

## Modulación del control del ciclo celular inducido por IL-10 en HUVEC en cultivo

### In vitro modulation of the HUVEC cell cycle by IL-10

M. J. Gimeno - A. Prieto\* - G. Pascual - J. M. Bellón - M. Alvarez-Mon\*\* - J. Buján

Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía  
Departamento de Medicina  
Facultad de Medicina  
Universidad de Alcalá de Henares  
Servicio de Inmunología clínica y Oncología  
Hospital Universitario Príncipe de Asturias  
Madrid (España)

#### RESUMEN

Ha sido atribuido un nuevo papel para la Interleucina (IL)-10 como factor de crecimiento para células no hematopoyéticas, tales como las células mesangiales. El objetivo del presente trabajo es conocer si la IL-10 ejerce similar efecto sobre la célula endotelial (CE).

CE procedentes de vena umbilical humana (HUVEC), en segundo subcultivo, fueron utilizadas para conocer los efectos de la IL-10, a varias concentraciones (10 y 100 ng/ml) en cultivo de 24 y 48 horas. Se realizaron estimaciones de ciclo celular por citometría de flujo, y se realizaron análisis de anti-PCNA, Tunel y morfología de los cultivos celulares.

La presencia de IL-10 a baja concentración no mostró cambios significativos en los parámetros estudiados. Por el contrario, la máxima concentración de IL-10 estudiada indujo un aumento de células positivas para la técnica de Tunel y una disminución de células proliferantes, marcada por el porcentaje de células en fase de síntesis (S) y mitosis (M). Todos esos parámetros se recuperaron tras 24 h. en medio basal.

Por ello, podemos concluir afirmando que la IL-10 a altas concentraciones (100 ng/ml) ejerce un papel inhibidor de la proliferación de CE en cultivo.

**Palabras clave:** Interlucina 10; célula endotelial; proliferación; apoptosis.

#### SUMMARY

A new role has been attributed to IL-10 as a growth factor for non-hematopoietic cells, such as mesangial cells. The purpose of this study is to ascertain whether IL-10 exerts a similar effect on endothelial cells (EC).

EC from the umbilical vein (HUVEC) in a second culture were used to study the effects of IL-10 at different concentrations (10 and 100 ng/ml), in a 24 culture and in a 48 hour culture. Estimations of the cellular cycle by FACS, anti-PCNA analysis and Tunnel and morphological analysis were performed.

Low concentrations of IL-10 did not show significant changes in the parameters studied. On the contrary, the maximum concentration of IL-10, led to an increase of positive cells in the Tunnel technique and a decrease of proliferating cells, marked by the percentage of cells at the synthesis phase (S) and mitosis (M). All the previously mentioned parameters were conducted after 24 hours in a basal medium.

Based on the above, it can be concluded that IL-10 at high concentrations (100 ng/ml) plays an inhibiting role in the proliferation of EC in a culture.

**Key words:** Interleucine 10, endothelial cell, proliferation, apoptosis.

#### Introducción

Las CE participan en la regulación de la respuesta a la lesión, modificando su estado funcional frente a alteraciones de permeabilidad, hemostasia e inflamación

\* Departamento de Medicina.

\*\* Servicio de Inmunología clínica y Oncología.

inducido por mediadores solubles, las citocinas (1). Como un mismo receptor de citocinas puede ser expresado sobre diferentes tipos celulares, el efecto biológico producido variará en función del linaje celular estimulado, pudiendo modular de distinta forma la actividad biológica de una célula, fundamentalmente procesos de proliferación, diferenciación o activación (2, 3), cuyo control es crítico en los estadios de crecimiento de un organismo o de un cultivo.

El estudio de los efectos de las citocinas sobre las CE es relevante por la capacidad de estas moléculas para activar al endotelio. En este trabajo se muestra cómo una citocina, la IL-10, es capaz de modificar alguna de las propiedades de estas las CE, proliferación y viabilidad.

La IL-10 es una citocina pleiotrópica implicada tanto en la regulación de la función linfocitaria y de células mieloides (4) como en la regulación de la función del endotelio vascular (5). Además, tiene capacidad para bloquear la síntesis de citocinas y de algunas funciones celulares accesorias de los macrófagos, dando a esta citocina un papel inhibidor de la respuesta macrofágica (6, 7). Más aún, recientemente, se ha mostrado que la IL-10 puede comportarse como un factor de crecimiento para las células mesangiales (8).

