

RESUMEN

La formación de nuevas estructuras vasculares depende, principalmente, de la proliferación y migración de células endoteliales dentro de la matriz extracelular. Este fenómeno, conocido como angiogénesis, es el principal inductor de la progresión tumoral. Así, el bloqueo de los procesos que conducen a la génesis de nuevos vasos sería útil para controlar el crecimiento y la diseminación de tumores. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la acción de tres citocinas (IL-4, IL-10 e IFN γ) en el proceso de neoangiogénesis en dos modelos experimentales *in vitro*, uno sobre cristal y otro sobre una matriz tridimensional. Células endoteliales de vena de cordón umbilical fueron cultivadas en presencia o ausencia (controles) de las citocinas sobre los dos sustratos. Los cultivos fueron evaluados morfológicamente y, se analizó su ciclo celular y la expresión de PECAM-1. Los resultados mostraron que las citocinas IL-4 e IFN γ modifican el ciclo celular endotelial, mientras que la IL-10 no lo afecta. Por otro lado, y sobre la matriz tridimensional, se observó la formación de cordones celulares simulando neovasos en presencia de IL-4 y, de forma contraria, el IFN γ afectó a la forma celular, disminuyendo la expresión de PECAM-1 a nivel de los contactos intercelulares y evitando así, la formación de estructuras tubulares. No hubo variaciones en presencia de IL-10. En conclusión, la acción de las citocinas depende mucho del microambiente en que actúen, y no podemos deducir su acción *in vivo* con diseños experimentales que no contemplen variables de forma conjunta, matriz extracelular y factores solubles.

Palabras clave: angiogénesis, célula endotelial, IL-4, PECAM-1.

Papel de las citocinas en la angiogénesis
Gimeno M^a J, Bellón J M, Bujan J
Investigación Cardiovascular, 2005; 8: 100-111

SUMMARY

The formation of new vascular structures depends mainly on the proliferation and migration of endothelial cells to the center of the extracellular matrix. This phenomenon, known as angiogenesis, plays a fundamental role in disease processes such as tumour progression. Thus, the inhibition of events leading to the genesis of new vessels would be of great use in controlling the growth and dissemination of tumours. The aim of this study was to evaluate the role of IL-4, IL-10 and IFN γ in the angiogenic process in an *in vitro* 3D matrix model. Endothelial cells from vein human umbilical cord vein were cultured in the presence or absence (controls) of each of these cytokines on matrigel®. Cultures were subjected to morphological evaluation, cell cycle and PECAM-1 expression analysis. It was observed cell cycle modifications when cells grown in the presence of IL-4 or IFN γ . IL-4 induced the appearance of cellular colonies and tubular structures resembling neovessels, while IFN γ modified the endothelial cell shape and IL-10 had no effects on cultures.

Key words: angiogenesis, endothelial cells, IL-4, PECAM-1.

Role of cytokines in angiogenesis
Gimeno M^a J, Bellón J M, Bujan J
Investigación Cardiovascular, 2005; 8: 100-111

Correspondencia / correspondence:

Prof. Dra. J Bujan
Dpto. Especialidades Médicas
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá.
Campus Universitario. Ctra N-II km 33.600
28871 Alcalá de Henares, Madrid.
Tel.: 34 91 885 45 40
Fax: 34 91 885 48 85
E-mail: mjulia.bujan@uah.es

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es un fenómeno normal asociado a procesos de desarrollo y reparación. Sin embargo, en algunos estados patológicos este proceso se altera y nos encontramos con situaciones anómalas de densidad vascular disminuída o aumentada [1]. Estos últimos son procesos asociados con la aparición de enfermedades tales como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y el desarrollo de tumores [2].

La génesis de nuevos vasos comprende varias etapas: degradación de la matriz extracelular por un lado y, pérdida de contactos celulares y posterior proliferación endotelial por otro. La degradación de la matriz celular tiene lugar por acción de metaloproteasas específicas y, los contactos celulares están mediados por la acción de moléculas de adhesión, principalmente PECAM-1 [3,4] y VE-cadherin [5].

Todas las CE poseen PECAM-1. Esta molécula se localiza en las uniones intercelulares y contribuye a mantener la integridad de la monocapa endotelial [6], de tal forma que su distribución anómala es un indicador de alteración endotelial [7]. En ocasiones, el bloqueo o la ausencia de PECAM-1 se han asociado con fenómenos de inhibición de la angiogénesis [8].

De forma reciente, se ha descrito la actuación de numerosas moléculas con actividad proangiogénica (factores de crecimiento fibroblástico o endotelial) o antiangiogénica (inhibidores de metaloproteasas), pero poco se ha profundizado en la mediación de factores como las citocinas [9].

Las citocinas son mediadores solubles de amplia acción, producidas por muchos tipos celulares. Se ha demostrado la existencia de dos subpoblaciones de linfocitos productores de citocinas, pro o antiinflamatorias. Se caracterizan porque cada subpoblación es capaz de producir por un lado, su propio factor de crecimiento y, por otro, inhibir el desarrollo y actividad de la otra subpoblación [10]. Algunas citocinas tuvieron que excluirse de este modelo, es el caso de la controvertida IL-10, citocina con efectos tanto inmunoestimulantes como inmunosupresores in vitro [11].

El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento del fenómeno de angiogénesis, haciendo especial hincapié en la modulación que puedan ejercer distintas citocinas:

INTRODUCTION

Angiogenesis is a normal phenomenon associated with development and repair processes. However, under certain pathological conditions this process is altered, resulting in anomalous situations of reduced or increased vascular density [1]. The latter situation is in turn associated with the appearance of diseases such as rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy and tumor development [2].

The development of new vessels comprises a number of steps: degradation of the extracellular matrix on one hand; and loss of cell contact with posterior endothelial proliferation on the other. Extracellular matrix degradation is mediated by specific metalloproteases, while cell contact is regulated via the action of adhesion molecules - fundamentally platelet / endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) [3,4] and VE-cadherin [5].

All endothelial cells express PECAM-1. This molecule is located at intercellular junction level and contributes to maintain endothelial cell monolayer integrity [6]. An anomalous distribution of this adhesion molecule is therefore indicative of endothelial alteration [7]. Occasionally, PECAM-1 block or absence is associated with angiogenesis inhibiting phenomena [8].

