
Efecto de la terapia inmunosupresora sobre la producción de TGF β

J. Merino, A. Sánchez, M.L. Subirá

INTRODUCCIÓN

El TGF β ₁ es el inmunosupresor endógeno más potente conocido, aventajando en 10.000 a 100.000 veces la potencia de la ciclosporina. Es un producto endógeno, tanto de linfocitos T y B como de monocitos, células NK o LAK, comportándose como una señal negativa que actúa de freno para controlar una excesiva actividad y proliferación inducida por el antígeno¹.

El estudio *in vitro* de la producción de TGF β ₁ o de la expresión de su RNAm exige unas condiciones experimentales muy estrictas, que consisten fundamentalmente en la eliminación de los suplementos séricos del medio de cultivo. Un análisis detallado de la bibliografía existente con respecto a la producción de TGF β ₁ por diversos tipos celulares revela unanimidad en la eliminación del suero y factores de crecimiento de los cultivos, cuando se está cuantificando el TGF β ₁ proteico producido por las células. Sin embargo, existe una asombrosa variabilidad en las condiciones de cultivo desarrolladas por los diferentes grupos para el estudio de la expresión del RNAm de TGF β ₁. Esto quizá podría explicar las notables controversias y contradicciones bibliográficas sobre la producción

del TGF β ₁, que constituyen una constante en la literatura referente a este tema.

La cinética de expresión del gen del TGF β ₁ parece variar en función del tipo celular, con bastante independencia del estímulo empleado. Se admite en general que fibroblastos y células epiteliales presentan niveles máximos de RNAm de TGF β ₁ al cabo de 6 horas de estimulación. Las células hematopoyéticas parecen presentar una cinética tardía de expresión del gen del TGF β ₁, normalmente en relación con la diferenciación celular.

Los linfocitos T expresan constitutivamente RNAm de TGF β ₁². A pesar de dicha expresión constitutiva, la liberación de TGF β ₁ al medio de cultivo sólo ocurre tras la activación celular, caracterizándose por su estado latente y por su cinética de liberación tardía, con niveles máximos alcanzados al cabo de 96 a 120 horas de estimulación celular³. Por lo que respecta a la regulación de la expresión del gen del TGF β ₁, las contradicciones de la literatura alcanzan aquí su máximo exponente. Parece razonable suponer que tan importantes discrepancias podrían deberse a la variabilidad de las condiciones metodológicas utilizadas por los diferentes grupos.

ANALES Sis San Navarra 1997, 20 (Supl. 3): 57-64.

Servicio de Inmunología. Clínica Universitaria de Navarra.

Por otra parte, cabría pensar que además de las precauciones metodológicas, el estudio de la producción de TGF β_1 de origen linfocitario exige otra precaución complementaria, que consistiría en la eliminación de las plaquetas que pueden contaminar la población de linfocitos. Se ha descrito que la población linfoide obtenida por el método estándar de centrifugación sobre un gradiente de Ficoll-Paque está notablemente contaminada por plaquetas, en una proporción de hasta 20 plaquetas por cada célula mononuclear⁴. Puesto que las plaquetas representan la fuente más concentrada de TGF β_1 del organismo, que liberan al exterior durante su desgranulación⁵, cabría plantearse si tal presencia plaquetar podría interferir el estudio de la producción de TGF β_1 por los linfocitos o de la expresión de su RNAm. Sin embargo, ninguno de los grupos de trabajo anteriormente citados refiere ningún esfuerzo específico destinado a eliminar la posible presencia de plaquetas en sus cultivos. Dicha contaminación introduciría, al menos teóricamente, otra variable a la que atribuir la discordancia de resultados descrita.

Puesto que el TGF β_1 es el inmunosupresor endógeno más potente conocido, parece interesante estudiar su relación con los inmunosupresores exógenos de uso habitual en la práctica clínica: corticoides, ciclosporina y azatioprina.