En este artículo nos hemos propuesto examinar si esta citocina, la IL-10, podría ejercer similar efecto proliferativo sobre la estirpe endotelial, y si los efectos obtenidos son permanentes o pueden ser revertidos.

## Material y métodos

### Cultivo de células endoteliales

Las CE fueron obtenidas de vena de cordón umbilical humano por digestión (15 min a 37°C) con colagenasa tipo I al 0,1% (Worthington) siguiendo métodos previamente descritos (9).

Para los estudios inmunocitoquímicos, CE procedentes del segundo subcultivo fueron levantadas del frasco de cultivo por tratamiento con tripsina-EDTA y sembradas sobre cubreobjetos de cristal estériles de 1,12 cm de diámetro, dentro de placas de 24 pocillos. Una vez formada la monocapa endotelial, las células fueron incubadas durante 24 y 48 horas a 37°C en una solución de M-199 completo, con o sin suplemento exógeno de IL-10 (cedido por Schering Plough, Kenilworth, N. J.) a diferentes concentraciones (10 ng/ml y 100 ng/ml).

### Diseño experimental

Se realizaron los siguientes grupos de estudio:

*Grupo I* (n=5): CE incubadas durante 24 h en presencia o ausencia de IL-10.

*Grupo II* (n=5): CE incubadas durante 48 h en presencia o ausencia de IL-10.

*Grupo III* (n=5): CE incubadas durante 24 h con o sin IL-10. Después de este tiempo, se procede a la retirada de la citocina y se mantienen durante otras 24 h más en M-199 completo.

### Citometría de flujo

Se recogió el sobrenadante de los cultivos y se lavaron con HBSS 1x. Para obtener la fracción celular se trataron con Tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C en una estufa de cultivo (5% CO<sub>2</sub>) y se recogieron las células en 5 ml de M-199 conteniendo un 20% de suero fetal bovino. El pellet obtenido se incubó con 500 µl de solución de apoptosis, conteniendo 1% de citrato sódico (Merck), 0,1% Tritón X-100 (Sigma), (5 µg/ml) Ioduro de propidio durante 3-4 h a 4°C. La adquisición y el análisis de las muestras para immunofluorescencia se realizó con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Sunnyvale, C. A.), utilizando el software Lys II (Becton Dickinson). Se analizó el contenido en DNA en función de la intensidad de fluorescencia, relacionando así las distintas fases del ciclo celular (G<sub>0</sub> + G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> + M).

### Ensayo de PCNA y Tunel

La detección de la fracción celular apoptótica fue desarrollada siguiendo una modificación de la técnica de Tunel (10) y la visualización de la fracción proliferante se realizó mediante la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

Se lavaron las muestras en HBSS 1x, se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS pH 7,4 y se irradiaron con microondas (SANYO EM-704T) durante 5 minutos (350W) en tampón citrato 0,01M (pH 6). Tras la inactivación de la actividad peroxidasa endógena (3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol) y el bloqueo de sitios inespecíficos (suero de caballo), se realizaron dos técnicas:

#### a) Detección «in situ» de células apoptóticas

La técnica de Tunel se basa en la detección *in situ* del ADN fragmentado característico de la apoptosis, por

adicción específica de nucleótidos marcados a los extremos 3'-OH de la cromatina fragmentada mediada por una enzima, la transferasa terminal (TdT). La detección del ADN fragmentado se realizó utilizando un kit (Calbiochem, CN Biosciences Inc., USA). En este caso se utilizó como colorante verde de metilo.

El control negativo de la técnica se realizó siguiendo la misma metodología, si bien en estas muestras se añadía agua destilada en lugar de la enzima TdT.

#### b) Inmunocitoquímica

Para determinar la fracción proliferante se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PCNA (Sigma) diluido 1:2000 y se dejó actuar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. El segundo anticuerpo fue antiratón biotinado (Sigma) diluido 1:20 en PBS ph=7,4 (30 minutos a temperatura ambiente), seguido de un complejo avidina-peroxidasa (Sigma) diluido 1:20 durante 30 minutos a temperatura ambiente. El cromógeno utilizado fue AEC (3-amino-9-etilcarbazol). Los cultivos se contrastaron con hematoxilina de Carazzi.