Numerous molecules with proangiogenic (fibroblastic or endothelial growth factors) or antiangiogenic actions (metalloprotease inhibitors) have recently been described, though little insight has been gained to the mediation of factors such as the cytokines [9].

The cytokines are soluble mediators with a broad range of actions that are produced by many types of cells. Two cytokine-producing lymphocyte subpopulations have been described: pro- and antiinflammatory lymphocytes. Each subpopulation is able to produce its own growth factor and in turn can inhibit development and activity of the other subpopulation [10]. Some cytokines had to be excluded from this model, however, including interleukin-10 (IL-10) – a controversial cytokine with both immune stimulating and suppressing actions in vitro [11].

The present study was designed to further knowledge of angiogenesis, with special emphasis on the modulating effects exerted by

IL-4 como antiinflamatoria, IFN γ como proinflamatoria e IL-10. Para ello, utilizamos cultivos de células endoteliales (CE) sembradas sobre dos tipos de sustratos, el cristal y una matriz artificial tridimensional (producto de secreción de sarcoma de Engelbroth-Holm-Swarm, comúnmente conocido como Matrigel), previamente testada para cuantificar la capacidad angiogénica de distintos factores [12].

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de células endoteliales

Las CE se obtuvieron de vena de cordón umbilical humano y se pusieron en cultivo siguiendo la metodología descrita por Jaffe [13] con algunas modificaciones [14]. Brevemente, se digirió la vena con colagenasa de tipo I al 0.1% (Worthington), y el sedimento obtenido se cultivó en M-199 (Gibco BRL) completo suplementado con un 7.5% de suero bovino fetal (SBF). Para preparar los geles tridimensionales, se utilizó MatrigelTM (BD Biosciences, Madrid, España). Las CE procedentes del segundo pase se resuspendieron a una densidad de 3×10^6 células/ml.

La siembra sobre el cristal supone que las CE únicamente están expuestas al medio de cultivo y a las citocinas. Sin embargo, la presencia de Matrigel supone el enriquecimiento del medio con factores de crecimiento y la consiguiente modificación del microambiente en el que crecerán las células.

Los *geles tridimensionales* se formaron a razón de 4:1 v/v matrigel/células, y se incubaron durante 7 días con las distintas citocinas (rhIFN γ [100 U/ml] (Promega, USA), rhIL-4 [10 ng/ml] (un regalo del Instituto de Investigación Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey), IL-10 [10 ng/ml]) o con combinaciones de las mismas. Tras el tratamiento, se retiraron por un lado los medios de incubación y por otro, se lavaron las células y se fijaron con metanol.

Los *geles finos* se realizaron de la misma forma, pero las células se sembraron encima del gel, y se dejaron crecer durante 48 horas.

Inmunofluorescencia

Tras los distintos tiempos de estudio, los cultivos se lavaron dos veces en tampón fosfato sa-

different cytokines: interleukin-4 (IL-4) as an antiinflammatory cytokine, interferon-gamma (IFN γ) as a proinflammatory cytokine, and IL-10. To this effect endothelial cell (EC) cultures were used, seeding the cells onto two types of substrate: glass and an artificial three-dimensional (3D) matrix (secretion product of Engelbroth-Holm-Swarm sarcoma, commonly known as Matrigel®), previously tested to quantify the angiogenic capacity of different factors [12].

MATERIAL AND METHODS

Endothelial cell culture

The ECs were obtained from human umbilical cord vein and were cultured as described by Jaffe [13], with some modifications [14]. Briefly, the vein was digested with 0.1% type I collagenase (Worthington), and the resulting sediment was cultured in complete M-199 (Gibco BRL) supplemented with 7.5% of fetal calf serum (FCS). Matrigel® (BD Biosciences, Madrid, Spain) was used for preparation of the three-dimensional matrix. ECs obtained from the second cell passage were resuspended at a density of 3×10^6 cells/ml.

Seeding on glass implies that the ECs are only exposed to the culture medium and cytokines. However, the presence of Matrigel® enriches the medium with growth factors, thereby modifying the microenvironment in which the cells grow.

The three-dimensional gels were prepared in 4:1 v/v Matrigel®/cell proportion, and were incubated for 7 days with the different cytokines (rhIFN γ [100 U/ml] (Promega, USA), rhIL-4 [10 ng/ml] (a generous gift from the Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, New Jersey, USA), IL-10 [10 ng/ml]) or with combinations of these substances. Following treatment, the incubation media were removed, and the cells were washed and fixed with methanol.

The thin-layer gels were used in the same way, though the cells were seeded onto the gel layer and allowed to grow for 48 hours.

Immunofluorescence

After the different study times, the cultures were washed twice with phosphate buffered

lino pH 7.4 y, se fijaron con metanol frío a -20°C. Un anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 (Biogenesis, UK) diluido 1:100 en PBS pH 7.4 fue utilizado como primer anticuerpo. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón IgG (H+L) hecho en conejo, conjugado con FITC (Zymed laboratories, Inc., CA, USA) diluido 1:20 en PBS pH 7.6. Las muestras fueron estudiadas utilizando un microscopio Zeiss Axiophot y las imágenes se grabaron en una película Fujichrome 400 film (Fuji, Tokyo, Japan).

Citometría de flujo

Tras sincronizar los cultivos por incubación en M-199 con un 0.5% de SBF durante 24 horas, se incubaron las células con los distintos tratamientos y, tras los distintos tiempos de estudio, eliminamos el medio de cultivo y levantamos las células por tripsinización. Tanto para el análisis del ciclo celular como de la expresión de PECAM-1, utilizamos la fracción celular obtenida por centrifugación.

