

REVISIÓN DE TEMAS CARDIOLÓGICOS

Participación del factor de necrosis tumoral- α en la aterosclerosis

Emma Rodríguez-Maldonado,* Alain Eduardo Hernández-Rebollar,* Rebeca López-Marure,* Felipe Massó,* Luis Felipe Montaña*

Resumen

La presente revisión menciona las características del factor de necrosis tumoral- α y el papel que esta citocina juega en el desarrollo de la lesión ateromatosa. Se describe, al detalle los efectos que tiene esta citocina sobre células endoteliales vasculares en condiciones normales así como de alto riesgo. Se propone que el TNF- α posee un papel central en el desarrollo inicial y en el progreso de la placa ateromatosa debido a que al afectarse los mecanismos de autorregulación de la célula endotelial la concentración de TNF- α se eleva de manera importante a nivel local generando, junto con la presencia local de diversos factores conocidos de riesgo, un microambiente autoperpetuable que favorece el desarrollo de la lesión ateromatosa.

Palabras clave: Aterosclerosis. Citocinas. Endotelio. Factor de necrosis tumoral- α . Factor de transcripción κ B. Moléculas de adhesión.

Key words: Atherosclerosis. Adhesion molecules. Endothelium. Cytokines. Tumor necrosis factor- α . Nuclear transcription factor κ B.

Summary

PARTICIPATION OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR
ALPHA IN ATHEROSCLEROSIS

We describe tumour necrosis factor alpha and its role in the development of the atherosclerotic lesion, and detail the effects of this cytokine upon vascular endothelial cells under normal and high risk conditions. We propose that TNF- α performs a central role in the progression of the lesion since, once the endothelial cell feedback regulatory mechanisms are altered, there is an increase in the microenvironment TNF- α concentration, which together with some of the already well known risk factors, generates an environment that favours and perpetuates the development of the atheromatous lesion. (Arch Cardiol Mex 2001; 71:241-249).

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva de las arterias cuya importancia radica en ser la primera causa de morbilidad y mortalidad en México y en otros países del mundo occidental.¹⁻³ Aunque tradicionalmente se consideran como factores de riesgo a las hiperlipidemias, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes mellitus (*Tabla I*),⁴ ha quedado establecido que la infección por agentes bacterianos y virales también contribuye en el proceso aterogénico.⁵

De acuerdo con la hipótesis de “respuesta a la lesión”⁶⁻⁸ la aterosclerosis se inicia como consecuencia de un proceso de daño repetitivo sobre el endotelio, lo que desencadena una respuesta inflamatoria en la pared vascular. Cuando el endotelio se lesiona, se provoca un desequilibrio en la producción de citocinas como IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-15, quimiocinas y factores de crecimiento⁹ producidos por las células endoteliales, que conduce a la migración de monocitos y

* Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. (INCICH. Juan Badiano No. 114080 México, D.F.)

Correspondencia:

E. Rodríguez Maldonado. Juan Badiano No. 1, México D.F. 14080. Tel. 5573-2911 ext. 1337.

Recepción: 11 de agosto de 2001

Aceptado: 30 de enero de 2001.

Tabla I. Factores de riesgo para aterosclerosis.

Hiperlipidemia
Hipertensión
Tabaquismo
Diabetes mellitus
Edad avanzada
Inactividad física
Sexo masculino
Dieta rica en grasas
Historia familiar
Hiperhomocisteinemia

linfocitos T, a la migración y proliferación de células musculares lisas (CML), al depósito de matriz extracelular y de lípidos, así como a la síntesis de proteínas que favorecen la progresión de la lesión aterosclerótica.

Factor de necrosis tumoral

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), descrito por primera vez en 1975,¹⁰ es una citocina capaz de regular procesos de inmunidad, inflamación, hemostasia y angiogénesis en el endotelio.¹¹ Es un trímero bien caracterizado y secuenciado,¹²⁻¹⁴ constituido por subunidades idénticas unidas de manera no covalente que conforman una estructura parecida a la de un cono¹⁵ (Fig. 1).

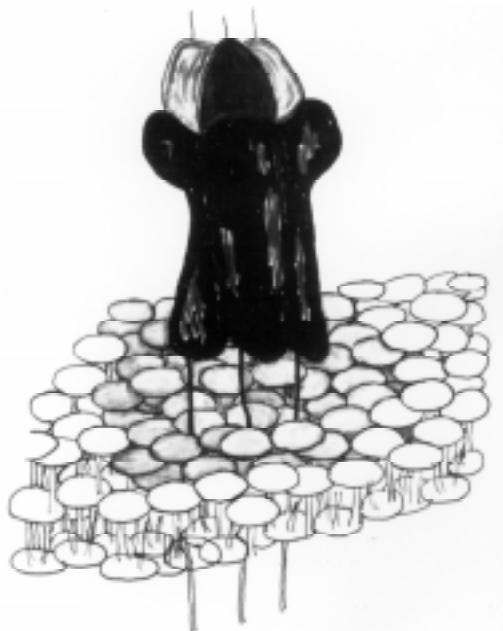


Fig. 1. Representación esquemática del TNF- α y su receptor tipo 1. Nótese las extensiones transmembranales de cada una de las tres subunidades de 17 kDa que conforman al receptor.

