

Altas concentraciones de Interleucina-10 inducen daño sobre el endotelio vascular

High concentrations of Interleukin-10 cause damage to vascular endothelium

J. Buján - J. M. Bellón - M. J. Gimeno - N. García-Hondurilla -
J. A. Pareja - M. Alvarez de Mon*

Departamento de Ciencias Morfológicas y
Cirugía y Departamento de Medicina*
Facultad de Medicina
Universidad de Alcalá de Henares
Madrid (España)

RESUMEN

El papel inmunomodulador que las citocinas muestran sobre células inmunitarias ha sido objeto de estudio en estos últimos años, sin embargo, es menos conocido su posible acción sobre el Sistema Vascular, especialmente en células endoteliales (CE), con las que las células blancas establecen estrechas relaciones en respuesta a cualquier tipo de agresión de la pared vascular. Por ello el objeto del presente trabajo se centra en el estudio de la Interleucina (IL)-10 y las CE, valorando la respuesta morfológica y funcional, medida como presencia de plaquetas sobre el endotelio.

CE procedentes de Vena Umbilical humana y en pasaje de primer subcultivo fueron incubadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de IL-10, desde 1 a 100 ng/ml. Por otro lado, plasma rico en plaquetas (PRP) se añadió a cada uno de los grupos de estudio durante 30 minutos. Los cultivos obtenidos fueron procesados por microscopía óptica y electrónica de barrido. Se realizaron recuentos plaquetarios con un hemocitómetro.

Cuando las células son incubadas en presencia de bajas concentraciones de IL-10 (< 50 ng/ml), tanto la viabilidad como la morfología de las células cultivadas se mantiene normal, de forma similar a los grupos controles. Mayores concentraciones de la citocina inducen cambios en los cultivos, de modo que la morfología celular muestra signos

degenerativos conducentes a la muerte celular programada.

Cuando se incuban las CE moduladas con IL-10 en presencia de PRP se observa que la adhesión plaquetaria aumenta a medida que lo hacen las concentraciones de IL-10, efectuándose el depósito de plaquetas de modo centrípeto sobre el soma celular.

Por tanto, podemos concluir que altas concentraciones de IL-10 inducen, sobre CE en cultivo de 24 horas, apoptosis y aumento de la adhesión plaquetaria.

Palabras clave: Interleucina 10; agregación plaquetaria; cultivo; célula endotelial.

SUMMARY

The modulatory action of cytokines on cells of the immune system has been the subject of several recently published studies. The possible effect of cytokines on the Vascular System, and specifically on endothelial cells (EC), has not yet been widely explored. White blood cells are able to establish close relationship with EC in response to injury to the vascular wall. The aim of the present investigation is to study the morphological and functional response of EC to Interleukin (IL)-10 estimated by the presence of platelets on the endothelium.

EC from human umbilical cord were cultured. Cells from the first passage were incubated for 24h with increasing concentrations of IL-10 (1 to 100 ng/ml). Platelet rich plasma (PRP) was added to cultures in each test group for 30 min. The resultant cultures were processed for light and scanning-electron microscopy. Platelet counts were performed using a hemocytometer.

EC incubated with low concentrations of IL-10 (< 50 ng/ml) showed similarity to those of control groups with respect to viability and morphology. Higher cytokine concentrations induced symptoms of degeneration in cultured cells leading to programmed cell death.

When the IL-10-modulated EC were incubated with PRP, platelet adhesion was seen to increase with increasing IL-10 concentrations. Platelets were deposited in a centripetal manner over the cell cytoplasm.

It may be concluded that high IL-10 concentration induce apoptosis in, and increase platelet adhesion to EC in culture.

Keywords: Interleukin 10; platelet aggregation; culture; endothelial cell.

Introducción

La túnica íntima de los vasos es una monocapa constituida por CE que contribuyen prioritariamente al mantenimiento de la homeostasis vascular. Es bien conocida su capacidad de respuesta a la lesión, en la que participan las plaquetas como elementos desencadenantes de una serie de eventos que conducirán, en parte, al proceso reparativo (1). Otras veces, el daño exige una respuesta inflamatoria (2) y/o inmunitaria, en la cual la CE recibe una serie de estímulos que conducen a modificar su respuesta (3).

