
Factores de crecimiento para células musculares lisas vasculares en la hipercolesterolemia experimental

Growth factors for smooth muscular vascular cells in experimental hypercholesterolaemia

D. Martínez Caro¹, I. García¹, J. Merino², M.J. Gil³, A. Martínez¹, A. Grau¹, E. Alegría¹

INTRODUCCIÓN

La plaqueta se considera uno de los elementos celulares clave en la patogenia de la aterosclerosis y de los procesos de reparación tras daño vascular como la reestenosis postangioplastia^{1,3}. Una de sus principales acciones es la liberación de gran número de sustancias mitogénicas y quimiotácticas en respuesta a la agregación entre las que destaca el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que juega un papel predominante en la patogenia de la aterosclerosis como principal agente quimiotáctico para las células musculares lisas (CML)⁴. En la pared arterial, el PDGF modula de manera autocrina la producción de otros factores de crecimiento de progresión, como el factor de crecimiento derivado de la insulina I (IGF-I)⁵, a su vez implicado en la respuesta proliferativa de la CML de la lesión aterosclerótica^{6,7}.

Uno de los principales factores para el desarrollo de la aterosclerosis, la hiperco-

lesterolemia, induce alteraciones en la trombopoyesis, con aparición de megacariocitos altamente poliploides y elevado contenido en DNA⁸, lo que se asocia a incrementos en la expresión del RNAm de varias proteínas plaquetarias⁹, además de alterar profundamente la reactividad, metabolismo y contenido proteico de las plaquetas^{10,11}. Todos estos hallazgos sugieren una elevada capacidad de síntesis proteica del megacariocito hipercolesterolémico, que hipotéticamente podría influir en el contenido intraplaquetario de factores de crecimiento. Por este motivo, se ha postulado que parte de los efectos aterogénicos de las lipoproteínas podrían ser debidos a la interacción lipoproteína-plaqueta mediada por una modulación de su contenido de factores de crecimiento, observada tanto *in vivo* como experimentalmente¹²⁻¹⁵. El propósito de este trabajo es el de caracterizar la respuesta a la hipercolesterolemia del contenido sérico e intraplaquetario y actividad mitogénica de los factores de crecimiento PDGF, TGF-

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 83-89.

1. Departamentos de Cardiología.
2. Immunología.
3. Bioquímica. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

Correspondencia:

Dr. D. Martínez Caro
Departamento de Cardiología
Clínica Universitaria de Navarra
Av. Pío XII, 36
31008 Pamplona
Tfno. 948 255400
Fax 948 172294

beta e IGF-I en un modelo porcino de hipercolesterolemia experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 20 cerdos miniatura Goettingen, de 3 a 5 meses de edad, machos y normolipémicos, que fueron divididos de manera aleatoria en dos grupos según la alimentación recibida. El control (n=10) fue alimentado diariamente, durante 18 semanas, con una cantidad equivalente al 3% de su peso en pienso comercial (Porcisanders C-02, Sanders, España). El grupo colesterol recibió un suplemento diario de un 3% de colesterol puro (Sigma, USA) y un 30% de sebo de buey sobre el peso del pienso administrado.

Se obtuvieron 40 ml de sangre antes de iniciar la dieta y a las 18 semanas mediante punción percutánea o disección de la arteria carótida, tras sedar a los animales con 10 mg/kg de ketamina (Ketolar, Parke Davis), 2 mg/Kg de azaperona (Stresnil, Esteve veterinaria) y administrar 0,5 mg de sulfato de atropina (Atropina, Braun Medical) por vía intramuscular.

Las determinaciones de colesterol total, colesterol-HDL y triglicéridos fueron realizadas en suero, antes del inicio de la dieta, a las 4 y a las 18 semanas, empleando un analizador fotométrico comercial (Hitachi 717, Boehringer Mannheim). El colesterol LDL fue estimado modificando la fórmula de Friedwal de acuerdo con la menor relación entre la masa de colesterol/triglicéridos de las LDL porcinas, que es de 8:1¹⁶.

La medida del volumen plaquetario medio (VPM), número de plaquetas circulantes y anchura de distribución plaquetaria se determinaron automáticamente con el contador electrónico Coulter SKTS (Coulter Electronics, Estados Unidos) empleando EDTA como anticoagulante. La masa plaquetaria se estimó multiplicando el recuento plaquetario por el VPM.