Hoy en día se considera que la expresión local de citoquinas y factores de crecimiento desempeña un papel central en la fisiopatología de enfermedades que cursan con fibrosis y aumento de síntesis de matriz extracelular. De las diferentes citoquinas cuya expresión se ha encontrado elevada en tejidos afectados por estas patologías, el TGF β es la única para la que se ha demostrado correlación entre sus niveles elevados y el aumento de síntesis de colágeno y subsiguiente desarrollo de fibrosis⁶. Los corticoides son fármacos antifibróticos por excelencia, de conocida acción inhibidora sobre la síntesis de colágeno por los fibroblastos, que de hecho suelen emplearse en el tratamiento de las enfermedades anteriormente citadas. Por ello, en una primera instancia podría tener sentido biológico el hecho de que los corticoides

inhibieran la producción de TGF β . En la curación de las heridas, por ejemplo, corticoides y TGF β_1 ejercen efectos claramente contrapuestos, hasta el punto de que sólo el TGF β_1 es capaz de revertir los efectos nocivos de los corticoides⁷.

Los datos existentes al respecto en la literatura son contradictorios, lo cual podría contar con tres posibles explicaciones: la primera consistiría en suponer que el efecto de los corticoides sobre la expresión y producción de TGF β_1 fuera tipo celular-dependiente. La segunda explicación alude inevitablemente a cuestiones metodológicas. En tercer lugar, las discrepancias descritas también podrían deberse al hecho de que los diversos autores utilizan diferentes dosis de dexametasona, la cual podría ejercer un efecto bifásico sobre la producción de TGF β_1 .

El único estudio existente en la literatura acerca de la relación entre la ciclosporina y la producción de TGF β_1 describe que dicho fármaco, a una dosis de 100 ng por millón de células, provoca un aumento en los niveles de RNAm de TGF β en linfocitos T humanos activados con diacilglicerol e ionomicina, detectándose niveles máximos al cabo de 1 hora de activación celular. Comprueban que dicho aumento en los niveles de RNAm se traduce en un aumento en la liberación de TGF β proteico a las 48 horas de cultivo, y concluyen que el TGF β podría estar mediando parte del efecto inmunosupresor de la ciclosporina *in vivo*⁸. Con respecto a este trabajo, se podrían hacer dos consideraciones: en primer lugar, no especifican condiciones experimentales de cultivo. En segundo lugar, resulta inesperada la cinética de expresión del gen del TGF β que describen durante la activación T. Según estos autores, un linfocito T activado por la combinación de diacilglicerol e ionomicina expresa niveles máximos de RNAm de TGF β al cabo de 1 hora de la estimulación, antes incluso que de IL-2, cuyos niveles máximos de RNAm se detectan al cabo de 4 horas de activación celular. El hecho de que el gen del TGF β se active antes que el de la IL-2 resulta sorprendente, dado el carácter extremadamente tardío de la liberación del TGF β proteico, con niveles máximos alcanzados tras 4 ó 5 días de acti-

vacación celular. Además, este dato no coincide con estudios de otros autores, que describen una cinética tardía de expresión del gen del TGF β_1 en células hematopoyéticas, según referíamos en el segundo apartado.

No existen datos que relacionen directamente la azatioprina con la producción de TGF β_1 . En la revisión bibliográfica efectuada hemos encontrado un solo estudio, realizado en pacientes sometidos a tratamiento con azatioprina a dosis convencionales, en los que se determinó la producción de TGF β por Células Mononucleares (CMN) de sangre periférica, comparándose con la de controles sanos, sin que se encontraran diferencias significativas entre ambos grupos⁹.

La regulación de la expresión de TGF β_1 linfocitario con la activación celular, así como su modulación por fármacos inmunosupresores, requiere estudios adicionales, dado que las contradicciones de la bibliografía impiden extraer conclusiones definitivas. Nuestra hipótesis se basa en que tales contradicciones se deben, además de a la realización de los ensayos en presencia de cantidades variables de suero u otros moduladores del crecimiento celular, a dos razones fundamentales: por una parte, a la presencia de contaminación plaquetar en los cultivos linfocitarios, y por otra, a la falta de estudios cinéticos prolongados, lo que impide analizar los niveles de RNAm en el momento cronológico más adecuado.