La CE, por ubicación, posee un borde libre limitando con el tejido sanguíneo y una cara de fijación a una matriz extracelular, manteniendo una determinada polaridad morfológica y funcional que le permite arbitrar los intercambios entre la sangre y los tejidos u órganos. Es una célula altamente receptora y de rápida adaptación, de modo que puede activarse en procesos inflamatorios, inmunes y trombóticos (4).

Las CE son al mismo tiempo receptoras y productoras de citocinas (3, 5, 6). Algunas citocinas, como la IL-1 y el Factor de necrosis tumoral (TNF), estimulan la capacidad proagregante y proinflamatoria de las CE (7, 8). Estas linfocinas estimulan la producción de otras citocinas, como IL-1, IL-6 y las IL-8, que modulan la presencia y emigración de las células blancas a través de la pared vascular (9).

Kishi y cols. (10) demuestran que las plaquetas son capaces de inducir daño endotelial *in vitro*, corroborando los trabajos de *Asada y cols.* (11), quienes

observan que los productos liberados por las plaquetas o trombos pueden inducir efectos a cierta distancia de su lugar de liberación.

Las CE impiden la adhesión de las plaquetas debido a que secretan sustancias antitrombóticas como la prostaciclina (12), la heparina (13) y el óxido nitroso, evitándose de esta forma la adhesión y agregación plaquetaria.

La IL-10, denominada originalmente factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF) (14), fue descubierta como un producto de los linfocitos T helper (subset Th2) que suprimía la producción de Interferón- γ (IFM- γ) por parte de los subsets linfocitarios Th1 (15). Para llegar a conocer el mecanismo de acción de la IL-10, principalmente sobre macrófagos y linfocitos, ha sido fundamental la gran cantidad de estudios *in vitro* realizados por otros autores (16, 17). Estos estudios han permitido conocer, tanto la función inmunosupresora de la IL-10 sobre la producción de citocinas en los subsets Th1 de las células T, como su papel inmunoestimulante de la respuesta proliferativa *in vitro* (18).

Dada la relación existente entre las células blancas y el endotelio, en situaciones de agresión de la pared vascular, el objetivo de este trabajo ha sido mostrar el efecto de la IL-10 sobre células endoteliales en cultivo y si esta citocina modifica el comportamiento del endotelio en situaciones que podrían implicar agregación plaquetaria.

Material y métodos

Cultivo de células endoteliales

Las CE fueron obtenidas de vena de cordón umbilical humano y puestas en cultivo siguiendo los métodos descritos por *Jaffe* (19) con algunas modificaciones. La vena del cordón fue lavada varias veces con MEM (Minimum Essential Media) en condiciones estériles, rellenada con una solución al 0,1% de colagenasa tipo I (Worthington) en MEM e incubada durante 15 min. a 37°C. Se recogió la suspensión celular en un tubo cónico de centrífuga Falcon de 50 ml y se centrifugó a 200 g durante 7 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en 5 ml de MEM y centrifugado bajo las mismas condiciones. Este último paso fue repetido tres veces para eliminar cualquier componente sanguíneo que pudiera haberse liberado durante la digestión enzimá-

tica. Tras la última centrifugación las CE fueron resuspendidas en 5 ml de medio M-199 (Gibco BRL) suplementado con un 20% de suero fetal bovino (Gibco BRL), antibióticos (100.000 IU/ml penicilina/10000 µg/ml streptomicina) (Gibco BRL), 10 mM de Hepes (Gibco BRL), 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL), factor de crecimiento endotelial (20 µg/ml) (ECGF) Sigma y heparina sódica (90 µg/ml) (Roche), y puestas en un frasco de cultivo de 25 cm² (Nunclon), e incubadas a 37°C en una estufa de CO₂ (5% CO₂).

Siembra de células endoteliales

Para la realización de la siembra celular se utilizaron placas de 24 pocillos en los que se introdujeron cubreobjetos de cristal estériles de 1,12 cm de diámetro.

Las CE procedentes del primer subcultivo fueron levantadas del frasco de cultivo por tratamiento con tripsina-EDTA, sembradas sobre dichos cubreobjetos e incubadas a 37°C en estufa de cultivo (5% CO₂). Una vez formada la monocapa sobre la superficie de los cubreobjetos, las células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C en una solución de M-199 completo suplementada con IL-10 (cedido por Schering Plough, Kenilworth, N.J.) a diferentes concentraciones: 1 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml.