En 14 cerdos, 7 de cada grupo, se realizó una estimación del tiempo de sangrado según el método de Ivy al inicio y final del estudio, modificando ligeramente los sistemas Simplate II (Organon Teknika, Estados Unidos) para evitar el retroceso de sus lan-

cetas. En ambos casos se determinó por duplicado en ambos pabellones auriculares, expresando los resultados como la media de los cuatro valores obtenidos.

Obtención de las muestras

Los lisados plaquetarios se obtuvieron a partir de 10 ml de sangre anticoagulada con ACD, que fue centrifugada a 175 g durante 5 minutos para obtener plasma rico en plaquetas, que a su vez fue centrifugado a 3500 g durante 20 minutos para recoger las plaquetas. Éstas fueron sometidas a dos lavados en PBS-EDTA 340 mOsm, tal y como requieren las plaquetas porcinas¹⁷ para finalmente ser resuspendidas en PBS 290 mOsm y ajustadas a 1×10^9 /ml. Los lisados se obtuvieron tras 5 ciclos consecutivos de congelación/descongelación a -80 °C, eliminando los restos celulares por centrifugación y almacenando el sobrenadante a -80 °C hasta su posterior empleo.

El suero se obtuvo a partir de sangre total incubada a 37 °C durante 4 horas, tras las cuales se centrifugó a 1600 g durante 10 minutos, almacenándose a -80 °C hasta su posterior empleo.

Determinación de factores de crecimiento

Las concentraciones intraplaquetarias y séricas de PDGF-BB se determinaron por duplicado mediante radioinmuno-ensayo (Amersham, Reino Unido), con reactividad cruzada para el PDGF-BB porcino del 62%, sensibilidad de 0,8 fmol/ml y coeficiente de variación intraensayo del 9,7%, e interensayo del 17,2%.

Los niveles séricos y plaquetarios de TGF-beta1 se cuantificaron por duplicado empleando un radioinmunoensayo comercial (Du Pont, Boston, USA). Antes del ensayo las muestras se acidificaron transitoriamente para activar el TGF-beta 1 latente. Los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron 8,9% y 9,7% respectivamente.

Las concentraciones séricas de IGF-I se determinaron previa separación de sus proteínas de unión mediante radioinmunoensayo (Diagnostic System, Estados Unidos), con sensibilidad de 7 ng/ml, coefi-

ciente de variación intraensayo del 6,4% e interensayo del 11,9%.

Ensayos de proliferación

Se realizaron bioensayos de proliferación con suero y lisados plaquetarios sobre células Swiss 3T3 y CML. El bioensayo sobre Swiss 3T3 se realizó empleando técnicas que describimos previamente¹⁸: los fibroblastos Swiss 3T3 (designación CCL92 de la American Type Culture Collection) fueron incubados en placas de 96 pocillos de fondo plano, a 4×10^3 células por pocillo, en 200 μ L de RPMI 1640 (Gibco, Reino Unido), suplementado con 10% de suero de ternera fetal y antibióticos. Tras 3 días de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂, se lavaron dos veces las monocapas con medio libre de suero y se añadió 200 μ L de Ham's F12 (Flow, Reino Unido) libre de suero, incubando las células en este medio durante 48 horas, tras las cuales el medio se reemplazó por las muestras (suero o lisados plaquetarios). Tras 48 horas de cultivo, se añadió 1 μ Ci de timidina tritiada (Amersham) por pocillo. Las células se despegaron con tripsina-EDTA (Flow) y se recogieron en un cosechador semiautomático (Skatron, Noruega), determinando la incorporación celular de timidina por un contador de emisión β Beckman LS7000 (Beckman, Estados Unidos). La actividad proliferativa se expresó en unidades arbitrarias definidas como el 100% de estimulación del crecimiento de las células Swiss 3T3. Cada muestra se trató por duplicado, expresando el resultado como la media de dos determinaciones.

El bioensayo de CML se realizó a partir de CML de aorta torácica porcina obtenidas tras el sacrificio de 3 de los animales controles al finalizar el periodo de la dieta, modificando ligeramente metodologías descritas por otros autores¹⁹. Las CML fueron identificadas como tales en base a su típico patrón de crecimiento en "colinas y valles", característico de las CML subcultivadas, y mediante inmunofluorescencia indirecta sobre porta (Immunotech, Francia). Para realizar los ensayos de proliferación se emplearon células entre el 4º y el 6º pase, empleando la misma técnica que la arriba descrita para las células Swiss 3T3.

