



UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES HUMANES I DE LA NUTRICIÓ
FACULTAT DE FARMÀCIA

**IMMUNOTERÀPIA DE L'ARTRITIS ADJUVANT
AMB ANTICOSSOS MONOCLONALS
ANTILIMFOCÍTICS**

TESI PRESENTADA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORAT:
FISIOPATOLOGIA I PATOLOGIA MOLECULAR
BIENNI 1991-1993

DIRECTORES:
DRA. MARGARIDA CASTELL I ESCUER
DRA. ÀNGELS FRANCH I MASFERRER

TUTOR: DR. MIQUEL MORETÓ I PEDRAGOSA

CARME PELEGRÍ i GABALDÀ

BARCELONA 1995



**UNIVERSITAT DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES HUMANES I DE LA NUTRICIÓ
FACULTAT DE FARMÀCIA**

**IMMUNOTERÀPIA DE L'ARTRITIS ADJUVANT
AMB ANTICOSSOS MONOCLONALS
ANTILIMFOCÍTICS**

TESI PRESENTADA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR EN FARMÀCIA

**PROGRAMA DE DOCTORAT:
FISIOPATOLOGIA I PATOLOGIA MOLECULAR
BIENNI 1991-1993**

**DIRECTORES:
DRA. MARGARIDA CASTELL i ESCUER
DRA. ÀNGELS FRANCH i MASFERRER**

TUTOR: DR. MIQUEL MORETÓ i PEDRAGOSA

CARME PELEGRÍ i GABALDÀ

BARCELONA 1995



Facultat de Farmàcia
Av. Joan XXIII, s/n
08028 Barcelona
Tel. (93) 402 45 05
(93) 402 45 06
Fax (93) 402 18 96

Departament de Ciències Fisiològiques
Humanes i de la Nutrició

MARGARIDA CASTELL ESCUER i ÀNGELS FRANCH MASFERRER,
Professores Titulars de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de
Barcelona,

FAN CONSTAR: que la memòria titulada "Immunoteràpia de l'artritis
adjuvant amb anticossos monoclonals antilinfocítics"
presentada per CARME PELEGRÍ i GABALDÀ per accedir al
grau de Doctora en Farmàcia, ha estat realitzada sota la seva
direcció a la Unitat de Fisiologia i Fisiopatologia de la Facultat
de Farmàcia, i considerant-la conculsa autoritzen la seva
presentació per ser jutjada pel Tribunal corresponent.

I perquè consti i tingui els efectes que corresponguin, signem aquest informe.

Margarida Castell i Escuer

Àngels Franch i Masferrer

Barcelona, 10 de novembre de 1995.

Als meus pares

Al Jordi

M'agradaria explicar-vos, en aquests moments, la història del llibre que teniu entre les mans. I és que en la història d'aquest llibre hi ha molts esdeveniments que voldria fer perdurables.

Per començar, us voldria parlar de com va néixer la il·lusió de realitzar-lo. Va ser a tercer curs de carrera, durant les classes de Fisiologia, i per descomptat, a les pràctiques de laboratori, que és quan un alumne monitor s'adona que voldria estar més hores en aquell indret, posint-se amb rates, sang i aparells...

La Fisiopatologia, a quart, va fer-me acabar de decidir i abans d'arribar al juny ja havia parlat amb la cap del meu grup. Així, el setembre de 1990, m'hi vaig incorporar i a partir d'aquí, es van anar succeint una sèrie d'esdeveniments: la col·laboració en una altra tesina, la reunió a l'auleta on la directora de tesina em va exposar el projecte, un primer i inoblidable viatge a Madrid, la tesina, els cursos de doctorat, les visites a alguns hospitals, l'estada a Alemanya, els congressos, els inaccabables experiments al laboratori, les discussions, les noves idees, l'estadística, les publicacions i la inquietud que ocasionen... Però aquests esdeveniments no haurien estat possibles sense les persones amb qui he tingut el plaer de compartir el protagonisme de la història que explica aquest llibre. Perquè, no us deixeu enganyar, els limfòcits i els anticossos són els protagonistes científics, però l'autèntic protagonisme correspon a les persones que han fet possible la realització d'aquest projecte, o millor dit, d'aquella il·lusió, i a les quals vull expressar el meu agratament més sincer.