El control negativo se realizó según los métodos descritos, sustituyendo el primer anticuerpo por PBS pH=7,4.

#### Recuento celular

Se realizaron contajes de no menos de 2.000 células por muestra utilizando un microscopio óptico Zeiss Axiophot (Zeiss, Jena, Germany), valorando el número de células apoptóticas, células positivas para PCNA y figuras mitóticas. Las fotografías se realizaron utilizando una película Kodak Ektachrome 160T.

#### Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando como test estadístico la U de Man-Whitney.

## Resultados

Las CE incubadas con un suplemento exógeno de IL-10 modifican su patrón de proliferación y muerte. IL-10 (10 ng/ml) induce, tras 24 h de cultivo, un comportamiento similar al control en todos los parámetros estudiados. Por el contrario, IL-10 (100 ng/ml) aumenta el número de células apoptóticas y disminuye la población proliferante. Estos efectos se incrementan cuando las CE son estimuladas durante 48 horas. Sin embargo, tras la eliminación de la citocina se observa una recuperación hacia valores basales. El efecto observado es de un retraso de 24 horas en el ciclo celular producido por el estímulo de IL-10.

#### Ciclo celular

Tras 24 y 48 horas de incubación, tanto las CE del grupo control como las CE incubadas con IL-10 (10 ng/ml), evolucionan según un mismo patrón (grupos I y II). CE de ambos grupos incubadas con IL-10 (100 ng/ml) muestran una disminución de la población celular en la fase S (Tabla I). Cuando a estas células, que han sido estimuladas durante 24 horas con IL-10, se les retira el medio y se incuban 24 h más sin suplemento de citocina, en todos los grupos, salvo en el control, se observa un mayor porcentaje de células en fase S, lo que podría indicar un incremento en el estado proliferativo celular tras el estímulo de IL-10.

#### Apoptosis

La proporción de células apoptóticas (Fig. 1) en los cultivos de CE en ausencia de citocina, no muestran alteraciones a lo largo del estudio en ninguno de los grupos, manteniéndose en valores cercanos al 3 por mil (Fig. 2 A). Cuando se añade al medio IL-10 (10 ng/ml), las células de los grupos I y III no muestran diferencias

#### Evolución del ciclo celular en los distintos grupos de estudio determinada por citometría de flujo ( $p<0,05$ )

	Grupo I (%)			Grupo II (%)			Grupo III (%)		
	G0 + G1	Síntesis	G2 + M	G0 + G1	Síntesis	G2 + M	G0 + G1	Síntesis	G2 + M
Control	73,19 ± 5,36	14,00 ± 3,21	12,74 ± 2,58	79,59 ± 4,65	9,14 ± 1,25	11,27 ± 2,31	76,82 ± 3,41	8,82 ± 2,31	14,36 ± 1,78
IL10 (10 ng/ml)	73,32 ± 6,04	14,15 ± 2,87	12,50 ± 3,06	77,83 ± 5,42	10,45 ± 1,47	11,72 ± 1,56	76,53 ± 2,92	11,34 ± 3,05	13,11 ± 1,23
IL10 (100 ng/ml)	72,02 ± 5,83	11,93 ± 2,58	15,27 ± 3,32	78,95 ± 3,47	8,32 ± 1,13	12,73 ± 1,63	71,15 ± 2,63	11,53 ± 2,26	17,32 ± 2,11