Ciclo celular: A tiempo basal y al término del cultivo las CE fueron lavadas y resuspendidas en 0.5 ml de una solución que contenía 5 µg/ml de yoduro de propidio, 0.1% de citrato de sodio, y 0.1% de Tritón X-100. Esta técnica [15] nos permite diferenciar y cuantificar en porcentaje, la relación entre núcleos con contenido normal de ADN diploide (fases G0/G1) a tetraploides (fases G2 y M), pasando por la fase intermedia de síntesis de ADN (S). Con el yoduro de propidio podemos medir la cantidad de ADN presente en cada núcleo celular, utilizando el láser de argón a 488nm del citómetro de flujo. El coeficiente de variación en cada fase fue siempre inferior al 2%. Para el análisis de los datos se utilizó un citómetro de flujo FACScan dotado con un módulo de discriminación de dobletes (DDM) bajo el control del software Lysis II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Análisis de PECAM-1: Incubamos las células con un anticuerpo anti-PECAM-1 (Harlan Sera-Lab (Harlan Sera-Lab Ltd, Sussex, UK)) durante 1 hora a 4°C. Como anticuerpo secundario utilizamos un anticuerpo anti-ratón marcado con fluoresceína también de Harlan (30 min 4°C). La expresión de PECAM-1 se estableció midiendo el porcentaje de células positivas y la intensidad media de su fluorescencia utilizando un citómetro de flujo FACScan bajo el control del software

saline (PBS) pH 7.4, followed by fixation in cold methanol (-20°C). An anti-PECAM-1 monoclonal antibody (Biogenesis, UK) diluted 1:100 in PBS pH 7.4 was used as primary antibody. The secondary antibody consisted of rabbit anti-mouse IgG (H+L) conjugated with FITC (Zymed Laboratories, Inc., CA, USA) and diluted 1:20 in PBS pH 7.6. The samples were examined with a Zeiss Axiophot microscope, and the images were recorded using Fujichrome 400 film (Fuji, Tokyo, Japan).

Flow cytometry

After synchronizing the cultures via incubation in M-199 with 0.5% FCS during 24 hours, the cells were incubated with the different treatments and, after the corresponding study times, the culture medium was eliminated and the cells were harvested by trypsinization. For analysis of both the cell cycle and PECAM-1 expression, use was made of the cell fraction obtained by centrifugation.

Cell cycle: At baseline and at the end of culture, the ECs were washed and resuspended in 0.5 ml of a solution containing 5 µg/ml of propidium iodine, 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100. This technique [15] allows differentiation and quantification (as a percentage) of the proportion of nuclei with a normal diploid DNA content (cell cycles phases G0/G1), tetraploid nuclei (phases G2 and M), and nuclei in the intermediate phase of DNA synthesis (phase S). Propidium iodine allows determination of the amount of DNA present in each cell nucleus, using the flow cytometer 488 nm argon laser. The coefficient of variation (CV) in each phase was < 2% in all cases. A FACScan flow cytometer equipped with a doublet discrimination module (DDM) and controlled by Lysis II software (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) was used for data analysis.

PECAM-1 analysis: The cells were incubated with an anti-PECAM-1 antibody (Harlan Sera-Lab Ltd, Sussex, UK) during one hour at 4°C. The secondary antibody was a fluorescein-labeled anti-mouse antibody (Harlan Sera-Lab Ltd, Sussex, UK) (30 min. at 4°C). PECAM-1 expression was established by measuring the percentage of positive cells and the mean intensity of fluorescence using a FACScan flow cytometer under Cell Quest

CELL QUEST (Becton & Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Análisis estadístico

Todos los valores se muestran como media $\pm$ desviación estandar de 5 cordones umbilicales distintos. Las diferencias estadísticas entre los efectos de las distintas citocinas (IL-10, IL-4 e IFN γ) sobre la expresión de PECAM-1 en los medios de incubación, se analizaron utilizando el test de Wilcoxon para muestras pareadas. Un valor de $p < 0.05$ se tomó como significación estadística.

RESULTADOS

Angiogénesis in vitro sobre Matrigel

El hallazgo más interesante fue la diferencia encontrada en la organización celular dentro y fuera del Matrigel tras 48h de incubación con las tres citocinas estudiadas. Sobre el cristal, encontramos una monocapa de células endoteliales expresando PECAM-1 de forma no muy abundante pero, dentro del Matrigel y por tanto, en presencia de factores de crecimiento, observamos en los mismos cultivos modificaciones en su organización celular.

Las células del grupo control, incubado en ausencia de citocinas, no formaron cordones vasculares cuando se cultivaron sobre Matrigel. Los cultivos formaron una monocapa celular que mantuvo las características de un cultivo normal, expresando de forma mayoritaria el marcador endotelial PECAM-1, a nivel de las uniones intercelulares (fig 1a).

En presencia del sustrato sintético, las CE tienden a formar estructuras tubulares, si bien, existen peculiaridades en función de la citocina utilizada. La presencia de IL-4 tras 48h de incubación, induce la presencia de colonias celulares dispersas en el gel, mientras en los contactos matriz-cristal las células se organizan formando estructuras tridimensionales a modo de túbulos (fig 1b) sin que decaiga la expresión de PECAM-1, es más, la expresión de esta molécula parece aumentar en los extremos de los túbulos, probablemente debido al aumento de la concentración de la población endotelial.

En los grupos control e incubados con IL-10 (fig 1c) la morfología fue similar, monocapa en

software control (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Statistical analysis

All values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of 5 different umbilical cords. The differences between the effects of the different cytokines (IL-10, IL-4 and IFN γ) upon PECAM-1 expression in the incubation media were analyzed with the Wilcoxon test for paired samples. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

RESULTS

In vitro angiogenesis on Matrigel®

The most interesting finding was the difference in cell organization with and without the presence of Matrigel® after 48 hours of incubation with the studied cytokines. On glass, we observed a monolayer of ECs with not very abundant PECAM-1 expression. In comparison, in the presence of Matrigel®, and therefore of growth factors, the same cultures showed modifications in cell organization.

The cells corresponding to the control group, incubated in the absence of cytokines, did not form vascular cords when cultured on Matrigel®. The cells formed a monolayer that maintained the characteristics of a normal cell culture, with predominant expression of the endothelial marker PECAM-1 at intercellular junction level (Fig. 1a).

In the presence of the synthetic substrate, the ECs tended to form tubular structures, though with peculiarities according to the type of cytokine involved. The presence of IL-4 after 48 hours of incubation induced the appearance of disperse cell colonies within the gel, whereas at the matrix-glass contact zone the cells formed three-dimensional tubular structures (Fig. 1b) without any decrease in PECAM-1 expression; indeed, the expression of this molecule appeared to increase at the extremities of the tubular structures – probably due to the increase in EC concentration.

In the control group and cells incubated with IL-10 (Fig. 1c), the morphology was seen

Figura 1. Efecto del Matrigel sobre la organización de la célula endotelial. Microscopía de fluorescencia (PECAM-1 en verde y núcleos en azul teñidos con DAPI). Célula endotelial a) control (MO x1000); b) IL-4 (MO x200); c) IL-10 (MO x200) y d) IFN γ (MO x200).