Los objetivos concretos de este estudio son:

1. Cuantificar el grado de contaminación plaquetar de CMN obtenidas con un gradiente de Ficoll-Paque y determinar su posible influencia sobre el estudio de la producción de TGF β_1 linfocitario.

2. Realizar estudios cinéticos prolongados de expresión de RNAm y de producción de TGF β_1 en CMN estimuladas con PHA.

3. Analizar el efecto de los fármacos inmunosupresores, dexametasona, ciclosporina y azatioprina, sobre la expresión y producción de TGF β_1 por CMN estimuladas con PHA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el aislamiento de CMN se utilizó el procedimiento estándar de separación sobre un gradiente de Ficoll-Paque.

Para su eliminación, se compararon dos técnicas distintas: $1,5 \times 10^7$ CMN resuspendidas en 1 ml de CNa 0,25 M se dispusieron formando gradiente sobre 5 ml de STF descomplementado o sobre 5 ml de Percoll. La columna de STF se centrifugó a 175 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y la de Percoll a 400 g durante 5 minutos también a temperatura ambiente. En ambos casos, las células, supuestamente libres de plaquetas, se disponen en el sedimento, que se recogió y lavó dos veces.

Las CMN se cultivaron a una concentración de 1×10^6 cél/ml en AIM V, suplementado con antibióticos a 37°C. El AIM V es un medio de cultivo diseñado especialmente para permitir el crecimiento linfocitario en condiciones libres de suero, que por no incluir en su composición factores de crecimiento se emplea en estudios de producción de TGF β . Nosotros lo emplearemos también para los estudios de expresión del RNAm. La fitohemaglutinina se añadió a una concentración de 5 μ g/ml. Los cultivos realizados en presencia de fármacos inmunosupresores recibieron simultáneamente y por este orden, el fármaco inmunosupresor y la PHA, ya que, al menos para la IL-2, está demostrado que la ciclosporina inhibe su expresión linfocitaria sólo si se administra antes o simultáneamente al estímulo mitogénico, pero no se administra después. La dexametasona se utilizó a una dosis de 4 a 40 ng/ml, la ciclosporina de 50 a 200 ng/ml y la azatioprina de 5 a 10 μ g/ml. Algunos cultivos recibieron cicloheximida que fue añadida a razón de 15 μ g/ml, media hora antes que la PHA. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y almacenaron hasta su uso posterior en tubos de polipropileno a -20°C. La recogida celular para extracción de RNA se llevó a cabo con ayuda de raspadores celulares, con el fin de despegar las células adheridas al frasco durante el cultivo y así no realizar ningún tipo de selección sobre la población celular.

Después de los diferentes cultivos, se extrajo el RNA total de las células utilizando un método modificado de las técnicas tradicionales basadas en el uso del isotiocianato de guanidina y se cuantificó por espectrofotometría.

El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA total, en un volumen de 10 µl de buffer 1xHRT que contenía los 4 dNTP a una concentración de 250 µM cada uno, 100 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney, 10 U de RNasín, 5mM ditiotreitól y 20 ng del cebador 3' para TGFβ₁ o 100 ng del cebador 3' para β-actina (ver más abajo). Se incubó a 37°C durante 60 minutos para que se verificase la transcripción inversa, y posteriormente a 95°C 5 minutos para inactivar la enzima.

En la PCR se ha utilizado la β-actina como control: puesto que su expresión no se afecta ni con dexametasona, ni con ciclosporina (aunque no hemos encontrado datos para la azatioprina), nos servirá en la tercera parte del trabajo para corregir errores de carga de las muestras. Sin embargo, no podremos utilizarla con esta finalidad en los estudios cinéticos, dado que su expresión se estimula con la activación celular. Ello no impedirá que también aquí la utilicemos como control, ya que como su cinética de expresión está bien documentada en la literatura, el hecho de que se reproduzca en nuestras manos corrobora de alguna manera los resultados que obtengamos para el TGFβ₁.