Tabla I

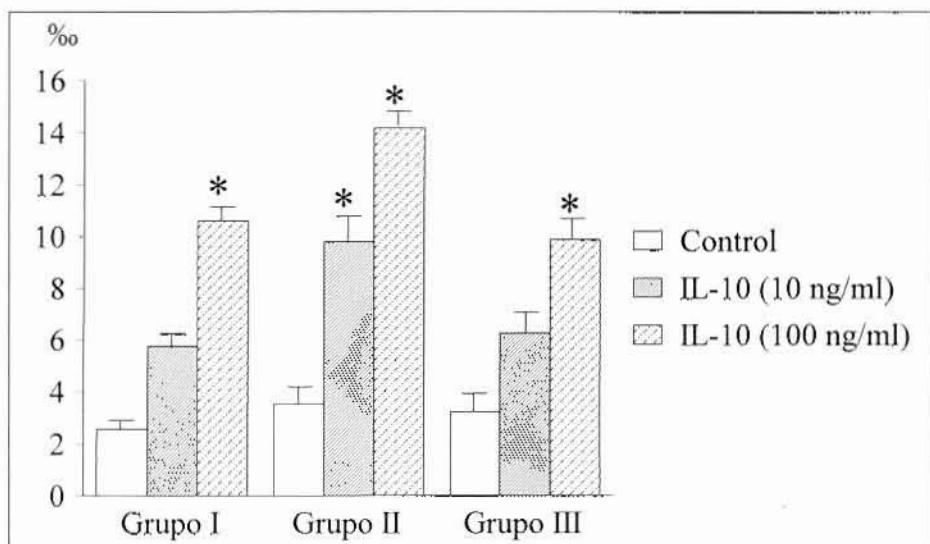
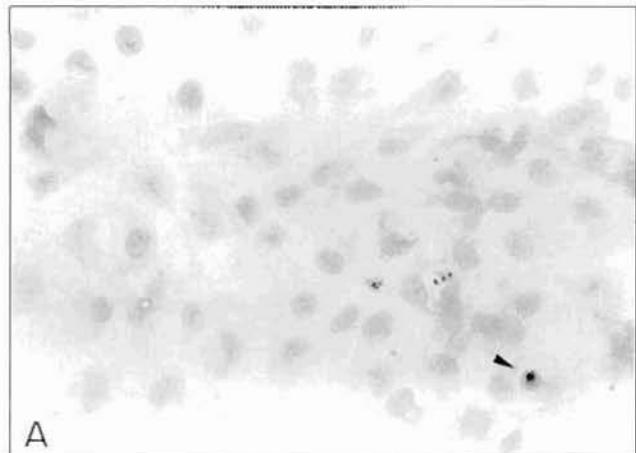
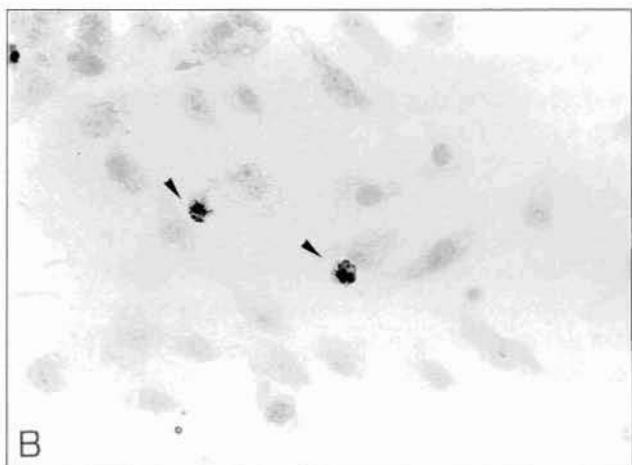


Fig. 1.: Tanto por mil de células apoptóticas frente a células normales. Las CE incubadas en presencia de IL-10 (10 ng/ml en el grupo II y 100 ng/ml en los grupos I, II y III) presentan un número significativamente mayor de células apoptóticas frente al grupo control. (\* p<0,05).

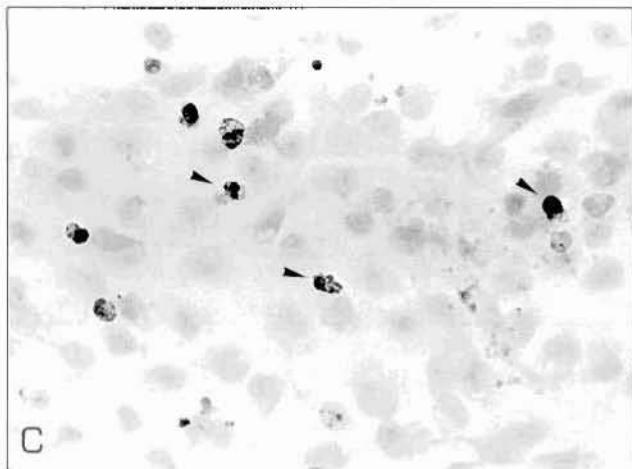
significativas con respecto a las CE de ambos grupos incubadas en ausencia de la citocina (Fig. 2B). La adición de IL-10 (100 ng/ml) al medio de cultivo en las CE del grupo I induce un aumento de la población apoptótica (Fig. 2C). Tras la eliminación de la citocina del medio, el porcentaje de células positivas para la técnica de Tunel disminuye a valores próximos al grupo de CE incubadas con IL-10 (10 ng/ml).