Estudio histológico

Al final del estudio, tras el sacrificio de los animales se procedió a la obtención de fragmentos representativos de aorta torácica, que se fijaron en formol tamponado al 10%. Para poner de manifiesto lesiones vasculares relacionadas con el acúmulo de lípidos los fragmentos se tiñeron con Rojo Sudán IV y tricrómico de Masson.

Estadística

Las variables intragrupo e intergrupo que se ajustaban a una distribución normal fueron comparadas mediante el test de la t de Student para muestras apareadas y para muestras independientes, respectivamente. Si no se ajustaban a una distribución normal se compararon mediante el test de Wilcoxon y la U de Mann-Whitney. La asociación entre variables cuantitativas se determinó mediante el test de correlación de Spearman. Los datos se expresaron como el valor medio \pm 1 desviación estándar.

RESULTADOS

No hubo diferencias significativas en el peso de los animales entre los dos grupos ni al principio ni al final del estudio. Tras el sacrificio de los animales, al final del estudio, se hallaron signos evidentes de depósitos lipídicos únicamente en la pared aórtica de los animales del grupo colesterol, puestas de manifiesto con tinción de Rojo Sudán IV que correspondían a abundantes acúmulos subintimales de macrófagos con gran cantidad de material lipídico intracitoplasmático -células espumosas- y una ligera fibrosis subintimal.

Los resultados de las determinaciones de lípidos se resumen en la tabla 1. Los niveles de colesterol total, colesterol-HDL y colesterol-LDL aumentaron significativamente en el grupo colesterol ya desde la semana 4 tras el inicio de la dieta, mostrando incrementos superiores a 5 veces el de los valores basales. La relación HDL/LDL basal fue mayor de 1 en ambos grupos, como es habitual en cerdos, invirtiéndose claramente ya desde la semana 4. Los niveles de triglicéridos y el resto de los lípidos en el grupo control no se modificaron.

Tabla 1. Evolución del perfil lipídico en el grupo control y colesterol a lo largo del estudio.

Parámetros	Control (n=10)			Colesterol (n=10)		
	Basal	4 semanas	Final	Basal	4 semanas	Final
Colesterol total (mg/dl)	66±13	63±17	69±15	68±18	302±55*	277±67*
Colesterol-HDL (mg/dl)	34±8	35±11	32±7	34±13	42±9*	45±10*
Colesterol-LDL (mg/dl)	30±16	26±12	34±12	32±21	257±51*	230±62*
Triglicéridos (mg/dl)	34±8	16±6	23±8	21±8	18±6	18±11

HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; *p<0,05.

La tabla 2 muestra los valores del recuento, volumen, masa y anchura de distribución plaquetaria, así como los resultados de las determinaciones del tiempo de sangría. Se apreció una disminución estadísticamente significativa en el VPM en los animales del grupo colesterol al final de la dieta (6,90±0,5 fL), en relación al grupo control (7,48±0,5 fL) y a sus niveles basales

(7,52±0,8 fL). El recuento plaquetario, masa plaquetaria y anchura de distribución plaquetaria no se modificaron a lo largo del estudio. El tiempo de hemorragia disminuyó significativamente en los animales del grupo colesterol al final del estudio (113,1±21 segundos versus 164,9±43 segundos del grupo control y 179,4±42 segundos basales).

Tabla 2. Recuento, volumen plaquetario medio, masa plaquetaria, anchura de distribución plaquetaria y tiempo de hemorragia basal y final en ambos grupos de animales.

Parámetros	Control (n=10)		Colesterol (n=10)	
	Basal	Final	Basal	Final
Plaquetas (x10 ¹¹ /L)	5,70±1,1	5,77±2,1	5,96±0,9	6,23±1,6
VPM (fL)	7,31±0,8	7,48±0,5	7,52±0,8	6,90±0,5*
MP (fL/L)	41,4±7,0	44,2±13	44,8±5,6	42,8±10,8
PDW (%)	52,3±2,8	50,0±2,3	54,7±3,3	51,4±4,4
TH (s)	152,6±17	164,9±43	179,4±42	113,1±21*

VPM, volumen plaquetario medio; MP, masa plaquetaria; PDW, anchura de distribución plaquetaria; TH, tiempo de hemorragia. *p<0,05.