Cada subunidad es un péptido no glucosilado con peso de 17 kDa proveniente, mediante la actividad de una metaloproteasa, de una proteína precursora transmembranal de 26 kDa, la cual permanece unida a la membrana de los macrófagos y continúa activa aún después de la desgranulación.¹⁶⁻¹⁹ Tanto los péptidos como la proteína precursora muestran actividad citotóxica aunque a través de mecanismos diferentes; la subunidad de 17 kDa se puede encontrar en la circulación en forma libre.²⁰

Aunque los principales productores de TNF- α son los macrófagos,²¹ los granulocitos,²² las células musculares vasculares,²³ y los linfocitos,²⁴ las células endoteliales²⁵ también son capaces de secretarlo; puede ser inducido por lipopolisacárido bacteriano e IL-1.²⁶ El TNF- α actúa de manera sinérgica con la IL-2 en la protección contra neoplasias.^{27,28} Además se le atribuye un papel protector en ciertas infecciones intracelulares por virus,²⁹ parásitos³⁰ y bacterias.³¹ Sin embargo, se reconoce que también está implicado en diversos estados patológicos como fiebre,³² resorción ósea, caquexia, choque endotóxico, SIDA, diabetes mellitus, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn.³³⁻³⁹ Uno de sus efectos consiste en inhibir la actividad de la lipoproteína lipasa, lo que desfavorece la utilización de ácidos grasos e induce la síntesis de proteínas hepáticas de fase aguda.^{40,41} Por lo tanto, parece ser que la liberación regional o sistémica del TNF- α es en parte responsable de algunos de los efectos patológicos de una gran variedad de enfermedades inflamatorias.

El TNF- α interactúa con receptores específicos de la superficie celular. Estos receptores son proteínas transmembranales constituidas por dos subunidades idénticas y se clasifican en TNFR-1 (55 kDa) y TNFR-2 (75 kDa).⁴² Aunque ambos receptores presentan alta afinidad por el TNF- α , la mayoría de los procesos celulares mediados por esta citocina requieren del TNFR-1.⁴³ La función del TNFR-2 no se conoce con exactitud pero parece potenciar las señales del TNF- α incrementando la concentración de esta citocina en la vecindad del TNFR-1.⁴⁴ Esta función de soporte es compatible con el modelo de "pase de ligando".⁴⁵ La unión del TNF- α con TNFR-1 activa una fosfolipasa C específica (PC-PLC) que sintetiza diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilcolina.⁴⁶ El DAG es un segundo mensajero que activa dos enzimas: una proteína cinasa C (PKC) y una esfingomielinasa (SMasa). Aunque la activación de la PKC es dependiente de calcio, la PKC activada por TNF- α es

una isoforma independiente de calcio.⁴⁷ Se han descrito dos tipos de SMasas capaces de responder a la activación de TNF- α , la SMasa-ácida (A-SMasa) que se localiza en endosomas o lisosomas y la SMasa-neutra (N-SMasa), localizada en la membrana citoplasmática. La ceramida actúa como un tercer mensajero y la señal que genera depende del tipo de SMasa que lo produce. Se ha demostrado que la ceramida actúa de manera similar al TNF- α en células endoteliales humanas, ya que inhibe la proliferación y afecta a proteínas reguladoras del ciclo celular.^{47A} La N-SMasa se activa 90 segundos después del tratamiento con TNF- α ,⁴⁸ lo que sugiere un acoplamiento directo con el receptor e independencia del DAG. La ceramida, producto de esta esfingomielinasa activa MAP-cinasas y CAPK-cinasas⁴⁹ que desencadenan la síntesis de ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos involucrados en la respuesta inflamatoria. La A-SMasa es dependiente de DAG y está relacionada con la inducción de factores de transcripción como el NF- κ B,^{50,51} el cual regula la inducción de genes que codifican proteínas inmunológicamente relevantes.⁵² Esto sugiere

que la N-SMasa activa vías no génicas mientras que la A-SMasa y algunas cinasas específicas activan vías génicas (Fig. 2). Otros inductores de NF- κ B son: estrés oxidativo, LPS, virus, DNA bicatenario, peróxido de hidrógeno, lipoproteínas mínimamente modificadas, altas concentraciones de glucosa y lípidos insaturados.⁵³⁻⁵⁶ Se han identificado varios sitios de unión κ B en la región promotora del gen que codifica para el TNF- α , lo que indica que el NF- κ B interviene tanto en la síntesis como en las acciones mediadas por el TNF- α , amplificando de esta manera la respuesta inflamatoria.

TNF- α y el endotelio

Se sabe que la mayoría de las actividades del TNF- α provocan disfunción en las células endoteliales, mediante la inducción de cambios morfológicos y funcionales^{57,58} que han sido catalogados como activación endotelial (Tabla II). El TNF- α incrementa la permeabilidad del endotelio y la adherencia de leucocitos a esta monocapa⁵⁹⁻⁶¹ a través de la inducción de moléculas de adhesión celular como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1.⁶²⁻⁶⁴ El TNF- α activa la quimiotaxis de leucocitos de manera directa⁶⁵ o a través de la secreción endotelial de quimiocinas como la IL-8 y la MCP-1, lo que favorece su migración a los sitios de lesión vascular (Figs. 3A y 3B). Lo anterior, explica el porque los monocitos y ciertos subtipos de linfocitos T están presentes en la lesión aterosclerótica.⁶⁶ Además el TNF- α influye en los eventos inflamatorios vasculares al regular la secreción endotelial de IL-1 e IL-6 e inducir la actividad de ciclooxigenasa y por ende la síntesis de prostaciclina (PGI₂).⁶⁷