Obtención de plasma rico en plaquetas

Sangre procedente de donantes voluntarios fue recogida en una solución de citrato sódico al 3,8% en proporción 1:10 y centrifugada en tubos cónicos a 200g durante 5 minutos. El plasma rico en plaquetas se recogió y se procedió a su conteo en un hemocitómetro automático (Hematology Analyzer System 9000; SERONO DIAGNOSTICS).

Recuento Celular

Los cultivos de CE fueron fijados en formol al 10% para microscopía óptica. La cuantificación del número de células por campo, con un mínimo de 100 campos medidos por muestra, se realizó en un analizador de imagen (Microm).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las muestras obtenidas fueron fijadas en glutaral-

dehido al 3% durante 2 horas y puestas en tampón Millonin (pH 7,3) hasta su procesamiento. Las muestras fueron deshidratadas en series graduales de acetonas, sometidas a punto crítico en un Polaron E-3000 con CO₂, metalizadas en oro-paladio, y estudiadas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss 950 DSM.

Diseño experimental

Se desarrollaron los siguientes grupos de estudio:

- a) *Grupo control* (n=8): CE incubada con M-199 completo;
- b) *Grupos experimentales*: CE incubada con M-199 completo suplementado con concentraciones variables de IL-10:

Grupo 1 (n=8): CE incubada con IL-10 a una concentración de 1 ng/ml

Grupo 2 (n=8): CE incubada con IL-10 a una concentración de 10 ng/ml

Grupo 3 (n=8): CE incubada con IL-10 a una concentración de 25 ng/ml

Grupo 4 (n=8): CE incubada con IL-10 a una concentración de 50 ng/ml

Grupo 5 (n=8): CE incubada con IL-10 a una concentración de 100 ng/ml

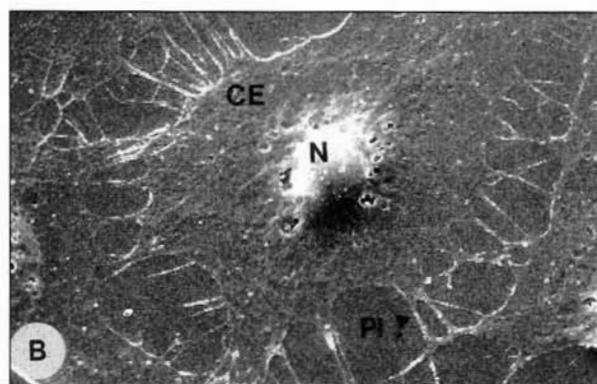
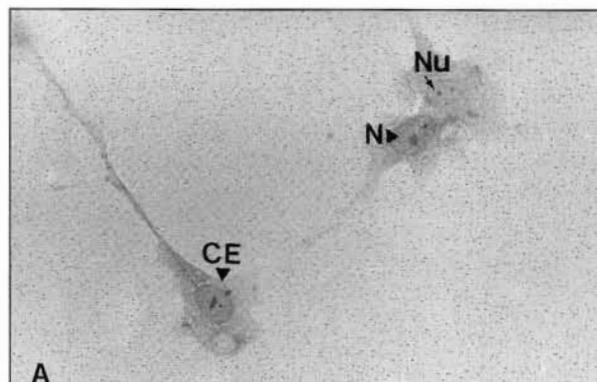
Tras 24 horas de incubación, se añadió 100 µl de PRP a cada uno de los grupos de estudio y se dejó actuar durante 30 minutos. Tras este período de tiempo se lavaron 2 veces los cultivos con PBS y se procedió a su fijación para estudios posteriores.

Los estudios estadísticos de los datos obtenidos se realizaron mediante el test de U de *Man-Whitney*.

Resultados

A microscopía de barrido se observa una disminución de la densidad celular sobre los cubreobjetos al aumentar la concentración de la citocina.