El PCR (Dualcyclus Linus, Linus; Cultek, Madrid) se realizó en un volumen total de 50 µl. Después de finalizada la TI, a los 10 µl de cada tubo se les añadió 40µl de buffer de polimerasa Taq 1x que contenía 250 µM de cada dNTP, 40 ng del cebador 5' y 20 ng del cebador 3' para TGFβ₁ ó 200 ng del 5' y 100 ng del 30 para β-actina, y 2 U de polimerasa Taq. Se cubrió con aceite mineral y se sometió a 25 ciclos de amplificación a 94°C 1 minuto, 57°C 1 minuto y 72°C 1 minuto para el TGFβ₁, y a 22 ciclos de 94°C 1 minuto 56°C 1 minuto y 72°C 2 minutos para la β-actina. En estas condiciones, el PCR tiene valor semicuantitativo en cada muestra, tanto para el TGFβ₁ como para la β-actina, siendo proporcional el

producto amplificado a la cantidad inicial de cDNA, lo cual ocurre solamente en el tramo lineal de la curva exponencial que describe la amplificación, perdiéndose al alcanzar la meseta. Previamente se habían asegurado las condiciones que permitirían permanecer en la fase lineal, al someter diferentes cantidades de RNA total a distinto número de ciclos de amplificación. Los cebadores utilizados para amplificar TGFβ₁ fueron diseñados de manera que no amplificasen TGFβ₂, basándose en las secuencias publicadas para el cDNA de ambos factores: TGGTGGAAACCCACAACG AA (residuos 1179-1198 de la hebra sentido del cDNA) y GGCCATGAGAAGCAGGA A (residuos 1611-1630 de la hebra antisentido del cDNA), amplificando por tanto un fragmento de 452 pares de bases. Analizando la secuencia del DNA genómico de TGFβ₁¹⁰ se pueden observar dos hechos. Primero, que estos cebadores reconocen secuencias localizadas en diferentes exones, lo que asegura la posibilidad de distinguir por tamaño el fragmento amplificado a partir del cDNA del amplificado a partir de DNA genómico. Y segundo, que estos mismos cebadores reconocen un fragmento localizado en el corazón de la región que se traduce, lo que garantiza la detección de los diversos transcritos de TGFβ₁, ya que éstos se diferencian entre sí por su región 5' no traducida.

La secuencia de los cebadores para la β-actina se obtuvo de la bibliografía: TCCT ACAATGAGCTGCCGTGTG (residuos 1319-1338 de la hebra sentido del DNA genómico y GGTGAGGATCTTCATGAGGT (residuos 2054-2073 de la hebra antisentido), que amplifican un fragmento de 314 pb. Como se puede observar, también estos cebadores se alinean a secuencias presentes en diferentes exones, lo que nos permitirá en el PCR distinguir cDNA de DNA genómico.

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis horizontal de agarosa por tinción con bromuro de etidio identificándose por tamaño, en relación con un marcador comercial de peso molecular.

Los geles teñidos con bromuro de etidio se visualizaron con luz UV en transilu-

minador, analizándose posteriormente por densitometría con el UVP Gel Documentation System (Software Package SW2000).

La especificidad del PCR para TGF β ₁ se confirmó por digestión del producto amplificado con dos enzimas de restricción, Hae II y Hinf I, teóricamente adecuadas para la secuencia del TGF β ₁ supuestamente amplificada.

Antes de la realización de los bioensayos, para cuantificar el TGF β ₁ se acidificaron transitoriamente los sobrenadantes para activar el TGF β latente. Se realizaron tres bioensayos: ensayo de inhibición de la proliferación de CMN dependiente de IL-2, ensayo de estimulación del crecimiento de células Swiss-3T3 y ensayo de inhibición del crecimiento de células Mv1Lu. Con objeto de comprobar la especificidad de los tres bioensayos anteriormente descritos, 50 μ l de cada muestra fueron incubados con 8,75 μ g de anti-TGF β durante 2 horas a 22°C, y posteriormente fueron añadidos a las 3 dianas celulares.