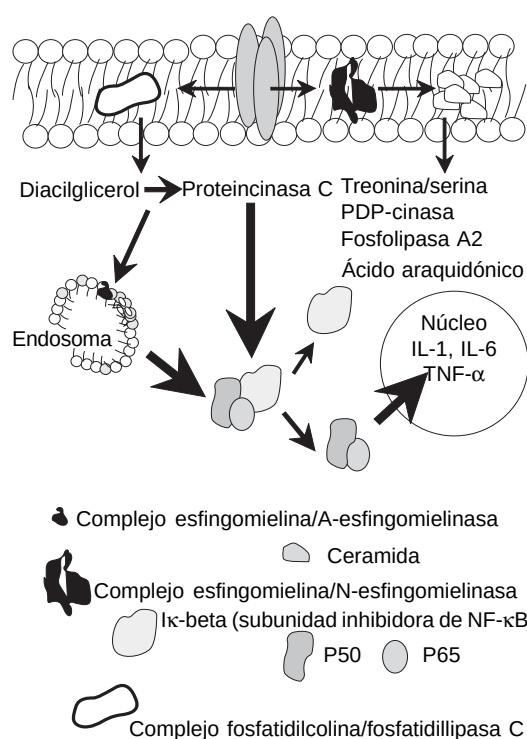


Fig. 2. Representación de las vías metabólicas que se generan en una célula endotelial por la activación mediada por el complejo TNF- α /TNFR-1, de las diferentes esfingomielinasas en condiciones normales. Las moléculas inmunes que se inducen en condiciones normales son IL-1, IL-6 y TNF- α .

Tabla II. Procesos mediados por el TNF- α sobre el endotelio con posible implicación durante la aterogénesis.

- Inducción de IL-1, IL-6 e, IL-8
- Producción de GM-CSF
- Producción de factores de crecimiento como HB-EGF.
- Incremento de la permeabilidad celular endotelial.
- Inducción de estrés oxidativo.
- Disminución de glutatión e incremento de calcio intracelular.
- Disminución de AMPc.
- Activación de proteasas de matriz.
- Quimiotaxis endotelial.
- Angiogénesis.
- Inducción de apoptosis celular endotelial.
- Quimiotaxis leucocitaria.
- Proliferación y migración de CML.

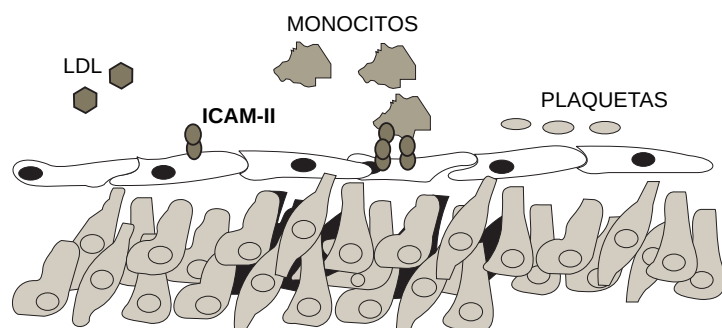


Fig. 3A. Cuando la célula endotelial está en un ambiente enriquecido en macrófagos activados, $\text{TNF-}\alpha$ y LDL's, la proteinasa que se activa es la PKC α y las citocinas que sintetiza y libera la célula son IL-8 y MCP-1, además de que sintetiza y expresa una tríada de moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, E-selectina) que contribuyen al proceso quimioatractante. También se incrementa de manera importante la cantidad de TNFR-1 en la superficie celular.

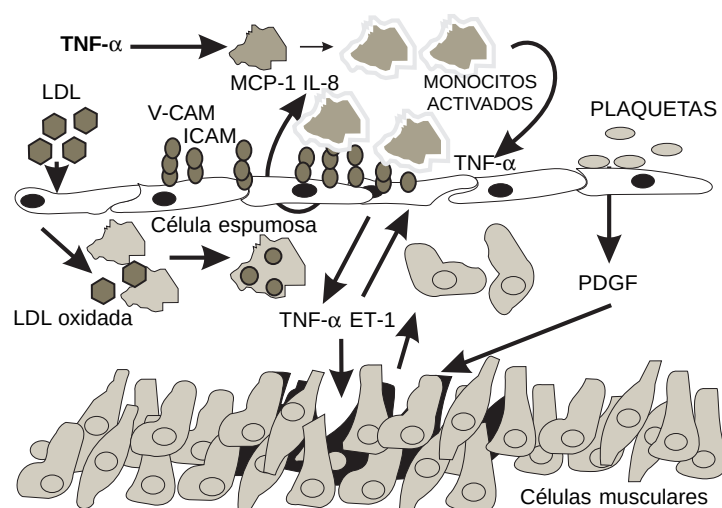


Fig. 3B. Representación de un microambiente normal en el cual las células endoteliales y las células musculares están en estrecho contacto. La expresión de ICAM-II en la superficie celular es mínima.

TNF- α en la aterosclerosis

Modelos animales de aterosclerosis involucran al $\text{TNF-}\alpha$ en los eventos inflamatorios asociados con este trastorno vascular.⁶⁸ Barath y colaboradores⁶⁹ detectaron por primera vez $\text{TNF-}\alpha$ en el citoplasma de macrófagos, en células endoteliales y en células musculares de la pared vascular de ateroma humano. Ras y colaboradores⁷⁰ demostraron que la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ se encuentra aumentada en arterias con aterosclerosis, respecto a arterias sanas y observaron además, que dicha concentración era mayor que la detectada en el suero. Esto implica

que el $\text{TNF-}\alpha$ se produce de manera local en la pared vascular.