A



B



C

Fig. 2.: CE incubadas en ausencia de suplemento exógeno de IL-10 (A) o con IL-10 (10 ng/ml) (B) muestran pocas células positivas para la técnica del Tunel (flechas). Cuando las CE se incuban con IL-10 (100 ng/ml) (C) se observa un aumento del número de células apoptóticas (20 x).

### Proliferación

Las CE en cultivo muestran un alto índice de proliferación. La adición de altas concentraciones de IL-10 al medio de cultivo induce una disminución del índice proliferativo ( $73,2 \pm 4,27$ ) frente a CE incubadas sin la citocina ( $114,1 \pm 6,23$ ) en el grupo I. El mantenimiento del estímulo durante 48 horas (grupo II), no induce modificaciones en el número de células positivas para PCNA. Sin embargo, la eliminación del estímulo del medio induce una respuesta claramente proliferativa en las CE incubadas en presencia de la citocina estudiada (Fig. 3).

Las CE incubadas sin suplemento exógeno de IL-10, muestran un estado proliferativo mayor en el grupo I que en el grupo III (Fig. 4A). Sin embargo, CE incubadas en presencia de IL-10 (10 o 100 ng/ml) modifican su patrón de proliferación (Figs. 4B y 4C), siendo menor a corto plazo y elevándose en el grupo III, tras 24 h en medio normal sin suplemento exógeno de IL-10. Este aumento de la proporción de células proliferativas en los cultivos del grupo III incubados en presencia de IL-10 podría correlacionarse con la disminución del número de células apoptóticas encontradas en el mismo grupo.

### Índice mitótico

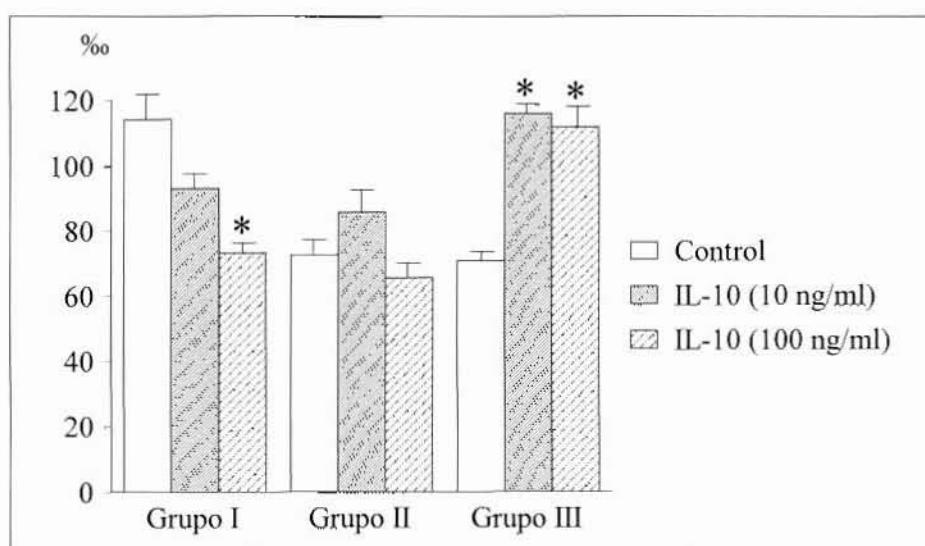
La fase G2 + M estudiada con la citometría de flujo,

se complementa con la valoración del índice mitótico que cuantifica, únicamente, células en fase M (Fig. 5). La adición de IL-10 (100 ng/ml) a las CE del grupo I induce una disminución ( $3,62 \pm 0,56$ ) en el número de figuras mitóticas observadas. Sin embargo, estas células son capaces de recuperarse cuando se retira del medio el estímulo, hasta valores similares al control.

### Discusión

Recientemente (8), se ha demostrado que la IL-10 ejerce un efecto proliferativo sobre cultivo de células mesangiales, observándose un efecto máximo a concentraciones de 100 ng/ml; sin embargo, este efecto no sólo no es corroborado en nuestro caso, sino que es claramente opuesto. Así, hemos observado que la IL-10 utilizada a la misma concentración, ejerce un efecto antiproliferativo sobre la estirpe endotelial.

