

V. Matheu^{1,2}, Y. Barrios³

¹MIR, BMC, Universidad de Lund y ³Unidad Mixta de Investigación H.U.C.

²Inmunología, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife

Original

Influencia de la IL-10 en la enfermedad alérgica múrida

La IL-10 es una citocina Th2 cuya concentración aumenta en los ratones alérgicos tras la inmunización y la provocación específica con alérgenos. Sin embargo, se sabe que la IL-10 reduce la respuesta alérgica y parece participar en su resolución. En este trabajo se describen los resultados preliminares de un modelo experimental alérgico inducido con ovoalbúmina en ratones deficientes en IL-10. Los resultados indican que la falta de IL-10 puede disminuir la celularidad general y la eosinofilia de la vía respiratoria. Sigue sin conocerse la función que la IL-10 tiene en la respuesta alérgica.

Palabras clave: Interleucina 10. Alergia. Eosinofilia. Respuesta Th2. Ratones. asma.

Influence of interleukin-10 in the murine allergic disease

IL-10 is a Th2 cytokine with increased levels in mice after specific immunization and allergen challenge. However, this cytokine down-regulates the allergic response and it seems to be involved in the allergic response resolution. This work describes preliminary results of an OVA-induced allergic experimental model in IL-10 deficient mice. Results pointed out that the absence of IL-10 can contribute to the decline of total and eosinophilic inflammation. The function of IL-10 in the allergic response is still obscure.

Key words: Interleucina 10. Alergia. Eosinofilia. Respuesta Th2. Ratones. Asma.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la respuesta Th2, característica de las enfermedades alérgicas, las citocinas IL-4 e IL-5 parecen esenciales en su patogenia. La IL-4 es el principal factor que induce y mantiene la respuesta de los linfocitos Th2, es determinante en el cambio de isotipo de inmunoglobulina hacia la IgE¹ y exacerba la inflamación de la vía respiratoria al estimular la liberación de quimioquinas. En la regulación de la producción de la IgE también son importantes la IL-9 y la IL-13, ésta última con un receptor común con la IL-4, y ambas inter-

Correspondencia:
Victor Matheu
Servicio de Inmunología.
Hospital Universitario de Canarias.
Ofra s/n. La Cuesta. La Laguna.
38320 Tenerife
E-mail: Victor.Matheu@inflam.lu.se

*Este trabajo fue financiado en parte mediante la ayuda al proyecto de investigación "Papel del interferón beta y de su gen regulador en la inmunorregulación e inflamación de un modelo múrido de asma" de la Fundación SEAIC (1º semestre 2000) y por la "Fundación 80º aniversario Rey Gustaf V" (Victor Matheu durante el año 2003) en la Universidad de Lund (Suecia).

Tabla I. Los valores representan la media aritmética \pm error estándar de la media (n=5 ratones por grupo; *p \leq 0,05)

| | Citocinas LBA (pg/ml) | | | Ig Th2 en suero (μ g/ml) | | Eosinófilos en LBA | |
|----------------------|-----------------------|--------------|--------------|-------------------------------|----------------|--------------------|----------|
| | IL-4 | IL-5 | IL-13 | IgG1 | IgE | % | Nº total |
| B10.Q | 42,6 \pm 6 | 216 \pm 18 | 125 \pm 11 | 1,1 \pm 0,2 | 2,2 \pm 0,1 | 57,5 \pm 6 | 248,745 |
| IL-10 ^{-/-} | 50,3 \pm 8 | 121 \pm 9* | 161 \pm 14 | 1,6 \pm 0,2* | 2,9 \pm 0,2* | 43,7 \pm 5* | 118,864* |

vienen en la hiperplasia de las glándulas secretoras mucosas y en la hiperreactividad bronquial. La IL-5 es la citocina principal para el crecimiento, diferenciación, activación y supervivencia de los eosinófilos. Otras citocinas de la respuesta Th2 son la IL-3, que controla el desarrollo de mastocitos y basófilos, y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), que junto a la IL-3 y la IL-5 regula el componente eosinofílico de la respuesta alérgica.