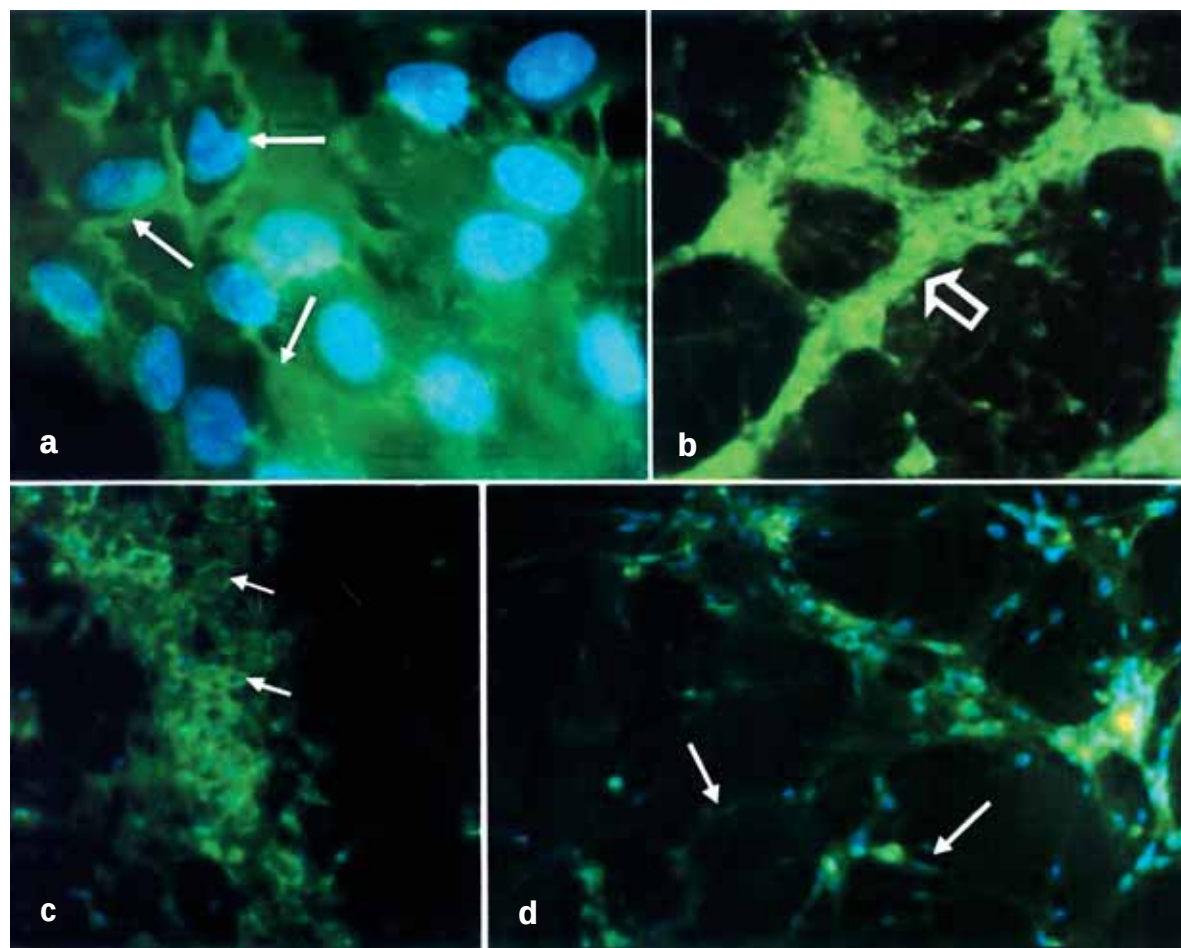


Figure 1. Effect of Matrigel® upon the organization of endothelial cells. Fluorescence microscopy (PECAM-1 in green, and nuclei stained blue with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)). Endothelial cells (light microscopy): a) control (x1000); b) IL-4 (x200); c) IL-10 (x200) and d) IFN γ (x200)

el cristal y agrupaciones celulares en el gel. En presencia de IFN γ , las células se alargan y pierden el aspecto de monocapa, la expresión de PECAM-1 decae pero no hay figuras que simulen tubos (fig 1d).

En cuanto al análisis de la combinación de las distintas citocinas sobre los cultivos de células endoteliales y, de igual modo al observado sobre sustrato de cristal, sólo se originaron estructuras tubulares cuando se combinaban IL-4 e IL-10, y sólo encontrábamos células alargadas en la combinación de IFN γ con IL-10 (fig 2).

to be similar, i.e., a cell monolayer on glass, and groupings of cells in gel. In the presence of IFN γ , the cells became elongated and lost the appearance of a monolayer. PECAM-1 expression decreased, and no structures simulating tubules were seen (Fig. 1d).

As regards analysis of the effects of the combination of the different cytokines upon the EC cultures, and in the same way as before on glass, tubular structures were only seen to appear when combining IL-4 and IL-10. In addition, elongated cells were only found on combining IFN γ with IL-10 (Fig. 2).

Figura 2. Efecto de distintas combinaciones de citocinas sobre la organización endotelial. Microscopía de fluorescencia (PECAM-1 en verde y núcleos en azul teñidos con DAPI). Célula endotelial creciendo sobre el cristal a) IL-10/IL-4; b) IL-10/IFN γ ; c) IL-4/IFN γ ; d) (IL-10/IL-4/IFN γ) y e) célula endotelial creciendo sobre el Matrigel (IL-10/IL-4/IFN γ). (MO x200).