Las concentraciones séricas de IGF-I, así como los niveles séricos e intraplaquetarios de TGF-beta-1 y PDGF-BB no variaron de manera estadísticamente significativa a lo largo del periodo del estudio en ninguno de los dos grupos. Asimismo, la capacidad proliferativa, evaluada tanto por los bioensayos de proliferación con células Swiss 3T3 y CML fue similar y no

varió a lo largo del estudio en los dos grupos de animales. No se observaron correlaciones significativas entre los niveles de los factores de crecimiento estudiados y la capacidad mitogénica de las muestras (Tabla 3). En cambio, se apreció una fuerte asociación entre la proliferación inducida sobre las Swiss 3T3 y sobre las CML tanto con suero como con lisados plaquetarios

en los dos grupos de animales, con unos coeficientes de correlación globales (para cada grupo de animales, en las dos determinaciones realizadas) de $r_s=0,836$ ($p<0,001$) para los bioensayos realizados con suero y de $r_s=0,739$ ($p<0,05$) para la proliferación inducida con lisados plaque-

tarios. Esta asociación parece lógica a la vista de que ambos tipos celulares responden, en general, de manera similar a los principales factores de crecimiento presentes tanto en el suero como en los lisados plaquetarios.

Tabla 3. Valores iniciales y finales de factores de crecimiento y capacidad mitogénica del suero y de los lisados plaquetarios en los dos grupos de animales.

Muestra		Control (n=10)		Cholesterol (n=10)	
		Basal	Final	Basal	Final
Suero	IGF-I (ng/ml)	246,6 ± 91	201,0 ± 89	173,4 ± 83	211,3 ± 67
	PDGF-BB (fmol/mL)	106,3 ± 22	108,0 ± 23	106,5 ± 31	102,6 ± 24
	TGF-β1 (pmol/L)	51,6 ± 16,4	53,6 ± 13,6	58,4 ± 28,0	30,4 ± 16,4
	Swiss 3T3 (U)	2629 ± 520	2162 ± 1090	2650 ± 903	2530 ± 1320
	CML (U)	167,2 ± 60	130,8 ± 70	156,9 ± 96	140,8 ± 62
Plaquetas	PDGF-BB (pmol/L)	171,3 ± 32	172,0 ± 51	169,1 ± 52	170,2 ± 31
	TGF-β1 (nmol/L)	9,83 ± 4,8	7,12 ± 3,9	11,6 ± 4,8	7,2 ± 3,6
	Swiss 3T3 (U)	3292 ± 702	3462 ± 903	3302 ± 1210	3030 ± 598
	CML (U)	230,6 ± 92	234,6 ± 108	258,6 ± 103	236,3 ± 70

IGF-I, factor de crecimiento similar a la insulina I; PDGF-BB, isoforma BB del factor de crecimiento derivado de las plaquetas; TGF-β1: Factor de crecimiento transformante beta-1; CML, células musculares lisas. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Los resultados descritos en el presente estudio demuestran que la hipercolesterolemia aguda, a pesar de inducir un estado de hiperreactividad plaquetaria no modifica la capacidad mitogénica ni los niveles de factores de crecimiento contenidos en el suero y en los lisados plaquetarios. Esto es cierto tanto para el PDGF, cuya principal fuente en el organismo son las plaquetas, como para el IGF-I, de síntesis predominantemente hepática, y cuya síntesis y niveles plasmáticos son especialmente susceptible a modificaciones nutricionales^{13,20}. Tanto el hecho de que la hipercolesterolemia sea capaz de inducir profundas modificaciones en la función y metabolismo proteico de la plaqueta y el megacariocito^{8,10,11}, como el hecho de que las lipoproteínas sean importantes moduladores tanto *in vivo* como *in vitro* de la síntesis de varios factores de crecimiento^{12-15,21-23}, nos sugirió la posibilidad de que la hipercole-

sterolemia pudiera modificar la síntesis de factores de crecimiento y, por tanto, pudiera contribuir al mecanismo proaterogénico de la hipercolesterolemia. Por este motivo se estudiaron los niveles séricos e intra-plaquetarios de tres factores de crecimiento implicados en la patogenia de la lesión aterosclerótica y los procesos de reparación tras daño vascular.