El $\text{TNF-}\alpha$ promueve la expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I y II sobre el endotelio.^{71,72} Una lesión temprana reconocible en la íntima arterial en la aterosclerosis es la "estría grasa", que está constituida por macrófagos y linfocitos T cargados de lípidos³ (células espumosas), muchos de los cuales se encuentran activados y tienen la capacidad de presentar antígenos en el contexto de moléculas de histocompatibilidad clase II,⁶⁶ lo cual es crítico para la amplificación de una respuesta inflamatoria local. La migración transendotelial de los monocitos y linfocitos está mediada por moléculas de adhesión y se favorece por el $\text{TNF-}\alpha$ liberado por las células endoteliales y subendoteliales. El análisis inmunohistoquímico de arterias con aterosclerosis ha mostrado un incremento en la expresión de moléculas de E-selectina, ICAM-1 y V-CAM-1.^{73,74} El hecho de que se presente una respuesta inflamatoria localizada que puede ser mantenida por largos periodos, favorece la disfunción endotelial y como consecuencia, el aumento local de moléculas de adhesión y de otras moléculas implicadas en la trans migración de leucocitos.

Se ha descrito una asociación entre la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ y la progresión de la placa.⁷⁵ En pacientes con lesiones ateroscleróticas carotídeas avanzadas se ha detectado una mayor expresión de $\text{TNF-}\alpha$ cuando cursan con síntomas isquémicos.⁷⁶ Es posible que el incremento local de esta citocina contribuya al establecimiento de isquemia, al promover la conversión de la placa de ateroma en un sitio protrombótico. Lo anterior tiene sentido ya que el $\text{TNF-}\alpha$ transforma el endotelio es una superficie coagulante a través de la regulación negativa de funciones antitrombóticas⁷⁷ y la regulación positiva de moléculas protrombóticas tales como el factor tisular y el factor von Willebrand,⁷⁸ las cuales podrían contribuir a la formación de una red adhesiva de plaqueta-fibrina durante la progresión de la placa. Fyfe y colaboradores⁷⁹ detectaron una elevada concentración de $\text{TNF-}\alpha$ en sangre coronaria de pacientes con trasplante cardíaco que desarrollaron aterosclerosis coronaria acelerada. Algunas de las complicaciones asociadas a un infarto extenso de miocardio (hipotensión, edema pulmonar y/o arritmias) parecen relacionarse a una concentración sérica de $\text{TNF-}\alpha$ igual o mayor a 145 ng/L.⁸⁰ Aunque aún no está claro si estos eventos son de importancia patogénica o sólo un evento secunda-

rio, la presencia del TNF- α en sitios de lesión y los hallazgos en modelos animales apoyan un mecanismo fisiológico.

Mecanismos patogénicos del TNF- α propuestos en la aterosclerosis

La hipercolesterolemia se relaciona directamente con la aparición de lesiones de aterosclerosis. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que suelen formar complejos con el colesterol, son capaces de inducir la expresión de TNF- α e IL-1 en macrófagos de manera proporcional a su dosis.⁸¹ El incremento del TNF- α en la periferia de las células endoteliales promueve su activación y autorregula su producción,^{23,25} la cual es también modulada por ácidos grasos a través de la activación del factor NF- κ B.⁸² Resulta interesante que en ratones que carecen de TNFR-1 haya un incremento en el tamaño de las lesiones ateroscleróticas, comparado con animales silvestres.⁸³ Más aún, en las lesiones de estos ratones, hay un au-

mento en la expresión de los receptores barrenderos (scavenger), los cuales participan en la captura de lipoproteínas modificadas (LDL acetiladas) por los macrófagos, lo que favorece la formación de la estría grasa. Este mecanismo puede potenciar de manera importante la producción de TNF- α y producir la respuesta inflamatoria que conduce a la lesión endotelial inicial.

Las acciones del TNF- α sobre las células endoteliales, como en los macrófagos, se realizan mediante su interacción con los receptores TNFR-1 y TNFR-2.⁸⁴ El primero es el receptor más abundante en la célula endotelial; su significado funcional en la activación endotelial es evidente, en tanto que no lo es para el TNFR-2. La unión del de TNF- α con TNFR-1 incrementa la expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1,^{85,86} así como la secreción de IL-8 y MCP-1,⁸⁷ moléculas involucradas en el proceso aterogénico. Esta última observación ha sido corroborada y ampliada por nosotros.⁸⁸ Estos hallazgos sugieren que el receptor TNFR-1