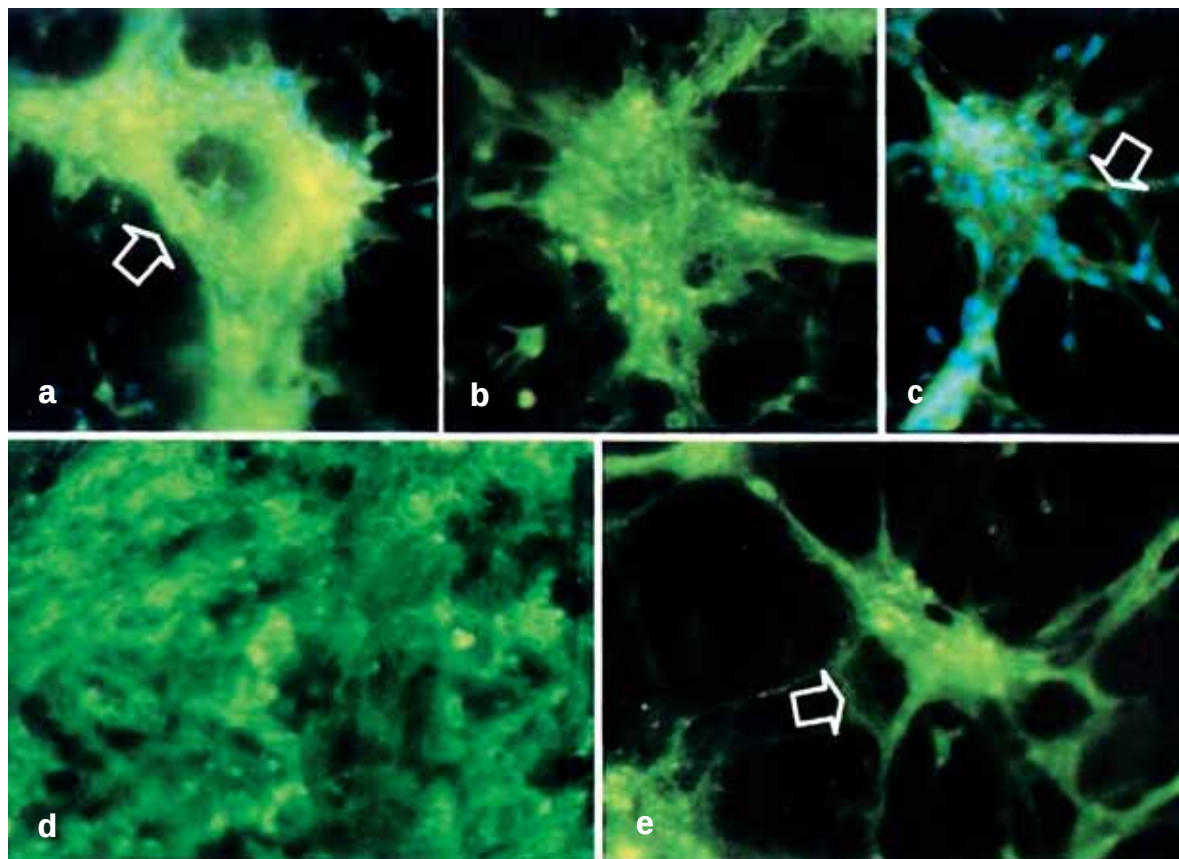


Figure 2. Effect of different combinations of cytokines upon endothelial organization. Fluorescence microscopy (PECAM-1 in green, and nuclei stained blue with DAPI). Endothelial cells growing on glass: a) IL-10/IL-4; b) IL-10/IFN γ ; c) IL-4/IFN γ ; d) IL-10/IL-4/IFN γ ; and e) endothelial cell growing on Matrigel® (IL-10/IL-4/IFN γ) (light microscopy, x200).

Evolución del ciclo celular endotelial en presencia de citocinas

La tabla 1 muestra la evolución del ciclo celular en los cultivos de CE incubados con las distintas citocinas. Sólo la presencia de IL-4 e IFN γ en el medio de incubación modificó el comportamiento de la población de CE. La adición de IL-4 indujo, de forma puntual, una aceleración del ciclo celular en los primeros estadios de análisis, reflejado en un aumento de la población de CE en fase de síntesis (20.9 ± 3.1) frente al grupo control (14 ± 2.5). La adición exógena de IFN γ al medio de incubación indujo un efecto similar pero a más largo plazo (48 h), y mantenido en el tiempo.

Endothelial cell cycle evolution in the presence of cytokines

Table 1 shows the evolution of the cell cycle in the EC cultures incubated with the different cytokines. Only the presence of IL-4 and IFN γ in the incubation medium modified the behavior of the cell population. On a point basis, the addition of IL-4 induced an acceleration of the cell cycle in the first phases of analysis – reflected by an increase in the EC population undergoing DNA synthesis (20.9 ± 3.1) versus the control group (14 ± 2.5). The exogenous addition of IFN γ to the incubation medium induced a similar but longer term effect (48 hours) that proved to be more persistent in time.

TABLA 1. Evolución del ciclo celular en HUVEC: Control versus IL-4, IFN γ e IL-10.
TABLE 1. Cell cycle evolution in HUVEC: Control versus IL-4, IFN γ and IL-10.

	24 horas/24 hours			48 horas/48 hours			72 horas/72 hours			
	G0 + G1	S	G2 + M	G0 + G1	S	G2 + M	G0 + G1	S	G2 + M	
CONTROL	73.2 $\pm$ 6.3	14 $\pm$ 2.5	12.7 $\pm$ 1.7	76.4 $\pm$ 5.3	8.9 $\pm$ 0.5	14.6 $\pm$ 1.6	74.1 $\pm$ 5.5	12.5 $\pm$ 1.4	11.6 $\pm$ 0.9	CONTROL
IL-4 (10 ng/ml)	88.6 $\pm$ 9.3*	20.9 $\pm$ 3.1*	11.3 $\pm$ 2	77 $\pm$ 2.9	8.6 $\pm$ 1.1	14.3 $\pm$ 1.3	70.3 $\pm$ 6.6	12.2 $\pm$ 1.2	16.8 $\pm$ 1.1*	IL-4 (10 ng/ml)
IFN γ [100 U/ml]	72.1 $\pm$ 4.7	17.4 $\pm$ 2.3	9.5 $\pm$ 0.8	67.9 $\pm$ 5.3	13.3 $\pm$ 0.9*	18.1 $\pm$ 2.1*	38 $\pm$ 3.7*	33.5 $\pm$ 2.5*	27.9 $\pm$ 1.6*	IFN γ [100 U/ml]
IL-10 [10 ng/ml]	73.3 $\pm$ 6	14.1 $\pm$ 2.9	12.5 $\pm$ 3.1	7.8 $\pm$ 5.4	10.5 $\pm$ 1.5	11.7 $\pm$ 1.6	78 $\pm$ 6.5	10.7 $\pm$ 2.1	11.3 $\pm$ 1.7	IL-10 [10 ng/ml]

Los valores se muestran como media $\pm$ desviación estándar (* p <0.05)

The values are shown as the mean $\pm$ standard deviation (* p <0.05)

Modificación de la expresión de PECAM-1

Las CE expresan PECAM-1 de forma constitutiva. Se observó una variación en la intensidad de la expresión de esta molécula, en función del tiempo de incubación de las células con los distintos tratamientos. Bajo microscopía de fluorescencia, la molécula PECAM-1 es detectada en las uniones célula-célula, apareciendo como una banda bien definida que limita los contactos celulares a modo de «cremallera».