Se utilizó un radioinmunoensayo comercial (Du Pont, Boston, USA), previa acidificación transitoria de las muestras según se ha descrito anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Influencia de la contaminación plaquetar en CMN obtenidas por Ficoll sobre el estudio de la producción de TGF β ₁ linfocitado

En la población linfomononuclear de 6 controles sanos obtenida por el procedimiento estándar de separación sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Paque, hemos cuantificado las plaquetas presentes estableciendo la relación plaquetas/CMN en cada caso. Los resultados demuestran que la relación plaquetas/CMN, que en sangre periférica es aproximadamente de 140, desciende a 17 cuando se analiza la población mononuclear purificada.

Para eliminar en lo posible las plaquetas todavía presentes en la población linfomononuclear, hemos comparado en los 6 casos anteriores dos técnicas diferentes detalladas en material y métodos. Los

resultados son muy similares por lo que respecta a la relación plaqueta/CMN: con el gradiente de STF conseguimos una relación media plaqueta/CMN de 1,89, mientras que con el Percoll fue de 2,04. Sin embargo, en lo referente a la recuperación en términos totales de CMN, el STF se mostró superior, recuperando de un 24 a un 30% más células mononucleares que el Percoll. Por esta razón decidimos utilizar la técnica del STF para el resto del trabajo, además del hecho de que su manejo es más cómodo que el del Percoll, para el que hay que ser muy cuidadoso en términos de osmolaridad y densidad a la hora de preparar los gradientes. Por otra parte, el STF es totalmente inocuo para las células, mientras que el Percoll no deja de ser un producto artificial a pesar de que su ausencia de toxicidad esté probada.

En 12 controles sanos se compararon los niveles de TGF β en sobrenadantes de cultivo de CMN activadas, aisladas en condiciones estándar, frente a CMN activadas significativamente libres de plaquetas. Centrándonos en las diferencias observadas en función de la presencia o ausencia de plaquetas, resulta evidente que los resultados varían dependiendo del bioensayo:

Ensayo de inhibición de la proliferación de CMN dependiente de IL-2

Ocho casos presentan niveles más elevados de TGF β en los sobrenadantes de cultivo de CMN contaminadas con plaquetas (Media = 153 U) frente a los sobrenadantes de cultivos libres de plaquetas (Media = 82,5 U).

En tres casos, la presencia de plaquetas en los cultivos no afectó a los niveles de TGF β detectados en los sobrenadantes, y en un caso se detectó paradójicamente más TGF β en ausencia de plaquetas que en su presencia.

Ensayo de proliferación de células Swiss 3T3

En los cinco casos analizados, los niveles de TGF β fueron más altos en las muestras procedentes de cultivos contaminados con plaquetas (Media = 378,8 U, frente a 176,8 U en ausencia de plaquetas).

Ensayo de inhibición de la proliferación de las células Mv1Lu

En los siete casos analizados, los niveles de TGF β eran paradójicamente mucho más altos en ausencia de plaquetas (Media = 1406,28 U) que en su presencia (Media = 553,71 U). En cada uno de los siete casos, la curva obtenida en presencia de plaquetas se encontraba desplazada hacia la zona de las diluciones más bajas, en relación con la curva obtenida en ausencia de plaquetas, lo que sugiere la presencia simultánea al TGF β de otro factor de efecto opuesto sobre las células Mv1Lu. Así, las curvas obtenidas en presencia de plaquetas serían el resultado de la dilución simultánea de dos actividades de efecto opuesto sobre la mitogénesis de las células Mv1Lu. Efectivamente, la incubación con anti-TGF β puso de manifiesto la actividad mitogénica a la que nos estamos refiriendo en las muestras procedentes de cultivos contaminados con plaquetas.