Aunque no podemos descartar definitivamente la posibilidad de que la hipercolesterolemia pudiera modificar los niveles de otros factores de crecimiento distintos a los estudiados, esta posibilidad parece muy improbable, puesto que tampoco hemos hallado diferencias significativas en la capacidad mitogénica de ambas muestras cuando se evaluaron mediante los dos bioensayos de proliferación. A pesar de que este hecho tampoco excluye definitivamente la posibilidad de variaciones en los niveles de otros factores de crecimiento sin modificaciones globales en la capacidad proliferativa global evaluada

mediante bioensayo, creemos que, en cualquier caso, esta posibilidad es muy remota y su relevancia sería mucho menor, dado que el PDGF es el factor de crecimiento cuantitativamente más importante en las plaquetas, y el responsable de la mayor parte de la actividad mitogénica del suero.

De manera similar, tampoco podemos excluir la posibilidad de hallar modificaciones en los niveles de factores de crecimiento o en la capacidad mitogénica del suero o de las plaquetas en hipercolesterolemias de mayor duración o magnitud, fácilmente alcanzables en otros modelos animales, como el conejo, o añadiendo sales biliares a la dieta. Sin embargo, creemos que hipercolesterolemias tan elevadas como las alcanzadas en esos modelos²⁴, de hasta el 1000% en relación a sus valores basales, aunque pueden resultar relativamente útiles en algunos modelos de aterosclerosis acelerada, no reproducen fielmente los estados de hipercolesterolemia humana. Además, el hallazgo de extensas áreas de estrías lipídicas y las alteraciones observadas en la reactividad plaquetaria (disminución del VPM y del tiempo de hemorragia) demuestran la repercusión clínica de la hiperlipoproteinemia inducida en nuestros animales del grupo colesterol. Finalmente, hemos de señalar que, en consonancia con nuestros resultados, y aunque empleando un enfoque inverso, se ha demostrado recientemente que la reducción de los niveles de colesterol con colestiramina no induce modificaciones significativas de las concentraciones séricas de PDGF²⁵.

En relación al papel que las lipoproteínas juegan por sí mismas sobre la proliferación celular, y aunque existen datos contradictorios en lo cuanto a la actividad mitogénica del suero hiperlipoproteinémico²⁶⁻²⁹, hoy en día parece claro que aunque las lipoproteínas, especialmente las LDL, inducen respuestas promotoras del crecimiento celular, como la activación del ciclo del fosfatidilinositol o la inducción de genes de activación temprana, no son mitogénicas *per se* ni mantienen por sí mismas el crecimiento de CML en cultivo³⁰.

Tomados globalmente, los resultados de nuestro estudio sugieren que la modificación en la síntesis de los factores de crecimiento IGF-I y PDGF-BB no juega un papel relevante en el mecanismo aterogénico de las hiperlipoproteinemias en el modelo estudiado. Queda abierta la posibilidad, sin embargo, de que las alteraciones funcionales plaquetarias observadas en las hiperlipoproteinemias como consecuencia de las interacciones plaquetas-lipoproteínas promuevan una mayor disponibilidad local de factores de crecimiento plaquetarios en los lugares de daño endotelial, contribuyendo así a la patogenia de la aterosclerosis y de los procesos de reparación tras daño vascular.

BIBLIOGRAFÍA

1. FUSTER V, BADIMON L, BADIMON JJ, CHESEBRO JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250.
2. ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
3. WHITE JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1994; 24(suppl.1): 25-29.
4. FERNS GAA, RAINES EW, SPRUGEL KH, MOTANI AS, REIDY MA, ROSS R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253: 1129-1132.
5. FAGIN JA, FORRESTER JS. Growth factors, cytokines and vascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 1992; 2: 90-94.
6. GRANT MB, WARGOVICH TJ, ELLIS EA, CABALLERO S, MANSOUR M, PEPINE CJ. Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. *Circulation* 1994; 89: 1511-1517.
7. POLANCO JI, BERCIANO MT, LAFARGA M, LEON J, POCIVI M, RODRÍGUEZ-REY JC. Expression of insulin-like growth factor receptor mRNA in rabbit atherosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 182-190.
8. MARTIN JF, SLATER DN, KISHK YT, TROWBRIDGE EA. Platelet and megakaryocyte changes in cholesterol-induced experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 604-612.