Cuando se analizó, con citometría de flujo, la cinética de expresión de la molécula de PECAM-1 en CE previamente estimuladas con las distintas citocinas y sin matriz artificial, observamos como la presencia de IL-4, de forma individual o conjunta, disminuyó gradualmente el número de moléculas y la intensidad media de su expresión en función del tiempo de incubación, manteniéndose por debajo del grupo control desde las 48 h de incubación y hasta el final del estudio, mientras que la presencia de IFN γ únicamente disminuyó la molécula de PECAM-1 de forma puntual en los cultivos, tras 24 h de incubación de la citocina.

En la figura 3 se muestra la evolución de la molécula de PECAM-1 con el tiempo. Puede observarse como la IL-10 no ejerce ningún efecto sobre la expresión de esta molécula, mientras que todas aquellas combinaciones de citocinas que incluyen a la IL-4 se comportan de forma análoga a la sola presencia de esta citocina.

DISCUSIÓN

En numerosos procesos inflamatorios agudos, el daño al endotelio vascular es uno de los

Modification of PECAM-1 expression

ECs express PECAM-1 on a constitutive basis. A variation was observed in the intensity of expression of this molecule according to the duration of cell incubation with the different treatments. Under the fluorescence microscope, PECAM-1 was detected at the intercellular junctions in the form of a well defined band or «zipper»-like structure delimiting the cell contacts.

Flow cytometric evaluation of PECAM-1 expression kinetics in ECs previously stimulated with the different cytokines and in the absence of artificial matrix showed that the presence of IL-4 either individually or in combined form, led to a gradual decrease in the number of adhesion molecules and their mean intensity of expression over time. From 48 hours of incubation and until the end of the study, the PECAM-1 levels were seen to be inferior to those recorded in the controls. In contrast, the presence of IFN γ only led to reductions in PECAM-1 expression on a point basis in the cultures, after 24 hours of incubation with this cytokine.

Figure 3 shows the evolution of PECAM-1 expression over time. It can be seen that IL-10 exerted no effect upon the expression of this molecule, while all cytokine combinations that included IL-4 behaved in the same way as in the cultures exposed to IL-4 only.

DISCUSSION

In many acute inflammatory processes endothelial vascular damage is one of the

Figura 3. Cinética de la expresión de PECAM-1. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre el grupo control y las células tratadas de acuerdo con el test de Wilcoxon para datos pareados

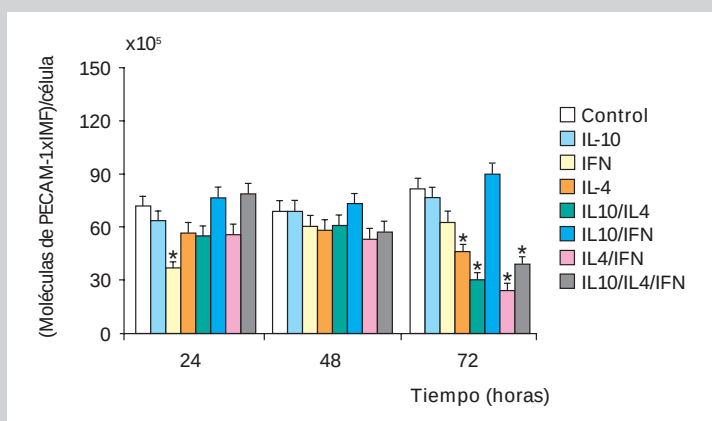


Figure 3. EPCAM-1 expression kinetics. The asterisks indicate statistically significant differences between the control group and treated cells (Wilcoxon test for paired data).

acontecimientos más tempranos, y los mediadores solubles forman parte de la respuesta que se desarrolla. Sin embargo, en estos modelos *in vivo*, es muy difícil diferenciar si el daño a la célula endotelial es directamente provocado por la citocina, o bien se debe a efectos secundarios originados por la presencia de factores externos, producto de las alteraciones en la fisiología normal del endotelio vascular [16,17].

Para responder a esta cuestión, se vienen utilizando modelos *in vitro* [18-20]. La mayoría de las investigaciones se basan en el cultivo de células sobre una matriz, que a menudo sirve como modelo de subendotelio para el estudio de su papel en la homeostasis vascular, no sólo en cuanto a modulación por mediadores solubles [21] sino también atendiendo a la interacción de estas con plaquetas [22-23] y/o células blancas [24].

En este trabajo, CE de vena de cordón umbilical fueron incubadas con las citocinas IL10, IL4 e IFN γ , de forma individual o combinadas, con el objetivo de clarificar el efecto que estas moléculas pudiesen tener sobre el fenotipo angiogénico de las CE y, especialmente, en la expresión de la molécula de adhesión PECAM-1 sobre un sustrato de cristal y dentro de una matriz artificial de características proangiogénicas.

Existe poca bibliografía sobre la dosis efectiva de IL-10 sobre la CE. Los papeles beneficiosos atribuidos a esta citocina en el caso de daño celular son por un lado, su capacidad para modular la evolución del ciclo celular en presencia de otras citocinas como el TGF β [25]. Nuestro grupo ha demostrado que esta citocina es capaz de inducir apoptosis a dosis superiores de 50 ng/ml [26] de ahí que en este trabajo utilicemos una concentración menor que nos asegura al máximo el daño endotelial. La IL-4 es una citocina de

earliest events, and the soluble mediators form part of the subsequent response. However, in the in vivo setting it is very difficult to determine whether EC damage is directly caused by cytokine presence, or whether it is attributable to side effects induced by the presence of external factors generated by the alterations in normal vascular endothelial physiology [16,17].

In vitro models have been used in attempts to clarify this point [18-20]. Most investigators make use of cells cultured on a matrix that often serves as a subendothelial model for the study of vascular homeostasis not only as regards the intervention of soluble mediators [21] but also as refers to interaction of the latter with platelets [22-23] and/or white blood cells [24].