Las CE del grupo control, sin IL-10, presentan una buena adhesión al substrato de cristal, individualizadas, muestran un finísimo soma y tanto el núcleo como los nucleolos son aparentes (Fig. 1A). Cuando las células comienzan a confluir establecen numerosos puentes intercitoplásmicos (Fig. 1B). En este grupo, cuando las CE son expuestas a plaquetas, no se aprecia adhesión



Figs. 1A y 1B. Grupo control: CE firmemente anclada al substrato. Existe gran cantidad de puentes intercitoplásmicos (PI) y tanto el núcleo (N) como los nucleolos (Nu) son perfectamente visibles. En este grupo no hay signos de adhesión plaquetaria. A) Microscopía óptica (40x) B) Microscopía de Barrido (1000X).

ni agregación plaquetaria sobre las mismas, mostrando por tanto una buena función antiagregante in vitro.

En el grupo 2, IL-10 (10 ng/ml) la morfología de la

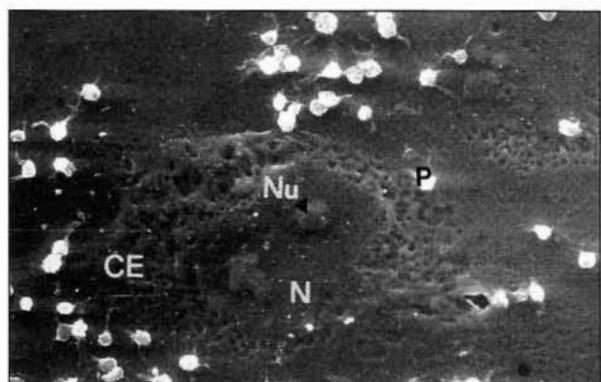


Fig. 2. CE incubadas con IL-10 [10 ng/ml] de morfología similar a los controles, pero con plaquetas firmemente adheridas a los bordes celulares (P). (1000x).

célula endotelial se mantiene, sigue anclada firmemente al substrato, se observan núcleo y nucleolos normales y los puentes intercitoplásmicos están igualmente bien definidos; sin embargo, la adhesión plaquetaria aumenta considerablemente. Se observa cómo las plaquetas, que están activadas, se adhieren a los bordes laterales de la CE (Fig. 2).

A medida que incrementamos la concentración de IL-10 las plaquetas se depositan en los bordes y en largas prolongaciones citoplásmicas, a modo de rosario de cuentas, aumentando progresivamente el número de células que, formando monocapa confluente, presentan todo su citoplasma cubierto por plaquetas. Valorando la adhesión plaquetaria, se observa que al aumentar la concentración de IL-10 se incrementa el número de plaquetas adheridas sobre la superficie celular (Fig. 3).

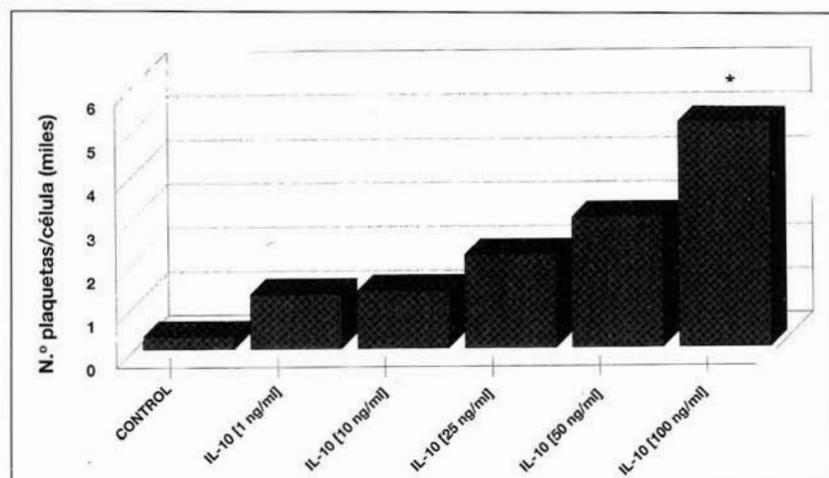
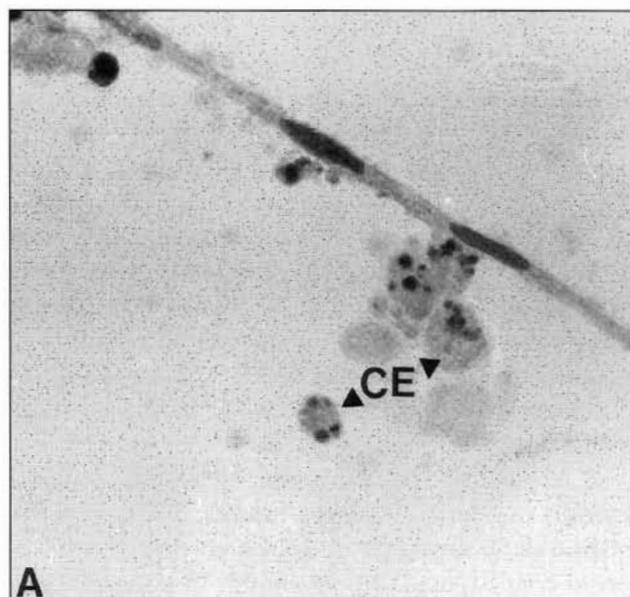