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria considerada una citocina Th2² que reduce la respuesta alérgica y la respuesta Th1. Aunque las concentraciones de IL-10 en el lavado broncoalveolar de los ratones alérgicos aumentan tras la provocación con alérgenos³, la IL-10 parece participar en la resolución de esta respuesta⁴. En este trabajo se describe el desarrollo de un modelo experimental alérgico inducido por ovoalbúmina en ratones deficientes en IL-10.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron indistintamente ratones macho y hembra C57BL/10.Q y de la misma cepa pero deficientes en IL-10 (IL-10^{-/-})^{5,6}; la falta de IL-10 se demostró mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales controladas en la Sección Animal del *Biomedical Centrum III* (M.I.R., B.M.C. III, Universidad de Lund, Suecia). Los protocolos experimentales se rigieron por las normas internacionales.

Inducción de la enfermedad

A los ratones se les sensibilizó por vía intraperitoneal con 50 μ g de ovoalbumina (OVA) (Sigma, St Louis, EEUU) incluidos en 5 mg de Alum (Sigma) el día 0⁷. En los días 7^o, 8^o, 9^o y 10^o se realizó una provocación intranasal con 50 μ g de OVA. El día 11^o se evaluó la respuesta alérgica, 24 horas después de la última provocación.

Eosinofilia en el lavado broncoalveolar (LBA)

El día 11^o se realizó un lavado broncoalveolar (LBA) según el método publicado previamente⁸. Se prepararon muestras citológicas teñidas para detectar eosinófilos mediante un análisis histoquímico⁹ y las extensiones se examinaron mediante microscopía óptica en una sesión a simple ciego. Se contabilizaron más de 400 células por muestra.

Concentraciones de IgE e IgG1 en el suero y de citocinas en el LBA

Las concentraciones de IgE e IgG1 totales se determinaron por duplicado en el suero mediante ELISA según un protocolo previamente publicado⁸. Posteriormente se evaluó el contenido de IL-4, IL-5 e IL-13 en el sobrenadante del LBA mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales comercializados⁷.

Análisis estadístico

La significación estadística se analizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los valores se consideraron significativos cuando la p fue inferior a 0,05.

RESULTADOS

En el estudio del lavado broncoalveolar se observó un número significativamente menor del total de células en los ratones IL-10^{-/-} (272.000 \pm 15.000 células/ml) que en los ratones del grupo C57BL/10.Q (432.600 \pm 76.000 células/ml; p < 0,05). Se mostró de la misma forma un número significativamente menor de eosinófilos en el grupo IL-10^{-/-} (43,7% \pm 5,7) que en el de ratones C57BL/10.Q (57,5% \pm 6,1; p < 0,05).

De una forma similar se observó una diferencia significativa entre las concentraciones de IL-5 en los ratones del grupo IL-10^{-/-} y los del grupo control. En cambio las concentraciones de IL-4 e IL-13 no variaron ostensiblemente entre ambos grupos (Tabla I).

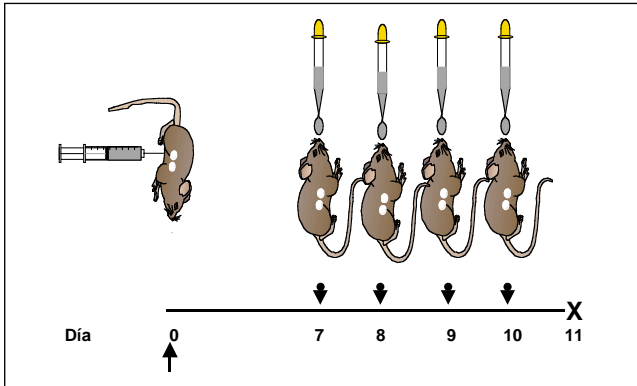


Fig. 1. Protocolo de inmunización. A los ratones se les inmunizaba el día 0 y se les aplicaba una provocación nasal con OVA los días 7, 8, 9 y 10. Finalmente se les sacrificaba el día 11.

Las concentraciones séricas de IgE e IgG1 eran ligera pero significativamente superiores en los ratones IL-10^{-/-} que en los ratones C57BL/10.Q (Tabla I).

DISCUSIÓN

El desarrollo de la respuesta inmunitaria en la enfermedad alérgica es complejo e incluye la interacción tanto de factores genéticos como ambientales. A la IL-10 se la describió como un factor inhibitor de la síntesis de citocinas debido a su capacidad para inhibir la síntesis de linfocitos Th1¹⁰. Pero además es una citocina pleiotrópica producida por los linfocitos B, Th2 y los macrófagos y que ejerce efectos tanto supresores como estimuladores. La IL-10 posee una capacidad inhibitoria sobre la acumulación de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones tras la provocación con alérgenos¹¹, en la expresión de los marcadores B7 (CD80 y CD86) importantes en la respuesta alérgica y en la expresión del MHC II en los macrófagos. Además, el tratamiento con IL-10 recombinante en las vías respiratorias de los ratones disminuye las concentraciones de IL-4 e IL-5¹¹. Por el contrario, la IL-10 puede estimular funciones de los macrófagos, la capacidad citotóxica de los linfocitos CD8⁺¹² y aumentar la expresión del MHC II en los linfocitos B.