In the present study, ECs from umbilical cord vein were incubated with a series of cytokines (IL-10, IL-4 and IFN γ) either individually or in combination, with the purpose of exploring their effects upon the angiogenic phenotype of ECs and particularly on PECAM-1 adhesion molecule expression on a glass substrate or within an artificial proangiogenic matrix.

Few data are available in the literature on the effective dose of IL-10 in application to ECs. The purported beneficial effects of this cytokine in the case of cellular damage focus on its capacity to modulate the cell cycle in the presence of other cytokines such as TGF β [25]. We have shown that this cytokine is able to induce apoptosis at doses above 50 ng/ml [26] – hence the use of a lower concentration in the present study, to maximally ensure endothelial damage. The effects of IL-4 upon ECs are subject to controversy. In effect, while some authors consider this cytokine to

efecto controvertido sobre la CE, pues encontramos grupos que le atribuyen un efecto angiogénico [27] y otros grupos, que le atribuyen el contrario [28]. En todos los casos, la concentración efectiva de la citocina es la utilizada en este trabajo. En cuanto al IFN γ , también hemos utilizado dosis que se han descrito inócuas para la CE [29].

En este trabajo, mostramos claramente las diferencias que existen entre los distintos sustratos de cultivo, cristal y Matrigel. Sobre el cristal, las células se adhieren y comienzan a crecer, viéndose su morfología afectada en función de la citocina utilizada. Sobre Matrigel, una matriz artificial con numerosos factores de crecimiento (EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF-1,...), la organización de la CE normal es bien distinta. Las CE estimuladas con esta matriz, se organizan tridimensionalmente y generan estructuras tubulares, que se ven afectadas según la citocina que se añada de forma exógena.

Sin embargo, la IL-4 parece tener un efecto puntual (disminución de la expresión de PECAM-1 tras 24h de incubación) sobre la CE y distinto en función del sustrato de crecimiento. Sobre el cristal, vemos que las CE adquieren un aspecto de monocapa a las 48h del estímulo y que, en presencia del Matrigel, observamos estructuras tubulares tridimensionales. Esta dualidad en el comportamiento de la IL-4 está en consonancia con lo descrito por otros grupos que muestran por un lado, la inhibición en presencia de IL-4 de la angiogénesis inducida por VEGF [28], y por otro, la estimulación de la angiogénesis in vivo [27].

Nuestro trabajo muestra como es la IL-4 la última responsable de la disminución de la expresión de la molécula de PECAM-1 sobre la CE. La disminución de esta molécula en los contactos célula-célula conlleva por un lado, la pérdida de la selectividad característica de la monocapa endotelial y, en consecuencia, la exposición de la matriz subendotelial subyacente, fenómeno necesario para iniciar la neoangiogénesis. Por otro lado, a largo plazo, se mantiene mínima la expresión de PECAM-1 en presencia de IL-4, por lo que la formación de neovasos no se llegaría a producir.

El efecto del IFN γ también es interesante, pues podría estar antagonizando el efecto de la IL-4 sobre la CE, siendo por tanto de gran importancia en la regulación del estado angiogénico de la CE. En este trabajo, la presencia de IFN γ , revierte la acción de la IL-4 sobre la CE en cuanto a su estado proangiogénico. Existen referen-

possess an angiogenic effect [27], other investigators claim the opposite effect [28]. In all cases, the effective cytokine concentration was equivalent to that used in our study. As regards IFN γ , we have likewise used doses considered to be innocuous for ECs [29].

The present study clearly reflects the differences between the different culture substrates (glass and Matrigel™). When seeded on glass, the ECs adhere and begin to grow – their morphology being influenced by the type of cytokine used. In comparison, when the cells are grown in Matrigel™ – an artificial matrix containing numerous growth factors (EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF-1, etc.) – the resulting cellular organization is quite different. In effect, the ECs stimulated by this matrix organize three-dimensionally to form tubular structures that in turn are affected in a way dependent upon the type of exogenously added cytokine.

In this context, IL-4 appear to exert a point effect (reduction in PECAM-1 expression after 24 hours of incubation) upon the ECs depending on the growth substrate involved. Thus, when grown on glass, the cells form monolayer 48 hours after exposure to the stimulus, while in the case of Matrigel® three-dimensional tubular structures are formed. This duality in cell behavior with exposure to IL-4 coincides with the observations of other authors who on one hand have reported inhibition of VEGF-induced angiogenesis in the presence of IL-4 [28], and on the other IL-4 mediated stimulation of angiogenesis in vivo [27].

Our study shows IL-4 to be the ultimate factor responsible for the reduction in PECAM-1 expression by the ECs. The reduction in the presence of this adhesion molecule at the intercellular junction implies loss of the characteristic monolayer, resulting in exposure of the underlying subendothelial matrix – this phenomenon being necessary for neoangiogenesis to take place. On the other hand, over the longer term, minimum PECAM-1 expression is maintained in the presence of IL-4, as a result of which new vessel formation does not occur.

The effect of IFN γ is also interesting, since it may antagonize the influence of IL-4 upon the ECs – thus suggesting an important role in the regulation of EC angiogenic status. In the present study, the presence of IFN γ was seen to revert the action of IL-4 upon the ECs as regards their proangiogenic tendency. The

cias en la bibliografía que hablan del antagonismo entre estas dos citocinas [30], si bien es un trabajo realizado sobre fibroblastos y queratinocitos. La literatura también refleja las modificaciones inducidas por el IFN γ sobre la CE, tanto en su morfología [31] como en la expresión de PECAM-1 [14]. Ambos trabajos estarían en consonancia con las observaciones morfológicas realizadas sobre los cultivos y en el efecto aditivo de IL-4 e IFN γ sobre la disminución de PECAM-1.

Finalmente, podemos decir que según los resultados obtenidos, la IL-4 induce angiogénesis en las primeras 24h de incubación, efecto que se anula en presencia de factores de crecimiento. El IFN γ bloquea la acción de la IL-4 y, la IL-10 parece actuar bloqueando la acción del IFN γ .