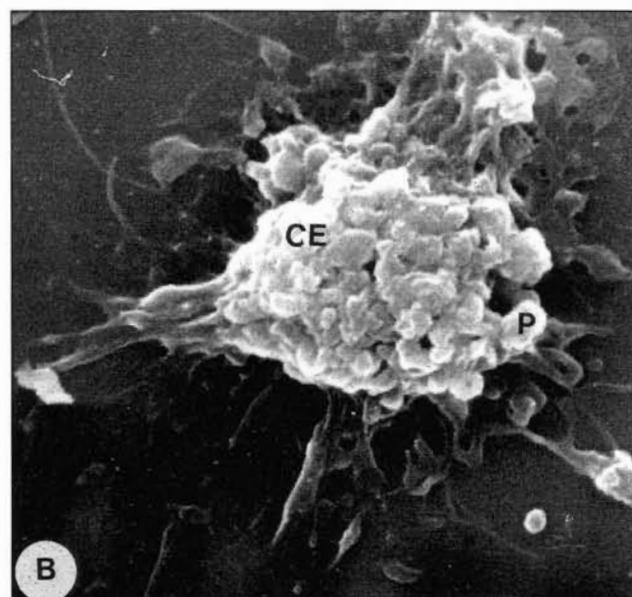
Fig. 3. Gráfica de adhesión plaquetaria, aumenta el número de plaquetas sobre las CE al elevarse la concentración de IL-10, en un cultivo de 24 horas. (*p<0,05).

La IL-10 parece ejercer un cierto efecto tóxico sobre la CE que afecta a su viabilidad, como se observa en el estudio a microscopía electrónica de barrido. Con las mayores concentraciones, grupo 5 (IL 10 100 ng/ml), existen CE degenerativas, con claros signos de muerte celular, extrusión nuclear (Fig. 4A) y cito-

plasma burbujeante (Fig. 4B). En la cuantificación celular (Fig. 5) se comprueba este hecho, siendo significativamente menor el número de células por campo al aumentar la dosis de la citocina estudiada. En este grupo, las plaquetas ya no sólo se sitúan en los bordes sino que ocupan todo el citoplasma celular.



A



B

Figs. 4A y 4B. CE incubada con IL-10 [100 ng/ml].

A) Fragmentación nuclear, evidencia de degeneración celular (Hematoxilina 40x).
 B) CE degenerativa totalmente cubierta por plaquetas (P) (5000x).

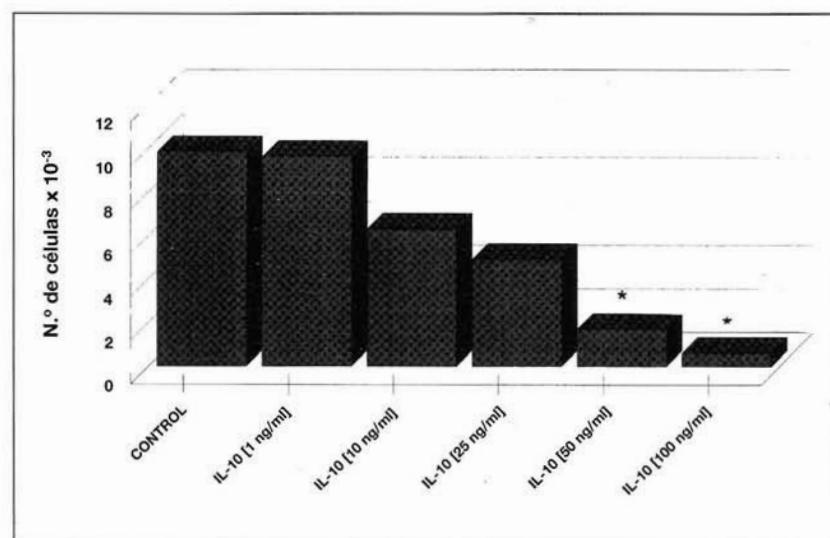


Fig. 5. Gráfica de recuento celular. Se muestra cómo disminuye el número de células por campo al aumentar la concentración de IL-10, en cultivo de 24 horas (*p<0,05).