Finalmente, hay que hacer notar que existe una correlación significativa entre los niveles de TGF β detectados en el ensayo de inhibición del crecimiento de CMN por IL-2 y cada uno de los otros dos bioensayos ($r = 0,90$, $p < 0,05$ para el de las células Swis 3T3; $r = 0,94$, $p < 0,05$ para el de las Mv1Lu), pero solamente para las muestras procedentes de cultivos libres de plaquetas.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, resulta evidente que la presencia de plaquetas afecta a la cuantificación del TGF β linfocitario, por lo que para el resto del trabajo sólo utilizaremos CMN significativamente libres de plaquetas.

2. Cinética de expresión y producción de TGF β_1 por CMN estimuladas con PHA

Cinética de expresión de RNAm de TGF β_1 en CMN estimuladas con PHA

Se cultivaron CMN de donantes sanos con PHA, en condiciones libres de suero y plaquetas durante 96 horas, extrayendo a intervalos regulares su RNA celular total para estudio de la expresión de TGF β_1 por PCR. Encontramos en primer lugar que su expresión es constitutiva en CMN. En segundo lugar, observamos que los niveles de RNAm detectados en condiciones basales empiezan a aumentar tras sólo 2 horas

de estimulación con PHA, alcanzando valores máximos al cabo de 48 horas de actividad celular para descender progresivamente después. Estos datos se repitieron en los cinco controles sanos estudiados, salvo que en uno de ellos el valor máximo se alcanzó a las 72 horas de cultivo, en vez de a las 48 horas. Por tanto, y a la luz de los datos anteriores, los estudios de la modulación del TGF β_1 por fármacos inmunosupresores, que conformarán la tercera parte de este estudio, serán realizados en cultivos de 48 horas de duración.

Efecto de la cicloheximida sobre la expresión de TGF β_1 inducida por PHA en CMN

Al inicio del cultivo de las CMN con PHA se añadió CHX, un inhibidor de la síntesis proteica, a razón de 15 μ g/ml. Al cabo de 48 horas de cultivo, se extrajo el RNA, observando que la inducción de la expresión de TGF β_1 debida a la PHA no se había producido, detectándose únicamente los niveles de RNAm que expresan las células en condiciones basales.

Cinética de producción de TGF β_1 por CMN estimuladas con PHA

Se realizaron cultivos de CMN estimuladas con PHA de 6 horas de duración, también en condiciones libres de plaquetas y suero, obteniéndose a intervalos regulares el sobrenadante para cuantificar su contenido en TGF β_1 por medio de un RIA comercial. Además de observar nuevamente una considerable variación en los niveles producidos por los diferentes donantes, se advierte para cada caso que la tasa de liberación de TGF β_1 aumenta progresivamente con el tiempo de actividad celular, alcanzándose niveles máximos al cabo de 6 días de estimulación.

Por tanto, el estudio de la producción de TGF β_1 linfocitario requiere la realización de cultivos prolongados, de al menos varios días de duración. Así, en la tercera parte de este trabajo realizaremos cultivos de 96 a 120 horas de duración, por considerarlo un tiempo suficiente para que se produzcan niveles de TGF β_1 perfectamente detectables, a la luz de los datos obtenidos.

3. Modulación de la expresión y producción de TGF β linfocitario por fármacos inmunosupresores

Se cultivaron CMN de 10 donantes sanos con PHA en presencia de dexametasona, ciclosporina o azatioprina, en condiciones que incluían la ausencia de plaquetas y de suero. Tras 48 h de cultivo, se extrajo el RNA celular total y se analizó la expresión de RNAm de TGF β por PCR. La cuantificación de los niveles de TGF β proteico en los sobrenadantes se llevó a cabo por radioinmunoensayo, tras 120 a 140 horas de cultivo.

Se observa que la dexametasona inhibe la producción de TGF β de un 20 a un 50%, en ocho de nueve casos analizados, efecto que puede considerarse como estadísticamente significativo ($p = 0,008$). Tales cambios se manifiestan paralelamente a nivel del RNAm, aunque con menor intensidad (inhibición del 10 al 20%, también estadísticamente significativa: $p = 0,02$). Esta regla general cuenta con dos excepciones: por una parte, el caso 6 sufre inhibición del 17% en la liberación de la proteína pero no en la expresión del RNAm. Por otra parte, el caso 2 no se ve afectado por la dexametasona en ninguno de los dos procesos analizados, quizá debido a resistencia individual a la acción del fármaco, posibilidad cuya existencia está documentada en la literatura.

