Hawkins H.K., Kukielka G.L., Perrard J.L., Michael L.H., Ballantyne C.M., Smith C.W., Entman M.L.** (1994) Molecular evidence for induction of intracellular adhesion molecule-1 in the viable border zone associated with ischemia-reperfusion injury of the dog heart. *Circulation*. 89: 2736-2746.
212. **Dreyer W.J., Michael L.H., West M.S., Smith C.W., Rothlein R., Rossen R.D., Anderson D.C., Entman M.L.** (1991) Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium: insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation*. 84: 400-411.
213. **Go L.O., Murry C.E., Richard V.J., Weischedel G.R., Jennings R.B., Reimer K.A.** (1988) Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury. *Am. J. Physiol.* 255: H1188-H1196.
214. **Smith E.F. III, Egan J.W., Bugelski P.J., Hillegas L.M., Hill D.E., Griswold D.E.** (1998) Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 255: H1060-H1068.
215. **McEver R.P.** (1992) Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4: 840-849.

216. **Kubes P., Suzuki M., Granger D.N.** (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4651-4655.
217. **Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A., Smith T.W., Michel T.** (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 347-351.
218. **Balligand J.L., Ungureanu D., Kelly R.A., Kobzik L., Pimental D., Michel T.** (1993) Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J. Clin. Invest.* 91: 2314-2319.
219. **Kubes P., Granger D.N.** (1992) Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am. J. Physiol.* 262:H611-H615.
220. **Gauthier T.W., Davenpeck K.L., Lefer A.M.** (1994) Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 267: G562-G568.
221. **Lefer D.J., Klunk D.A., Luty G.A., Merges C., Schleimer R.P., Bochner B.S., Zweier J.L.** (1993) Nitric oxide (NO) donors reduce basal ICAM-1 expression on human aortic endothelial cells (HAECs). *Circulation.* 88: 3037.

Abstract.

222. **Selke F.W., Wang S.Y., Friedman M., Harada K., Edelman E.R., Grossman W., Simons M.** (1994) Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation. *Am. J. Physiol.* 267: H1303-H1311.
223. **Selke F.W., Wang S.Y., Stamler A., López J.J., Li J., Simons M.** (1996) Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium. *Am. J. Physiol.* 271: H713-H720.
224. **Miyamoto S., Teramoto H., Gutkind J.S., Yamada K.M.** (1996) Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine Kinases and MAP Kinase activation: Roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell. Biol.* 135: 1633-1642.
225. **Yamada K.M., Geiger B.** (1997) Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 76-85.
226. **Lefer A.M., Campbell B., Scalia R., Lefer D.J.** (1998) Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation.* 98: 1322-1328.

227. **Sasaki N., Sato T., Ohler A., O'Rourke B., Marban E.** (2000) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*. 101(4): 439-45.
228. **Takano H., Manchikalapudi S., Tang X.L., Qiu Y., Rizvi A., Jadoon A.K., Zhang Q., Bolli R.** (1998) Nitric Oxide Synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation*. 98: 441-449.
229. **Ping P., Takano H., Zhang J., Tang X.L., Qiu Y., Li R.C.X., Banerjee S., Dawn B., Balafonova Z., Bolli R.** (1999) Isoform-selective activation of Protein Kinase C by Nitric Oxide in the heart of conscious rabbits. A signaling mechanism for both Nitric Oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ. Res.* 84: 587-604.
230. **Xuan Y., Tang X., Qiu Y., Banerjee S., Takano H., Han H., Bolli R.** (2000) Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H2360-H2371.
231. **Hampton T.G., Amende I., Fong J., Laubach V.E., Li J., Metais C., Simons M.** (2000) Basic FGF reduces stunning via a NOS2 pathway in coronary-perfused mouse hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279(1): H260-H268.

232. **De Belder A.J., Radomski M.W., Martin F.J., Moncada S.** (1995) Nitric Oxide and the pathogenesis of heart muscle disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 25: 1-8.
233. **Kelly R.A., Balligand J.L., Smith T.W.** (1996) Nitric Oxide and cardiac function. *Circ. Res.* 79: 363-380.
234. **Jaye M., Schlessinger J. Dionne C.A.** (1997) Fibroblast Growth factor receptor tyrosine Kinases-molecular analysis and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1135:185-199.