Discusión

Las CE preincubadas durante 24 horas con IL-10 parecen modificar su morfología y su función antiagregante de forma dosis-dependiente.

La capacidad proinflamatoria de la IL-10 es una de sus propiedades más conocidas sobre CE en presencia de lipopolisacaridasa (LPS) (20). La IL-10 parece inhibir la producción de IL-6 en macrófagos, mientras que estimula su síntesis en CE (21). Estos resultados son superponibles a las acciones de IL-1 y TNF (22) que estimulan la actividad proinflamatoria sobre la superficie celular endotelial, aumentando la expresión de moléculas de adhesión de células blancas. Sironi y cols. (23) estudian la función de la IL-13 sobre las CE, encontrando que dicha citocina induce la expresión de VCAM-1, una molécula de adhesión de granulocitos, a concentraciones comprendidas entre 10 y 50 ng/ml, tras 24 horas de estímulo, y parece tener un espectro de respuestas similar al de la IL-4. Bochner y cols. (25) muestran que tanto la IL-13 como la IL-4, estimulan las CE para que expresen en su superficie VCAM-1, sugiriendo el papel promotor de esta citocina en procesos inflamatorios. La IL-10, en su interacción con el endotelio, participa en la inducción y expresión de respuestas directamente mediadas por los linfocitos Th2 y fagocitos mononucleares. De todo ello parece deducirse que IL-13, IL-4 e IL-10 inducen una activación similar sobre las CE (24).

La IL-10, a altas concentraciones, podría ejercer algún papel inhibidor de la viabilidad celular, dado que el número de células es significativamente menor cuando las CE se incuban con dosis muy elevadas de la citocina, superiores a 50 ng/ml.

En nuestro modelo, la acción de la IL-10 sobre las CE nos lleva a pensar en la existencia de alguna modificación en la superficie de las mismas que, de modo similar a otras citocinas como IL-1 y TNF, induzca cambios en la cantidad de trombomodulina y favorezca la adhesión de las plaquetas. Las concentraciones de esta citocina para activar la CE se mueven en rangos de 10 a 100 ng/ml, siendo importante el tiempo de incubación necesario para obtener un máximo estímulo de la célula (21), si bien no se han descrito previamente correlaciones entre actividad procoagulante y adhesión plaquetaria. Existe relación positiva entre concentraciones de IL-10 y lugar

somático de depósito plaquetar. Todo ello se podría justificar a través de una activación o modificación de los receptores plaquetarios, lo que permitiría la adhesión de las mismas a la membrana endotelial de modo secuencial. Las CE, en condiciones basales y sin estímulo de IL-10, no permiten la adhesión plaquetaria, mientras que al incrementarse la concentración de la citocina parece existir un estímulo selectivo y ordenado de receptores de adhesión para plaquetas. La adhesión comienza en los bordes de expansión celular, con imágenes curiosas como en las que se observa depósito de plaquetas, a modo de rosario de cuentas, delimitando a las CE. A medida que la concentración de la citocina aumenta, se observa un incremento del depósito plaquetar sobre todo el citoplasma celular. Teniendo en cuenta que el período de incubación de 24 h parece estimular moderadamente a la CE, al menos en cuanto a la producción de otras citocinas (21), la adhesión de las plaquetas parece ocurrir de modo centrípeto y de forma dosis-dependiente.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que la IL-10 parece modificar el comportamiento de la superficie de las CE en cultivo con respecto a su capacidad para inhibir la adhesión plaquetaria, favoreciendo el depósito de plaquetas sobre la superficie celular de modo selectivo y de forma dosis-dependiente.

Por otro lado, altas concentraciones de IL-10 parecen inducir degeneración y muerte en las CE.