9. HANCOCK V, MARTIN JF, LELCHUCK R. The relationship between human megakaryocyte nuclear DNA content and gene expression. *Br J Hematol* 1993; 85: 692-697.
10. AVIRAM M, BROOK JG. Platelet activation by plasma lipoproteins. *Prog Cardiovasc Dis* 1987; 30: 61-72.
11. SCHICK BP, SCHICK PK. The effect of hypercholesterolemia on guinea pig platelets, erythrocytes and megakaryocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 833: 291-302.
12. KAMINSKI WE, JENDRASCHACK E, KIEFL R, VON SCHACKY C. Dietary w-3 fatty acids lower levels of platelet-derived growth factor mRNA in human mononuclear cells. *Blood* 1993; 81: 1871-1879.
13. PREWITT TE, UNTERMAN TG, GLICK R, COLE TG, SCHMEISSER D, BOWEN PE et al. Insulin-like growth factor I and low-density-lipoprotein cholesterol in women during high- and low-fat feeding. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 381-384.
14. FOX PL, DICORLETO PE. Modified low density lipoproteins suppress production of a platelet-derived growth factor-like protein by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4774-4778.
15. STIKO-RAHM A, HULTGARDH-NILSSON A, REGNSTRÖM J, HAMSTEN A, NILSSON J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1099-1109.
16. FIDGE N. The isolation and properties of pig plasma lipoproteins and partial characterization of their apoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1979; 295: 258-273.
17. RUCINSKI B, NIEWIAROWSKI S. Isolation and characterization of porcine platelets. *Methods Enzymol* 1989; 169: 22-34.
18. MERINO J, CASADO JA, CID J, SÁNCHEZ-IBARROLA A, SUBIRÁ ML. The measurement of transforming growth factor type b (TGFb) levels produced by peripheral blood mononuclear cells requires the efficient elimination of contaminating platelets. *J Immunol Methods* 1992; 153: 151-159.
19. ROSS R. The smooth muscle cell. II. Growth smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971; 50: 172-186.
20. CLEMMONS DR, VAN WYK JJ. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab* 1984; 13: 113-114.
21. FOX PL, DICORLETO PE. Fish oils inhibit endothelial cell production of platelet-derived growth factor-like protein. *Science* 1988; 241: 453-456.
22. ZWIJSEN RM, JAPENGA SC, HELJEN AM, VAN DEN BOS RC, KOEMAN JH. Induction of platelet-derived growth factor chain A gene expression in human smooth muscle cells by oxidized low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 1410-1416.
23. KRAEMER R, POMERANTZ KB, JOSEPH-SILVERSTEIN J, HAJJAR DP. Induction of basic fibroblast growth factor mRNA and protein synthesis in smooth muscle cells by cholesteryl ester enrichment and 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem* 1993; 268: 8040-8045.
24. GROSS PL, RAND ML, BARROW DV, PACKHAM MA. Platelet hypersensitivity in cholesterol-fed rabbits: enhancement of thromboxane A₂-dependent and thrombin-induced, thromboxane A₂-independent platelet responses. *Atherosclerosis* 1991; 88: 77-86.
25. BATH PMW, BLANN AD, WATTS GF. No association between serum platelet-derived growth factor, platelet size, and regression of angiographically-defined coronary artery disease. *Platelets* 1994; 5: 135-138.
26. KOSCHINSKY T, BÜNTING CE, RÜTTER R, GRIES FA. Increased growth stimulation of human vascular cells by serum from patients with primary hyper-LDL-Cholesterolemia. *Atherosclerosis* 1987; 63: 7-13.
27. FISCHER-DZOGA K, WISSLER RW. Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey aortic smooth muscle cells. Part 2 (effect of varying concentrations of hyperlipidemic serum and low density lipoproteins of varying dietary fat origins). *Atherosclerosis* 1976; 24: 515-525.
28. JÄRVELÄINEN H, HALME T, LEHTONEN A, RÖNNEMAA T. Serum from type IIa Hyperlipoproteinemic patients does not stimulate proliferation of and collagen synthesis in human fetal aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 1985; 56: 199-211.
29. JÄRVELÄINEN H, RÖNNEMAA T, TAMMI M, VIHERSAARI T, LEHTONEN A, VIKARI J. Type IIa hyperlipoproteinemic sera decrease the synthesis of hyaluronic acid by cultured human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1981; 39: 61-69.
30. LIBBY P, MIAO P, ORDOVAS JM, SCHAEFER EJ. Lipoproteins increase growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1985; 124: 1-8.