Macrófago activado

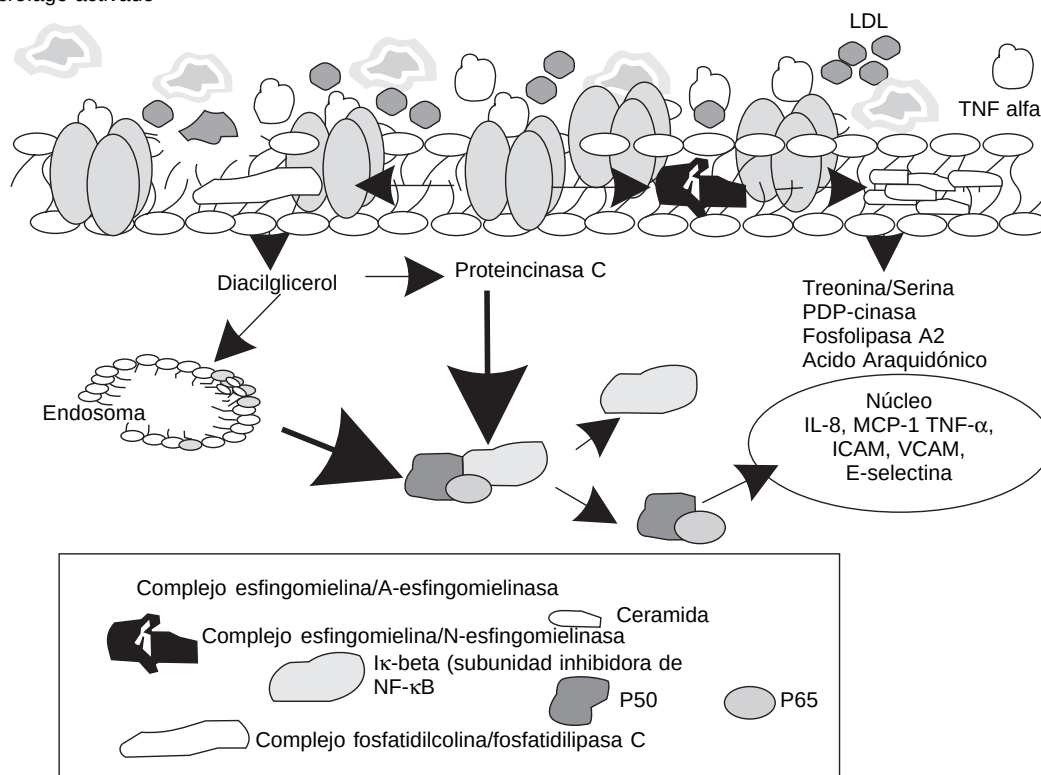


Fig. 4. Cuando el microambiente se altera (ver figura 2B), se genera una serie de procesos mediados por macrófagos que oxidan LDL's e inducen la formación de células espumosas; a la vez se incrementa de manera muy importante la concentración local de TNF- α que incrementa la expresión de moléculas de adhesión, la liberación de citocinas, liberación de endotelina-1 y la generación de un microambiente que genera señales de "daño endotelial" con la consiguiente llegada de plaquetas y liberación de PDGF que hace que las células musculares proliferen.

regula los mecanismos de defensa del hospedero y es un mediador primario en los procesos de adhesión, migración, reclutamiento y transformación de los macrófagos durante la aterogénesis (Fig. 4). Existen pocos reportes acerca de la transducción de señales por TNF- α en células endoteliales. En contraste con otros tipos celulares, la expresión endotelial de moléculas de adhesión inducida por TNF- α , parece realizarse sin la participación de PC-PKC o mecanismos dependientes de calcio. Sin embargo, se ha descrito que la PKC ζ , una proteína cinasa C atípica, independiente de ésteres de forbol y Ca⁺⁺, se activa directamente por ceramida inducida por TNF- α ⁸⁹. Esta cinasa se localiza en el citosol y activa al factor NF- κ B. La activación de NF- κ B se inicia con la fosforilación de la subunidad I- κ B, que parece realizarse directamente por la PKC ζ . La I- κ B fosforilada se degrada y libera el heterodímero p50/65, que se transloca al núcleo y se une a regiones promotoras de varios genes

relacionados con el proceso inflamatorio, así como al de la subunidad inhibidora I- κ B, lo que implica que éste es un sistema inducible autorregulado durante la activación endotelial.⁹⁰

En conclusión, los hallazgos antes descritos colocan al TNF- α como un posible inductor y regulador crucial en el proceso aterogénico. Los factores de riesgo, como el aumento en las concentraciones de LDL o infecciones recurrentes pueden inducir la activación endotelial a través de la inducción de TNF- α . Inicialmente, el endotelio podría restringir el reclutamiento de macrófagos y regular así la formación y desarrollo de la estría grasa. Sin embargo, es probable que las células endoteliales de una región determinada, expuestas repetidamente al TNF- α , pierdan su capacidad de autorregulación y entonces aumente la transmigración celular y la acumulación de lípidos en el espacio subendotelial favoreciendo así el desarrollo de la placa ateromatosa.