La mayoría de los trabajos (11, 13) muestran un papel protector de la IL-10 sobre las CE en cuanto a prevención del daño celular. La IL-10 modularía o contrarrestaría el efecto negativo inducido por otras citocinas, tales como TNF $\alpha$  o TGF $\beta$ -(14, 15), siendo capaz de regular la síntesis de TGF $\beta$ -y mejorar situaciones de endotoxemia celular cuando la IL-10 está presente (16). Sin embargo, estos autores sólo hacen referencia a células dañadas, sin encontrar efecto de esta citocina sobre la



**Fig. 3.**: Tanto por mil de células positivas para PCNA. Se observa un aumento de la capacidad proliferativa del cultivo cuando se elimina del medio la IL-10 (Grupo III). \*(p<0,05).

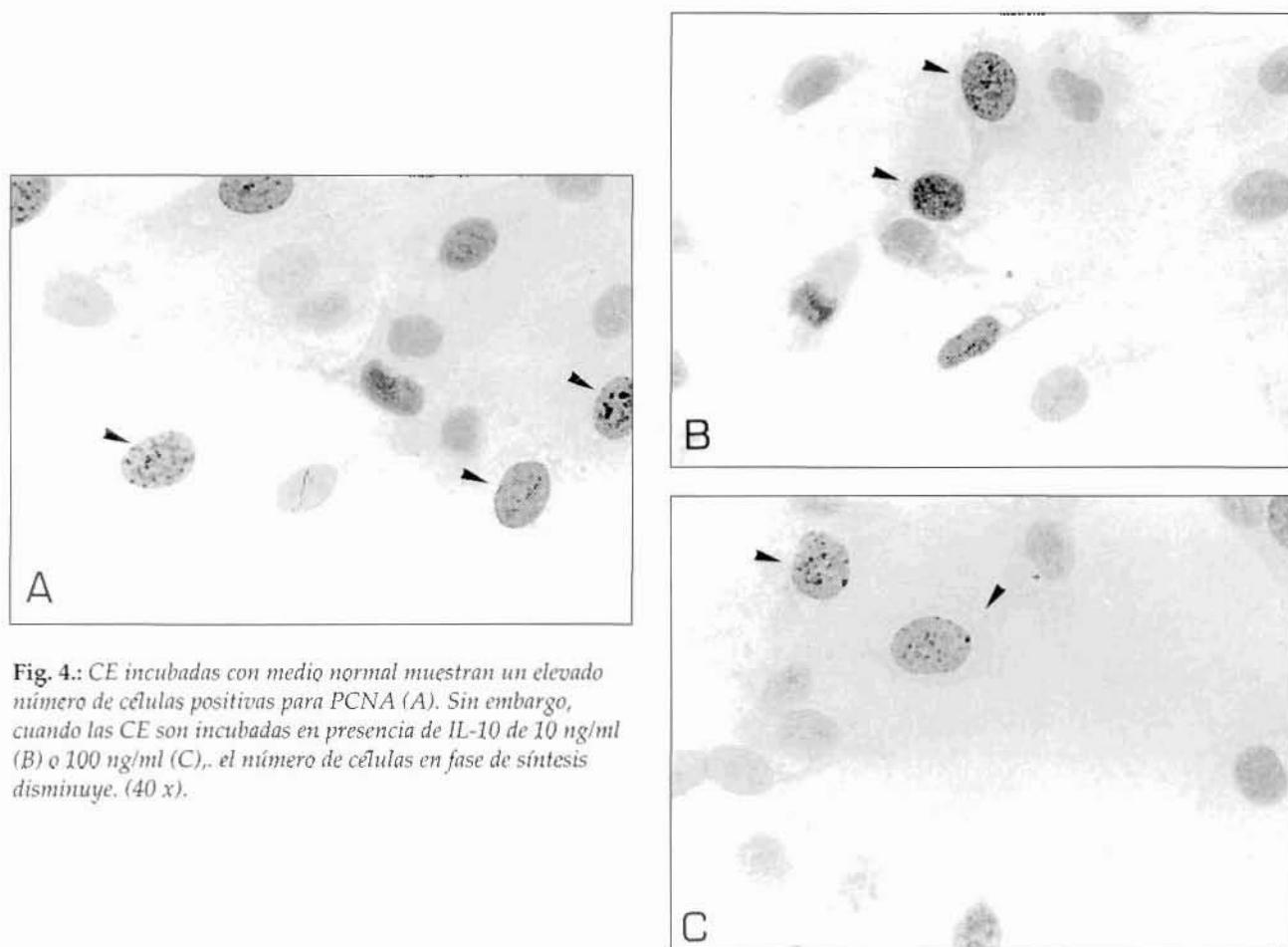


Fig. 4.: CE incubadas con medio normal muestran un elevado número de células positivas para PCNA (A). Sin embargo, cuando las CE son incubadas en presencia de IL-10 de 10 ng/ml (B) o 100 ng/ml (C), el número de células en fase de síntesis disminuye. (40 x).

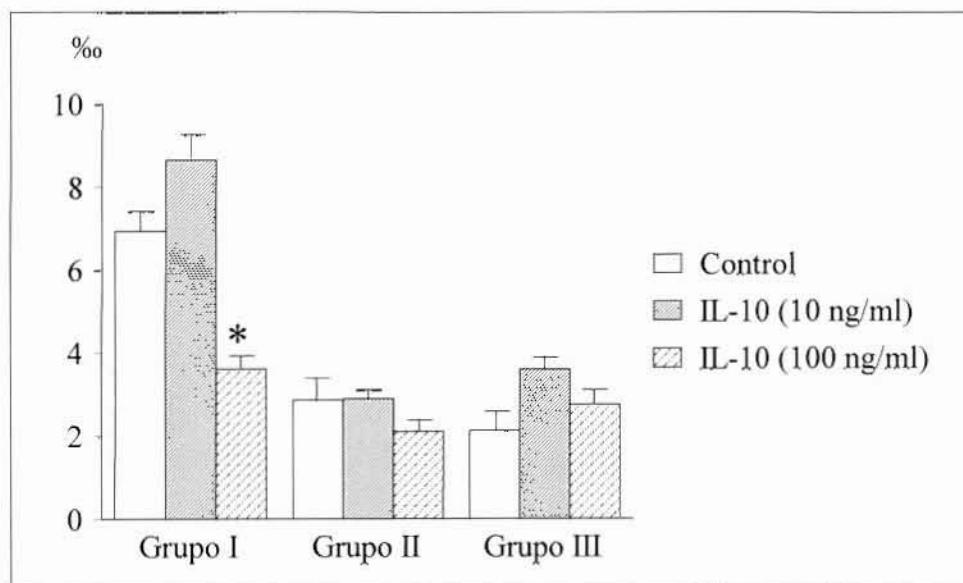


Fig. 5.: Cuando las CE se incuban durante 24 horas (Grupo I) con IL-10 de 100 ng/ml se observa una disminución del número de mitosis frente al resto de las células del mismo grupo. \*(p<0,05).

CE normal y valorando únicamente la distribución de la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular de tipo I) sobre la membrana celular.

En este estudio, mostramos que la CE es sensible a los niveles de IL-10. Altas dosis de esta citocina ejercen un claro efecto antiproliferativo, que podría correlacionarse con un paso hacia la diferenciación celular que culmina con la muerte celular programada.

A bajas concentraciones (10 ng/ml), la IL-10 no parece ejercer efecto alguno ni sobre la evolución del ciclo celular ni sobre el balance proliferación/muerte de esta estirpe celular. Sin embargo, el incremento de la dosis de IL-10 a niveles de 100 ng/ml provoca disfunciones en la regulación de la CE; así se observa una disminución en el índice proliferativo, además de un incremento en el número de células apoptóticas. Este perfil se ajusta a la existencia de un umbral de IL-10, a partir del cual se ejerce un efecto tóxico sobre la CE. Estos hallazgos se correlacionan, además, con nuestras observaciones previas (5), donde mostrábamos una disminución del número total de células, acompañada de un aumento de la capacidad trombogénica.