A la Dra. Margarida Castell li vull agrair que, després de dirigir la meua tesina, també decidís embarcar-se en aquest projecte i agrair-li com ho ha fet: treballant colze a colze al laboratori quan alguna cosa no anava bé; aportant solucions i idees noves sempre amb rapidesa; animant-me en els moments difícils i, sobretot, per deixar que en tot moment fos jo la primera que intentés fer qualsevol cosa, guiant-me subtilment, però sense coartar la meua iniciativa. Tots aquests fets demostren, a la fi, no només la seva capacitat com a investigadora, sinó, també, la seva gran capacitat docent.

A la Dra. Àngels Franch li vull agrair que acceptés aquesta direcció i, sobretot, la gran quantitat de temps que hi ha dedicat, tot i que de temps, precisament en aquests quatre anys, no li'n sobrava ni una mica. Agrair-li tot el que m'ha ensenyat al laboratori, on ella és una autèntica mestra. Les seves mans, el seu ordre estricte, la seva paciència... feren que res no pogués fallar en aquella "poiana". A part de tot això, voldria parlar de l'amistat que m'ha ofert, els ànims i l'ajut mostrats en els moments difícils i el seu gran entusiasme en tot el que hem anat vivint plegades.

A la Dra. Cristina Castellote, agrair-li que m'acceptés en el meu grup i que, així com em va escoltar aquell primer dia, ho hagi seguit fent sempre. També vull destacar el seu esperit crític, la seva capacitat per solucionar problemes, tan els científics com els personals, i la seva gran visió de futur que, molt sovint, m'ha ajudat a prendre la decisió correcta en el moment precís. A ella i a les dues persones que ja he esmentat, agrair-los l'ambient del grup que és, sense dubte, únic.

Al Dr. Miquel Moretó, tutor del treball, per haver-me orientat i aconsellat en els meus estudis de doctorat.

Al Dr. Josep Queralt, per estar sempre disposat a resoldre qualsevol dubte i pel seu caràcter alegre, sempre contagiós, que tan sovint m'ha fet somriure.

Al Dr. Jordi Vilaplana, pel seu ajut inestimable en l'anàlisi estadística dels resultats i per haver trobat no moments, sinó força hores per dedicar en aquest treball, sempre que l'hem necessitat.

A tots els professors de la Unitat, per la seva acollida i pel seu interès en el desenvolupament de la meua tesi.

To Dr. Raimund Kinne, who accepted me like one more of his group, for having the patience and quality of transmitting knowings all day, for his interest and suggestions in all our results and, above all, for being an excellent boss.

To Prof. Dr. T. Hänig and to Prof. Dr. F. Emmrich, for accepting me in their labs and giving me every facility. To Petra Kühnlein, for teaching me so many different techniques and for our nights of experiments.

To Dr. Ernesta Palombo-Kinne, for making me feel like at home and especially, for her great help in writing the article.

Als membres del Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, perquè de forma totalment desinteressada, han posat els seus mitjans i els seus coneixements als nostre abast. Especialment, al Dr. Ramon Vilella, pel seu mestratge en l'obtenció de monoclonals; al Dr. Antoni Gayà i a la Dra. Odete Viñas, pel seu assessorament; al Dr. Manel Juan, per la seva paciència i el seu ajut amb la "columna"; al Dr. Jordi Yagüe, per deixar-me espai al seu laboratori durant tants dies; i a l'Agustí Miralles, per les nostres xerrades durant les inacabables sessions de proteïna A.

Al Dr. Carles Ciudad i a la Dra. Verònica Noé, per ensenyar-nos els "trucs" dels cultius cel·lulars i per estar sempre disposats a solucionar qualsevol problema.

Al Jaume Comas, per haver processat i analitzat tantes mostres per citometria, per la seva gran disponibilitat i pels seus suggeriments.

Al Francesc Caballero, per ser una persona única i especial i amb qui vaig tenir el plaer de compartir els primers experiments de la tesi.

A la Mònica Carol, perquè ja en l'època de la meua tesina m'havia ofert el seu ajut i ho ha anat fent sempre i per descomptat, pel seu caràcter alegre i sensible, que m'ha consolat i animat en molts moments difícils.

A la Mari Paz Morante a qui mai hauré agraït prou la gran quantitat de temps que ha dedicat a ajudar-me. També per la seva alegria i "salero", que tant sovint m'ha fet oblidar els maldecaps.