Referencias

1. POSADAS-ROMERO C, TAPIA-CONYER R, LERMAN-GARBER I, ZAMORA-GONZÁLEZ J, CARDOSO-SALDANA G, SALVATIERRA-IZABA B ET AL: *Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population*. *Atherosclerosis* 1995; 118: 275-284.
2. RODRÍGUEZ SALDAÑA J, CANTÚ BRITO C, SOSA ESPINOSA O, REYNOSO MARENCO MT, ZUCKERMANN FOULLON D, BARINAGARREMENTERIA ALDIZ F: *Prevalence of carotid atherosclerosis in a cohort of Mexico City*. *Arch Inst Cardiol Mex* 1998; 68: 44-50.
3. ROSS R: *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature* 1993; 362: 801-809.
4. VOGEL RA: *Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review*. *Clin Cardiol* 1997; 20: 426-432.
5. METHA JL, SALDEEN TGP, RAND KR: *Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease*. *J Am Coll Cardiol*, 1998; 31: 1217-1225.
6. MUNRO JM, COTRAN RS: *The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation*. *Lab invest* 1988; 58: 249-261.
7. BERLINER JA, NAVAB M, FOGELMAN AM, FRANK JS, DEMER LL, EDWARDS PA: *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation and genetics*. *Circulation* 1995; 91: 2488-2496.
8. ROSS R: *Atherosclerosis-an inflammatory disease*. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
9. KRISHNASWAMY G, KELLEY J, YERRA L, SMITH JK, CHI DS: *Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human diseases*. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 91-104.
10. CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B: *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.
11. MANTOVANI A, BUSSOLINO F, INTRONA M: *Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to bedside*. *Immunol Today* 1997; 18: 231-240.
12. AGGARWAL BB, KHOR WJ, HASS PE, MOFFAT B, SPENCER SA, HENZEL WJ, ET AL: *Human tumour necrosis factor. Production purification and characterization*. *J Biol Chem* 1985; 260: 2345-2354.
13. WANG AM, CREASEY AA, LANDNER MB, LIN LS, VAN ARSDELL JSJN, YAMAMOTO R, ET AL: *Molecular cloning of the complementary DNA for human tumour necrosis factor*. *Science* 1985; 228: 149-154.
14. SHIRAI T, YAMAGUCHI H, ITO H, TODD CW, WALLACE B: *Cloning and expression in Escherichia coli of the gene, for human tumour necrosis factor*. *Nature* 1985; 313: 803-806.
15. JONES EY, STUART DI, WALKER NPC: *Structure of tumour necrosis factor*. *Nature* 1989; 338: 225-228.
16. PENNICA D, NEDWIN GE, HAYFLICK JS, SEEBURG PH, DERYNCK R, PALLADINO MA, ET AL: *Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin*. *Nature* 1984; 312: 724-729.

17. KRIEGLER M, PEREZ C, DEFAY K, ALBERT I, LU SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45-53.
18. CROWE PD, WALTER BN, MOHLER KM, OTTEN-EVANS C, BLACK RA, WARE C: A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 181: 1205-1210.
19. MOSS ML, JIN SL, MILLA ME, BRKHART W, CARTER HL, CHEN WJ, ET AL: Cloning of a desintegrin metalloprotease that process precursor tumour-necrosis factor. *Nature* 1997; 385: 729-733.
20. BEUTLER B, MAHONEY J, LE TRANG N, PEKALA P, CERAMI A: Purification of cachectin a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985; 161: 984-995.
21. NISSEN-MEYER J, HAMMERSTROM J: Physicochemical characterization of cytostatic factors released from human monocytes. *Infect Immun* 1982; 38: 67-73.
22. DUBRAVEC DB, SPRIGGS DR, MANNICK JA, RODRICK ML: Circulating human peripheral blood granulocytes synthesise and secrete tumour necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6758-6761.
23. WARNER SJC, LIBBY P: Human vascular smooth muscle cells: target for and source of tumour necrosis factor. *J Immunol* 1989; 142: 100-109.
24. TRINCHIERI G: Regulation of tumour necrosis factor production by monocytes, macrophages and lymphocytes. *Immunol Res* 1991; 10: 89-103.
25. KAHALEH MB, ZHOU S: Induction of tumour necrosis factor (TNF) synthesis by endothelial cells upon exposure to rTNF. *Arthritis Rheum* 1989; 32: S 124.
26. TIPPING PG, HANCOCK WW: Production of tumour necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol* 1993; 142: 1721-1728.
27. CHOUAIB S, BERTOGLIO J, BLAY JY, MARCHIOL-FOURNIGAULT C, FRADELIZI D: Generation of lymphokine-activated killer cells: synergy between tumour necrosis factor and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6875-6879.
28. SUGARMAN BJ, AGGARWAL BB, HASS PE, FIGARI IS, PALLADINO MA Jr, SHEPARD HM: Recombinant human tumour necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230: 944-945.
29. WONG GHW, GOEDEL DV: Tumour necrosis factors- α and β inhibit virus replication and synergies with interferon's. *Nature* 1986; 323: 819-822.
30. TAVERNE J, MATTHEWS N, DEPLEDGE P, PLAYFAIR JHL: Malarial parasites and tumour cells are killed by the some component of tumour necrosis serum. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 293-300.
31. HAVELL EA: Evidence that tumour necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J Immunol* 1989; 143: 2894-2899.
32. DNARELLO, CA, CANNON JG, WOLFF SM, BERNHEIM HA, BEUTLER B, CERAMI A, ET AL: Tumour necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; 163: 1433-1450.
33. BERTOLINI DR, NEDWIN GE, BRIMGMAN TS, SMITH DD, MUNDY GR: Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; 319: 516-518.
34. HOTAMISLIGIL G, MURRAY D, SPIEGELMAN BM: Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes: central role of tumour necrosis factor- α . *J Clin Invest* 1994; 94: 1543-1549.
35. TRACEY KJ, BEUTLER R, LOWRY SF, MERRYWEATHER J, WOLPE S, MILSARK IW, ET AL: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470-474.
36. HOTAMISLIGIL GS, ARNER P, CARO JF, ATKINSON RL, SPIEGELMAN BM: Increased adipose tissue expression of tumour necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.
37. EIGLER A, SINHA B, HARTMANN G, ENDRES S: Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today* 1997; 18: 487-492.
38. TABIB A, LEROUX C, MORNEX JF, LOIRE R: Accelerated coronary atherosclerosis and arteriosclerosis in young human-immunodeficiency virus-positive patients. *Coron Artery Dis* 2000; 11: 41-46.
39. CHARLES P, ELLIOT MJ, DAVIS D, POTTER A, ANTONI C, BREEDUELD FC, ET AL: Regulation of cytokines, cytokine inhibitor, and acute-phase proteins followin ant-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1999; 163: 1521-1528.
40. MORIN CL, SCHLAEPFER IR, ECKEL RH: Tumour necrosis factor- α eliminates binding of NF- κ B and an octamer-binding protein to the lipoprotein lipase promoter in 3T3-L 1 adipocytes. *J Clin Invest* 1995; 95: 1684-1689.
41. PERMUTTER DH, DINARELLO CA, PUNSEL PI, COLTEN HR: Cachectin/tumour necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest* 1986; 78: 1348-1354.
42. TARTAGLIA LA, GOEDEL DV: Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13: 151-153.
43. HOBMAN HP, REMY R, PÖSCHL B, VAN LOON APGM: Tumour necrosis factor alpha and beta bind to the same two types of tumour necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF- κ B at low receptor accuracy and within minutes after receptor binding. *J Biol Chem* 1990; 265: 15183-15188.
44. TARTAGLIA LA, PENNICA D, GOEDEL DV: Ligand passing: The 75 kDa tumour necrosis