La ciclosporina inhibe también la liberación de TGF β al sobrenadante de cultivo en 9 de los 10 casos analizados, en un 20 a un 45% ($p = 0,005$). Nuevamente se producen en general cambios paralelos pero de menor intensidad en el RNAm (inhibición del 15 al 25%), siendo la p de 0,03. Sin embargo, los casos 4 y 7, aun respondiendo a la ciclosporina con una inhibición en la liberación de TGF β del 25 y del 40%, respectivamente, no presentan ningún cambio en la expresión del RNAm. Finalmente, el caso 6 no manifiesta ninguna variación ni en los niveles de proteína ni en los de RNAm, lo que nuevamente podría deberse a resistencia individual a la acción del fármaco.

Por último, la azatioprina inhibe de un 15 a un 45% la producción de TGF β en los

diez casos analizados, con una p de 0,005, no ejerciendo ningún efecto en absoluto sobre la expresión del RNAm en ninguno de los casos.

En resumen, los 3 fármacos inhiben la producción de TGF β por CMN estimuladas por PHA. Sólo la dexametasona y la ciclosporina son capaces de inhibir la expresión del RNAm, efecto que ejercen con menor intensidad que el de inhibición de la liberación de la proteína.

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. La eliminación de las plaquetas contaminantes de los cultivos de CMN es esencial cuando se desea analizar la producción de TGF β de origen linfocitario.
2. La expresión del gen de TGF β en cultivos de CMN libres de plaquetas es, por una parte, constitutiva, y por otra, se estimula tras la activación celular con una cinética que podríamos calificar como tardía, y que se sigue, tras un cierto retraso, de la liberación del TGF β proteico al sobrenadante de cultivo.
3. Los fármacos inmunosupresores, dexametasona y ciclosporina, inhiben la expresión y producción de TGF β en CMN activadas, mientras que la azatioprina inhibe únicamente la liberación de la proteína.

BIBLIOGRAFÍA

1. SPORN MB, ROBERTS AB. Transforming growth factor- β . Multiple actions and potential clinical implications. *JAMA* 1989; 262: 938-941.
2. ZHOU Y, SCAMURRA R, MOLITOR TW, MURTAUGH MP. Characterization of transforming growth factor- β gene expression in porcine immune cells. *Mol Immunol* 1992; 29: 965-970.
3. LUCAS C, BALD LN, FENDLY BM, MORA-WORMS M, FIGARI IS, PATZER EJ et al. The autocrine production of transforming growth factor- β during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. *J Immunol* 1990; 145: 1415-1422.
4. MARTÍ F, PIÑOL G, RUEDA F. Método para la obtención de células mononucleadas significativamente libres de plaquetas. *Biol Clin Hematol* 1988; 10: 149-153.
5. ASSOIAN RK, SPORN MB. Type β transforming growth factors in human platelets: release

during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1986; 102: 1217-1223.

6. BROEKELMANN TJ, LIMPER AH, COLBY TV, MCDONALD JA. Transforming growth factor β_1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6642-6646.
7. PIERCE GF, MUSTOE TA, LINGELBACH J, MASAKOWSKI VR, GRAMATES P, DEUEL TF. Transforming growth factor β reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2229-2233.
8. LI B, SEHAJPAL PK, KHANNA A, VLASSARA H, CERAMI A, STENZEL KH *et al.* Differential regulation of transforming growth factor β and interleukin 2 genes in human T cells: demonstration by usage of novel competitor DNA constructs in the quantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991; 174: 1259-1262.
9. BECK J, ROWDOT P, JULIEN P, WIETZERBIN J, LAWRENCE DA. TGF- β -like activity produced during regression of exacerbations in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1991; 84: 452-455.
10. DERYNCK R, RHEE L, CHEN EY, VAN TILBURG A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor- β precursor gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3188-3189.