En conclusión, hemos visto como las citocinas pueden actuar en un sentido o en otro dependiendo del microambiente en que actúen. Por tanto, es necesario profundizar en el estudio de los efectos conjuntos de citocinas y factores de crecimiento *in vivo*, para poder establecer protocolos clínicos de actuaciones antitumorales.

literature mentions antagonism between these two cytokines [30], though the work done in this sense refers to fibroblasts and keratinocytes. The literature also describes the EC modifications induced by IFN γ in terms of both cell morphology [31] and PECAM-1 expression [14]. The observations of both studies coincide with our own findings in terms of cultured cell morphology and the additive effect of IL-4 and IFN γ upon the reduction of PECAM-1 expression.

Lastly, the results obtained suggest that IL-4 induces angiogenesis within the first 24 hours of incubation – an effect that is cancelled in the presence of growth factors. IFN γ blocks the action of IL-4, while in turn IL-10 appears to block the action of IFN γ .

In conclusion, we have seen that cytokines may act in distinct ways depending on the conditions of the microenvironment in which they are found. Further studies are thus needed to gain improved insight to the combined effects of cytokines and growth factors in vivo, with the purpose of defining clinical protocols for antitumor therapy.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. SADOUN E, REED MJ. Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51:1119-30.
2. MALONNE H, LANGER I, KISS R, ATASSI G. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17:1-14.
3. DELISSER HM, NEWMAN PJ, ALBELDA SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol. Today* 1994; 15: 490-495.
4. LITWIN M, CLARK K, NOACK L, FURZE J, BERNDT M, ALBELDA S, *et al.* Novel cytokine-independent induction of endothelial adhesion molecules regulated by platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31). *J Cell Biol.* 1997; 139: 219-228.
5. AYALON O, SABANAI H, LAMPUGNANI MG, DEJANA E. Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1994; 126: 247-258.
6. FERRERO E, FERRERO ME, PARDI R, ZOCCHI MR. The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett.* 1995; 374:323-6.
7. MULLER WA, WEIGL SA, DENG X, PHILLIPS DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993; 178:449-60.
8. DELISSER HM, CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU M, STRIETER RM, BURDICK MD, ROBINSON CS, WEXLER RS *et al.* Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997; 151:671-7.
9. DISTLER O, NEIDHART M, GAY RE, GAY S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol.* 2002; 21:33-49.
10. CHARLTON B, LAFFERTY KJ. The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7:793-798.
11. OBERHOLZER A, OBERHOLZER C, MOLDAWER LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med.* 2002; 30:S58-63.
12. PASSANITI A. Extracellular matrix-cell interactions: Matrigel and complex cellular pattern formation. *Lab Invest.* 1992; 67:804-808.
13. JAFFE EA, NACHMAN RL, BECKER CG, MINICK CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973; 52: 2745-2756.
14. BUJÁN J, GIMENO MJ, PRIETO A, PASCUAL G, BELLÓN JM, ALVAREZ-MON M. Modulation of PECAM-1 (CD31) expression in human endothelial cells: Effect of IFN γ and IL-10. *J Vasc Res.* 1999; 36: 106-113.
15. NICOLETTI I., MIGLIORATI G., PAGLIACCI MC., GRIGNANI F, RICCARDI C. A rapid and simple me-

- thod for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139:271-9.
16. HARKER LA., SCHWARTZ SM., ROSS R. Endothelium and arteriosclerosis. *Clin Haematol* 1991; 10:283-96.
 17. ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990. *Nature* 1993; 362: 801-09.
 18. THRONHILL MH., LI J., HASKARD DO. Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand J Immunol* 1993; 38:279-86
 19. RELOU IA., DAMEN CA., VAN DER SCHAFT DW., GROENEWEGEN G., GRIFFIOEN AW. Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue Cell* 1998; 30:525-30.
 20. MULLER AM., CRONEN C., MULLER KM., KIRKPATRICK CJ. Comparative analysis of the reactivity of human umbilical vein endothelial cells in organ and monolayer culture. *Pathobiology* 1999; 67:99-107
 21. VLODAVSKY I, ELDOR A, HYAM E, ATZOM R, FUKS Z. Platelet interaction with the extracellular matrix produced by cultured endothelial cells: a model to study the thrombogenicity of isolated subendothelial basal lamina. *Thromb Res.* 1982; 28:179-91.
 22. GABROWSKI EF. Platelet aggregation in flowing blood at a site of injury to an endothelial cell monolayer: quantitation and real time imaging with a TAB monoclonal antibody. *Blood* 1990; 75:390-8
 23. AZNAR-SALATTI J., BASTIDA E, HAAS TA, ESCOLAR G, ORDINAS A., DE GROOT PHG, *et al.* Platelet adhesion to exposed endothelial cell extracellular matrixes is influenced by the method of preparation. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:436-42.
 24. ROMANIC AM, GRAESSER D, BARON JL, VISINTIN I, JANEWAY CA, MADRI JA. T cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix is modulated upon transendothelial cell migration. *Lab Invest* 1997; 76:11-23.
 25. HEIMARK RL, TWARDZIK DR, SCHWARTZ SM. Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science.* 1986; 233:1078-80.
 26. GIMENO MJ, PASCUAL G, G^a-HONDUVILLA N, PRIETO A, ÁLVAREZ DE MON M, BELLÓN JM, *et al.* Modulatory role of IL-10 in endothelial cell damage and platelet adhesion. *Histol Histopathol.* 2003; 18:695-702.
 27. FUKUSHI J, MORISAKIT, SHONOT, NISHIE A, TORISU H, ONO M, *et al.* Novel biological functions of interleukin-4: formation of tube-like structures by vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *Biochem Biophys Res Comm.* 1998; 250:444-448.
 28. LEE IY, KIM J, KO EM, JEOUNG EJ, KWONYG, CHOE J. Interleukin-4 inhibits the vascular endothelial growth factor- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Mol Cells* 2002; 14:115-121.
 29. MAIER JA, MORELLI D, BALSARI A. The differential response to interferon gamma by normal and transformed endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 214:582-8.
 30. TROMPEZINSKI S, DENIS A, VINCHEA, SCHIMITT D, VIAC J. IL-4 and interferon-gamma differentially modulate vascular endothelial growth factors release from normal human keratinocytes and fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2002; 11:224-231.
 31. MONTESANO R, ORCI L, VASSALLI P. Human endothelial cell cultures: phenotypic modulation by leukocyte interleukins. *J Cell Physiol.* 1985; 122:424-34.