- factor (TNF) receptor recruits TNF for signalling by the 55 kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 18542-18548.
45. SLOWIK MR, DE LUCA LG, FIERIS W, POBER JS: Tumour necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumour necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumour necrosis factor concentration. *Am J Pathol* 1993; 143: 1724-1730.
 46. SHÜTZE S, BERKOVIC D, TOMSING O, UNGER C, KRÖNKE M: Tumour necrosis factor induces rapid production of 1'2'diacylglycerol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Exp Med* 1991; 174: 975-988.
 47. MEICHLE A, SHÜTZE S, HENSEL G, BRUNSING D, KRÖNKE M: Protein kinase-C-independent activation of nuclear factor κ B by tumour necrosis factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 8339-8343.
 - 47A. LÓPEZ-MARURE R, VENTURA JL, SÁNCHEZ L, MONTAÑO F, ZENTELLA A: Ceramide mimics tumour necrosis factor- α in the induction of cell cycle arrest in endothelial cells. Induction of the tumour suppressor p53 with decrease in retinoblastoma/protein levels. *Eur J Biochem* 2000; 267:4325-4333.
 48. WIEGMANN K, SHÜTZE S, MACHLEIDT T, WITTE D, KRÖNKE M: Functional Dichotomy of neutral acidic sphingomyelinases in tumour necrosis factor signalling. *Cell* 1994; 78: 1005-1015.
 49. LIU, MATHIAS S, KOIESNICK RN: Renaturation and tumour necrosis factor- α stimulation of a 97 kDa ceramide-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 3047-3052.
 50. READ MA, NEISH AS, LUSCINSKAS FW, PALOMBELLA VJ, MANIATIS T, COLLINS T: THE PROTEASOME PATHWAY IS REQUIRED FOR CYTOKINE-INDUCED ENDOTHELIAL-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995; 2: 493-506.
 51. SCHÜTZE S, POTTHOFF K, MACHLEIDT T, BERKOVIC D, WIEGMANN K, KRÖNKE M: TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992; 71: 765-776.
 52. THANOS D, MANIATIS T: NF- κ B: A lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-532.
 53. DRÖGE W, SCHULZE-OSTHOFF K, MIHM S, GALTER D, SCHENK H, ECK H-P: Functions of glutathione disulphide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994; 8: 1131-1138.
 54. SCHRECK R, ALBEMANN K, BAEURELE PA: Nuclear Factor κ B: an oxidative stress responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review), *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 221-237.
 55. PARHAMI F, FANG ZT, FOGELMAN AM, ANDALIBI A, TERRITO MC, BERLINER JA: Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 1993; 92: 471-478.
 56. GUJA M, BAI W, NADLER JL, NATARAJAN R: Molecular mechanisms of tumour necrosis factor- α gene expression in monocytic cells via hyperglycaemia-induced oxidative stress-dependent and independent pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 17728-17739.
 57. CAVENDER D, EDELBAUM D, ZIFF M: Endothelial cell activation induced by tumour necrosis factor and, lymphotoxin. *Am J Pathol* 1989; 134: 551-560.
 58. BECKER BF, HEINDL B, KUPATT C, ZÄHLER S: Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000; 89: 160-167.
 59. STOLPEN AH, GUINAN EC, FIERIS W, POBER JS: Recombinant tumour necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* 1986; 123: 16-24.
 60. BEVILACQUA MP, POBER JS, WHEELER ME, COTRAN RS, GIMBRONE MJ JR: Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985; 76: 2003-2011.
 61. GAMBLE JR, HARLAN JM, KLEBANOFF SJ, VADAS MA: Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumour necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8667-8671.
 62. BEVILACQUA MP, POBER JS, MENDRICK DL, COTRAN RS, GIMBRONE MA JR: Identification of inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9238-9242.
 63. SZEKANECZ Z, SHAH MR, PEARCE WH, KOCH AE: Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and soluble ICAM-1 (sICAM-1) production by cytokine-activated human aortic endothelial cells: a possible role for ICAM-I and sICAM-I in atherosclerotic aortic aneurysms. *Clin Exp Immunol* 1994; 98: 337-343.
 64. CARLOS TM, SCHWARTZ BR, KOVACH NL, YEE E, ROSSO M, OSBORN L ET AL: Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990; 76: 965-970.
 65. MING WJ, BERSANI L, MANTOVANI A: Tumour necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987; 138: 1469-1474.
 66. VAN DER WALL AC, DAS PK, BENTZ VAN DE BERG DB, VAN DER LOOS CM, BEEKER AE: Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989; 61: 166-170.
 67. ENDO K, AKAHOSHI T, KASHIWAZAKI S: Additive effects of IL-1 and TNF on induction prostacyclin synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 156: 1007-1014.