BIBLIOGRAFIA

1. RUGGERI, Z. M.; WARE, J.: Von Willebrand factor. *Faseb J.*, 1993; 7:308-316.
2. MARCUS, A. J.: Thrombosis and inflammation as multicellular processes: pathophysiologic significance of transcellular metabolism. *Blood*, 1990; 76:1903-1907.
3. POBER, J. S.; COTRAN, R. S.: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.*, 1990; 70(2):427-451.
4. MANTOVANI, A.; BUSSOLINO, F.; DEJANA, E.: Cyto-

kine regulation of endothelial cell function. *Faseb J.*, 1992; 6:2591-2599.

5. MANTOVANI, A.; DEJANA, E.: Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol. Today*, 1989; 10:370-375.
6. LIBBY, P.; HANSON, G. K.: Biology of disease. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab. Invest.*, 1991; 64:5-15.
7. BEVILACQUA, M. P.; POBER, J. S.; MAJEU, G. R.; COTRAN, R. S.; GIMBRONE, M. A.: Interleukin 1 induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1986; 77:2027-2033.
8. DEJANA, E.; CAZENAVA, J. P.; GRAVES, H. M.; KINLOUGH-RATHBONE, R. L.; RICHARDSON, M.; PACKHAM, M. A.; MUSTARD, J. F.: The effect of aspirin inhibititon of prostacyclin production on platelet adherence to demaged and normal aorta. *Thromb. Res.*, 1980; 17:453-64.
9. DAVIES, M. G.; HAGEN, P.: The vascular endothelium: A new horizon. *Ann. Surg.*, 1993; 218(5): 593-609.
10. KISHI, Y.; NUMANO, F.: In vitro study of vascular endothelial injury by activated platelets and its prevention. *Atherosclerosis*, 1989; 79:95-101.
11. ASADA, Y.; HAYASHI, T.; SUMIYOSHI, A.: Vascular injuries induced by material released from platelet-rich thrombus in vivo. *Atherosclerosis*, 1988; 70 (1-2):1-6.
12. MONCADA, S.; VANE, J. R.: Pharmacological and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides thromboxane A2 and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.*, 1979; 30:293-331.
13. ROSS, R.: The pathogenesis of atherosclerosis. Update. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 314(18):488-500.
14. MOSSMANN, T. R.; MOORE, K. W.: The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. In: *immnoparasitology Today*. C. Ash and RB Gallagher, editors. Elsevier Trends Journals, Cambridge, UK, 1991:A 49-53.
15. FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSSMANN, T. R.: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 1989; 170:2081-2095.
16. DE WALL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DE VRIES, J. E.: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 1991; 174:1209-1220.
17. GO, N.; CASTLE, B. E.; BARRETT, R.; KASTELEIN, R.; DANG, W.; MOSSMANN, T. R.; MOORE, K. W.; HOWARD, M.: Interleukin 10 (IL-10), a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.*, 1990; 172:1625-1631.
18. HOWARD, M.; O'GARRA, A.: Biological properties of Interleukin 10. *Immunology Today*, 1992; 13(6): 198-200.
19. JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.; BECKER, C. G.; MINICK, C. R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, 1973; 52:2745-2756.
20. BEAUX, A. C.; ROSS, J. A.; FEARON, K. C. H.; CARTER, D. C.: Regulatory effect of interleukins 4 and 10 on cytokine production from human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Surg.*, 1994; 81: 1799-1880.
21. SIRONI, M.; MUÑOZ, C.; POLLICINO, T.; SIBONI, A.; SCIACCA, F. L.; BERNASCONI, S.; VECCHI, A.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A.: Divergent effects of interleukin-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 1993; 23:2692-2695.
22. CAVAILLON, J. M.: Le monde des cytokines. In: *Les Cytokines*. 1st ed. Masson, Paris, 1993:1-11.
23. SIRONI, M.; SCIACCA, F. L.; MATTEUCCI, C.; CONNI, M.; VECCHI, A.; BERNASCONI, S.; MINTY, A.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A.: Re-

gulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: Selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification on interleukin-6 production. *Blood*, 1994; 84(6): 1913-1921.

24. BOCHNER, B. S.; KLUNK, D. A.; STERBINSKY, S. A.; COFFMAN, R. L.; SCHLEIMER, R. P.: IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J. Immunol.*, 1995; 154:799-803.