Para valorar el grado de toxicidad inducida por IL-10, una vez estimuladas las CE, fueron incubadas 24 horas más en ausencia de la citocina estudiada, observando la reversibilidad del proceso, medida por una disminución significativa del índice de apoptosis, así como por una recuperación tardía del índice proliferativo en los cultivos previamente estimulados con IL-10. Si esta citocina es capaz de retrasar la evolución del ciclo celular al mismo tiempo que induce cambios morfológicos y funcionales característicos de la apoptosis, es difícil comprender su efecto protector del mismo fenómeno frente a sustancias citotóxicas, pero no resultaría extraño un efecto paradójico en ausencia de otros estímulos más potentes. Por el contrario, la propia desregulación provocada por la IL-10 produciría una alteración de los mecanismos inducidos por otras citocinas y, como resultado, se ejercería una regulación positiva sobre el ciclo celular.

Estos nos llevaría a plantearnos qué ocurriría en situaciones patológicas donde la IL-10 tiene un potencial papel protector sobre las células dañadas, si esta misma citocina está dañando a las células sanas. Sin embargo, la capacidad de recuperación mostrada por estas células tras eliminar la citocina del medio, garantizará la regeneración de la monocapa endotelial.

## BIBLIOGRAFIA

- POBER, J. S.; COTRAN, R. S.: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.*, 1990; 70:427-451.
- FAIRBAIRN, L. J.; COWLING, G. J.; REIPERT, B. M.; DEXTER, T. M.: Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell.*, 1993; 74:823-832.
- REED, J. C.: Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.*, 1994; 124:1-6.
- MOORE, K. W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T. R.: INTERLEUKIN 10. *Ann. Rev. Immunol.*, 1993; 11:165-90.
- BUJAN, J.; BELLON, J. M.; GIMENO, M. J.; G.-HONDUVILLA, N.; PAREJA, J. A.; ALVAREZ MON, M.: Altas concentraciones de IL-10 inducen daño sobre el endotelio vascular. *Angiología*, 1996; 6:257-264.
- SIRONI, M.; MUÑOZ, C.; POLLICINO, T.; SIBONI, A.; SCIACCA, F. L.; BERNASCONI, S.; VECCHI, A.; COLLOTA, F.; MANTOVANI, A.: Divergent effects of interleukin-10 on cytokine production by mononuclear phagocytes and endothelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 1993; 23:2692-2695.
- DE WAAL MALEFYT, R.; ARAMS, 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.
- CHADBAN, S. J.; TESCH, G. H.; FOTI, R.; ATKINS, R. C.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.: Interleukin 10 is a mesangial cell growth factor in vitro and in vivo. *Lab. Invest.*, 1997; 76:619-627.
- 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; 52:2774-2756.
- NEGOESCU, A.; LORIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F.; DROUET, C.; ROBERT, C.; GUILLERMET, C.; BRAMBILLA, C.; BRAMBILLA, E.: In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: Improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.*, 1996; 44:959-968.
- EISSNER, G.; KOHLHUBER, F.; GRELL, M.; UEFFING, M.; SCHEURICH, P.; HIECKE, A.; MULTHOFF, G.; BORNKAMM, G. W.; HOLLER, E.: Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-a

- endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood*, 1995; 86:4184-4193.
- 12. VORA, M.; YSEL, H.; DE VRIES, J. E.; KARASEK, M. A.: Antigen presentation by human dermal microvascular endothelial cells. Immunoregulatory effect of IFN gamma and IL-10. *J. Immunol.*, 1994; 152:5734-5741.
  - 13. EISSNER, G.; LINDNER, H.; BERHENDS, U.; KOLCH, W.; HIECKE, A.; KLAUKE, I.; BORNKAMM, G. W.; HOLLER, E.: Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: Protective role of IL-10. *Transplantation*, 1996; 62:819-827.
  - 14. LINDNER, H.; HOLLER, E.; ERTL, B.; MULTHOFF, G.; SCHREGLMANN, M.; KLAUKE, I.; SCHULTZ-HECTOR, S.; EISSNER, G.: Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair: Role of cytokines. *Blood*, 1997; 6:1931-1938.
  - 15. HEIMARK, R. L.; TWARDZIK, D. R.; SCHWARTZ, S. M.: Inhibition of endothelial regeneration by type beta transforming growth factor from platelets. *Science*, 1986; 233:1078-1080.
  - 16. GERARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A.; ABRAMOVICZ, D.; VANDENABEELE, P.; DELVAUX, A.; FIERS, W.; GOLDMAN, M.; VELU, T.: Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.*, 1993; 177:547-550.