A la Marta Rodríguez-Palmero, pel seu caràcter tranquil però alegre, que fa que sigui un plaer treballar amb ella al laboratori, per les nostres xerrades dins i fora de Barcelona i pel seu gran ajut en la darrera etapa de la Tesi.

A la M^a José Ferri, per ser tan divertida i per aquell congrés a Oviedo.

A tots els doctorands i tesinands de la Unitat, per les converses sempre estimulants i tot sovint divertides que hem mantingut als passadissos o a la biblioteca.

A la Merche Rivas, a la Chary González i a la Rosa Ortega, per tot el temps que han dedicat a ajudar-me.

A la Yolanda Portabella, per la seva gran amabilitat i simpatia i, és clar, per la seva eficiència.

A l'Enric Badia, que tot i que ja es troba prou unit a la Immunologia, encara li ha representat, ben segur, un esforç la correcció del text en català de la tesi.

En aquests agraïments no puc deixar d'esmentar a les dues persones que no només m'han ajudat durant el període de la tesi, sinó que ho han fet durant tota la meua vida, els meus pares. A ells, que sempre han anteposat la meua felicitat a la seva i els meus projectes als seus, a ells, que han recolzat amb gran entusiasme i orgull tota la meua carrera i que han viscut directament tots els moments difícils, a ells, el meu agraïment més intransigent.

Als meusavis, per la seva il·lusió en els meus projectes, i sobretot a aquell qui no podrà tenir aquest llibre entre les mans.

I finalment, al Jordi, però no al doctor, sinó a l'altre, per tot el que compartim fora de la Facultat i que, espero, continuarem compartint sempre.

A tots, moltes gràcies.

ÍNDEX

OBJECTIU	1
INTRODUCCIÓ	5
IMMUNOTERÀPIA DE L'ARTRITIS REUMATOIDE	
1. Immunoteràpia amb anticossos	9
1.1. Immunoglobulines per via intravenosa	9
1.2. Anticossos monoclonals	11
1.2.1. AcMo anti-CD4	13
1.2.2. AcMo anti-CD7	18
1.2.3. AcMo anti-CD5	20
1.2.4. AcMo anti-CDw52	21
1.2.5. AcMo anti-TCR	22
1.2.6. AcMo anti-MHC de classe II	23
1.2.7. AcMo anti-ICAM-1 (anti-CD54)	24
2. Immunoteràpia amb citocines i inhibidors de citocines	25
2.1. Factor de necrosi tumoral- α	25
2.2. Interleucina-1	26
2.3. Interleucina-2	27
2.4. Interleucina-6	29
2.5. Interferó- γ	29
3. Vacunació amb limfòcits T	30
4. Irradiació ganglionar total	31
DISSENY EXPERIMENTAL	33
ARTICLES	39
ARTICLE 1	
Resum	43
Article	45
ARTICLE 2	
Resum	57
Article	59