68. FLECT JC, CLINTON SK, SALOMON RN, LOPPNOW H, LIBBY P: *Atherogenic diets enhanced endotoxin-stimulated interleukin-1 and tumour necrosis factor gene expression in rabbit aortal*. J Nutr 1992; 122: 294-305.
69. BARATH P, FISHBGIN MC, CAO J, BERENSON J, HELFANT RK FORRESTER JS: *Detection and localization of tumour necrosis factor in human atheroma*. Am J Cardiol 1990; 65: 297-302.
70. RUS HG, NICULESCU F, MAICU R: *Tumour necrosis factor-alpha in human arterial wall wit atherosclerosis*. Atherosclerosis 1991; 89: 247-254.
71. NAGURA H, OHTANI H: *Expression of major histocompatibility class-II antigens by vascular endothelial cells leads to amplified immunoinflammatory processes*. Acta Histochem Cytochem 1992; 25: 653-660.
72. JOHNSON DR, POBER JS: *Tumour necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy-and light-chain genes in vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5183-5187.
73. VAN DER WAL AC, DAS PK, TIGGES AJ, BECKER AE: *Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions*. Am J Pathol 1992; 141: 1427-1433.
74. O'BRIEN KD, ALLEN MD, McDONALD TO, CHAIT A, HARLAN JM, FISHBEIN D ET AL: *Vascular cell adhesion molecule-I is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis*. J Clin Invest 1993; 92: 945-951.
75. LEI X, BUJA LM: *Measurement by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of the levels of tumour necrosis factor alpha mRNA in atherosclerotic arteries in Watanabe Hereditabe Hyperlipidemic Rabbits*. Lab Invest 1996; 74: 136-145.
76. DEGRABA TJ: *Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque*. Neurology 1997; 49: S15-S19.
77. CONWAY EM, ROSENBERG RD: *Tumour necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells*. Mol Cell Biol 1988; 8: 5588-5592.
78. NAWROTH PP, STERN DM: *Modulation of endothelial cell haemostatic properties by tumour necrosis factor*. J Exp Med 1986; 163: 740-745.
79. FYFÉ A, DALY P, GALLIGAN L, PIRIC L, FEINDEL C, CARDELLIA C: *Coronary sinus sampling of cytokines after heart transplantation: evidence of macrophage activation and interleukin-4 production within the graft*. J Am Coll Cardiol 1993; 21: 171-176.
80. MAURY CPJ, TEPPA AM: *Circulating tumour necrosis factor- α (cachectin) in myocardial infarction*. J Int Med 1989; 225: 333-336.
81. BARATH P, CAO J, FORRESTER JS: *Low density lipoprotein activates monocytes to express tumour necrosis factor*. FEBS Letters 1990; 277: 180-184.
82. TOBOREK M, HENNIG B: *Is endothelial cell autocrine production of tumour necrosis factor a mediator of lipid induced endothelial dysfunction?* Medical Hypotheses 1996; 47: 337-382.
83. SCHREYER SA, PESCHON JJ, LeBOEUF RC: *Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumour necrosis factor receptor p55*. J Biol Chem 1996; 271: 26174-26178.
84. PALEOLOG EM, DELASALLE S-AJ, BURMAN WA, FELDMANN M: *Functional activities of receptors of tumour necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells*. Blood 1994; 84: 2578-2590.
85. MACKAY F, LOETSCHER H, STUEBER D, GEHR G, LESSLAUER W: *Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type TNF-R55*. J Exp Med 1993; 177: 1277-1286.
86. PENG Q, WEI Z, LAU BH: *Pyconogenol inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced nuclear factor Kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells*. Cell Mol Life Sci 2000; 57: 834-841.
87. MÜLLER G, AYOUB M, STORRZ P, RENNECKE J, FABBRO D, PFIZENMAIER K: *PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid*. EMBO J 1995; 14: 1961-1969.
88. RODRÍGUEZ E, HERNÁNDEZ A, LÓPEZ R, PAEZK MASSÓ F, MONTAÑO LF: *Chemokine secretion, but not its transcription, is inhibited by 17 β -estradiol in TNF-alpha stimulated HUVEC's*. Cardiovascular Res (en revisión).
89. READ MA, WHITLEY MZ, WILLIAMS AJ, COLLINS T: *NF- κ B and I κ B α : an inducible regulatory system in endothelial cell activation*. J Exp Med 1994; 179: 503-512.
90. OHTA MY, NAGAI Y, TAKAMURA T, NAHORA E, KOBAYASHI K: *Inhibitory effect of troglitazone on TNF-alpha-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human endothelial cells*. Diabetes Res Clin Pract 2000; 48: 171-176.