En este estudio se compararon la eosinofilia pulmonar, las citocinas en la vía respiratoria y las inmunoglobulinas Th2 de ratones con IL-10 con las de ratones que carecían de dicha citocina tras la aplicación de un modelo experimental alérgico. Los resultados indican que la falta de IL-10 produce una disminución de la inflamación global y eosinofílica en la vía respiratoria de los ratones C57BL/10. Otros autores han observado hechos si-

milares. Yang y cols. encontraron una respuesta eosinofílica reducida junto a una disminución paralela de la IL-5. Pero no encontraron diferencias en las concentraciones de IgE, IgG1 ni IL-4¹³. De una forma similar, los experimentos de Mäkelä y cols. mostraron una disminución de la eosinofilia junto a una falta de hiperreactividad bronquial en los ratones que carecían de IL-10. Junto a ello encontraron un aumento de IgE e IgG1 sin obtener cambios en la expresión de citocinas Th2¹⁴. Al contrario que estos resultados, Justice y cols., observaron un aumento de todos los parámetros característicos de la respuesta Th2 incluido un aumento de la eosinofilia pulmonar, de las inmunoglobulinas E y G1 y de las citocinas IL-4 e IL-5. Resulta sorprendente que estos autores hallaran una disociación con la hiperreactividad bronquial, que se encontraba disminuida¹⁵. Hay que destacar que los tres estudios citados utilizaron la misma cepa de ratones C57BL/6, aunque la eliminación del gen de la IL-10 no se obtuvo de la misma fuente. Queda la duda razonable de que la eliminación del fragmento en el cromosoma 1 mürido, ocupada por el gen regulador de la IL-10, afectara a algún otro gen cercano que pudiera estar implicado en la aparición de la enfermedad.

Muchas de las funciones de las citocinas son redundantes, lo que dificulta el estudio de sus funciones de forma aislada. Sin embargo, estos estudios son necesarios para intentar comprender los factores genéticos, ambientales y dietéticos que influyen en las enfermedades alérgicas. La función dual que la IL-10 posee en el contexto de la respuesta alérgica está todavía lejos de conocerse del todo, pero debe seguirse investigando para poder llegar a comprender su función en la enfermedad alérgica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102: 5-28.
2. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165-190.
3. van Scott MR, Justice JP, Bradfield JF, Enright E, Sigounas A, Sur S. IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L667-674.
4. Borish L, Aarons A, Rumbly J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1288-1296.
5. Svensson L, Arvola M, Sallstrom MA, Holmdahl R, Mattsson R. The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the comple-

- tion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol* 2001; 51: 3-7.
6. Johansson AC, Hansson AS, Nandakumar KS, Backlund J, Holmdahl R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J Immunol* 2001; 167: 3505-3512.
7. Matheu V, Treschow A, Navikas V, Issazadeh-Navikas S. Upregulation of B7 molecules (CD80 and CD86) and exacerbated eosinophilic pulmonary inflammatory response in mice lacking the IFN-beta gene. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 550-557.
8. Matheu V, Navikas V, Issazadeh-Navikas S. Susceptibilidad de la cepa murinamúrida B10.RIII a padecer enfermedad inflamatoria alérgica pulmonar. Un modelo murino de asma. *Alergol Inmunol Clin* 2001; 16: 282-290.
9. Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 585-592.
10. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-3451.
11. Zuany-Amorim C, Haile S, Leduc D, Dumarey C, Huerre M, Vargaffig BB, et al. Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *J Clin Invest* 1995; 95: 2644-2651.
12. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991; 147: 528-534.
13. Yang X, Wang S, Fan Y, Han X. IL-10 deficiency prevents IL-5 overproduction and eosinophilic inflammation in a murine model of asthma-like reaction. *Eur J Immunol* 2000; 30: 382-391.
14. Makela MJ, Kanehiro A, Borish L, Dakhama A, Loader J, Joetham A, et al. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6007-6012.
15. Justice JP, Shibata Y, Sur S, Mustafa J, Fan M, Van Scott MR. IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L363-368.