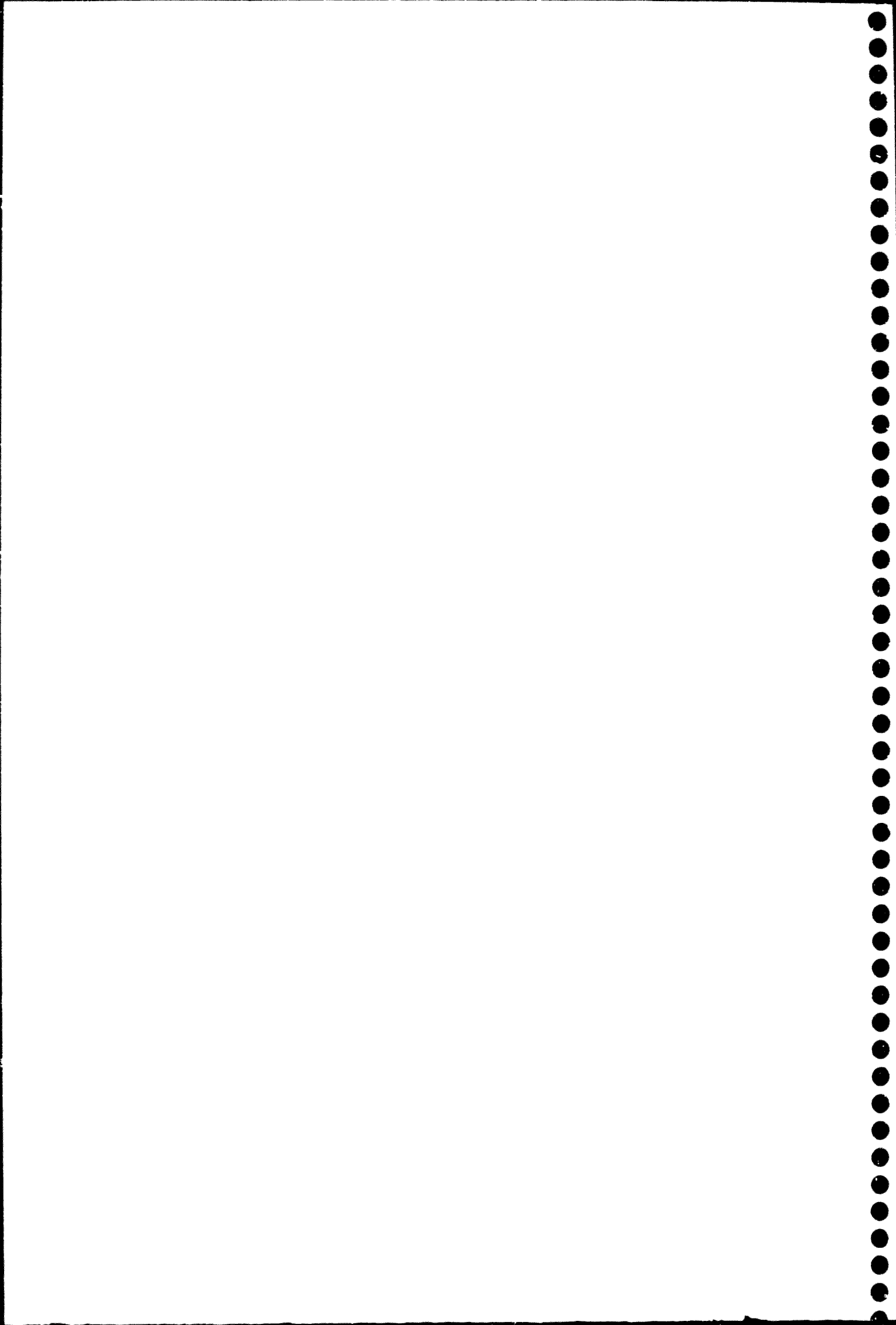
ARTICLE 3	
Resum	83
Article	85
ARTICLE 4	
Resum	95
Article	97
ARTICLE 5	
Resum	105
Article	107
DISCUSSIÓ	113
CONCLUSIONS	121
BIBLIOGRAFIA	127

ABREVIATURES

AA	Artritis adjuvant
AcMo	Anticòs monoclonal
AIC	Artritis induïda per col·lagen
APC	<i>Antigen presenting cell</i> Cèl·lula presentadora d'antigen
AR	Artritis reumatoide
CD	<i>Cluster de diferenciació</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Àcid desoxiribonucleic
FR	Factor reumatoide
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i> Factor estimulator de colònies de macròfags i de granulòcits
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> Antigen leucocític humà
hsp	<i>heat shock protein</i> proteïna d'estrès tèrmic
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> Molècula d'adhesió intercel·lular-1
IFN- γ	Interferó- γ
Ig	Immunoglobulina
IgIV	Immunoglobulines per via intravenosa
IL	Interleucina
IL-1ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i> Antagonista del receptor per a la interleucina-1
IL-2R	<i>Interleukin-2 receptor</i> Receptor per a la interleucina-2
i.v.	intravenosa
LCA	<i>Leucocyte common antigen</i> Antigen comú leucocític
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated antigen-1</i> Antigen de superfície associat a la funció limfocítica-1
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> Complex major d'histocompatibilitat
rIFN- γ	Interferó- γ recombinant
rIL-1ra	<i>Recombinant interleukin-1 receptor antagonist</i> Antagonista del receptor per a la interleucina-1 recombinant
s.c.	subcutània

SCW	<i>Streptococcal cell wall</i> Paret cel·lular d'estreptococ
TCR	<i>T cell receptor</i> Receptor de la cèl·lula T
Th	<i>T helper</i> T col·laborador
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i> Factor de necrosi tumoral- α
V	variable
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> Molècula d'adhesió cel·lular vascular-1
VLA-4	<i>very late antigen-4</i> antigen d'activació molt tardana-4
VSG	Velocitat de sedimentació globular

OBJECTIU



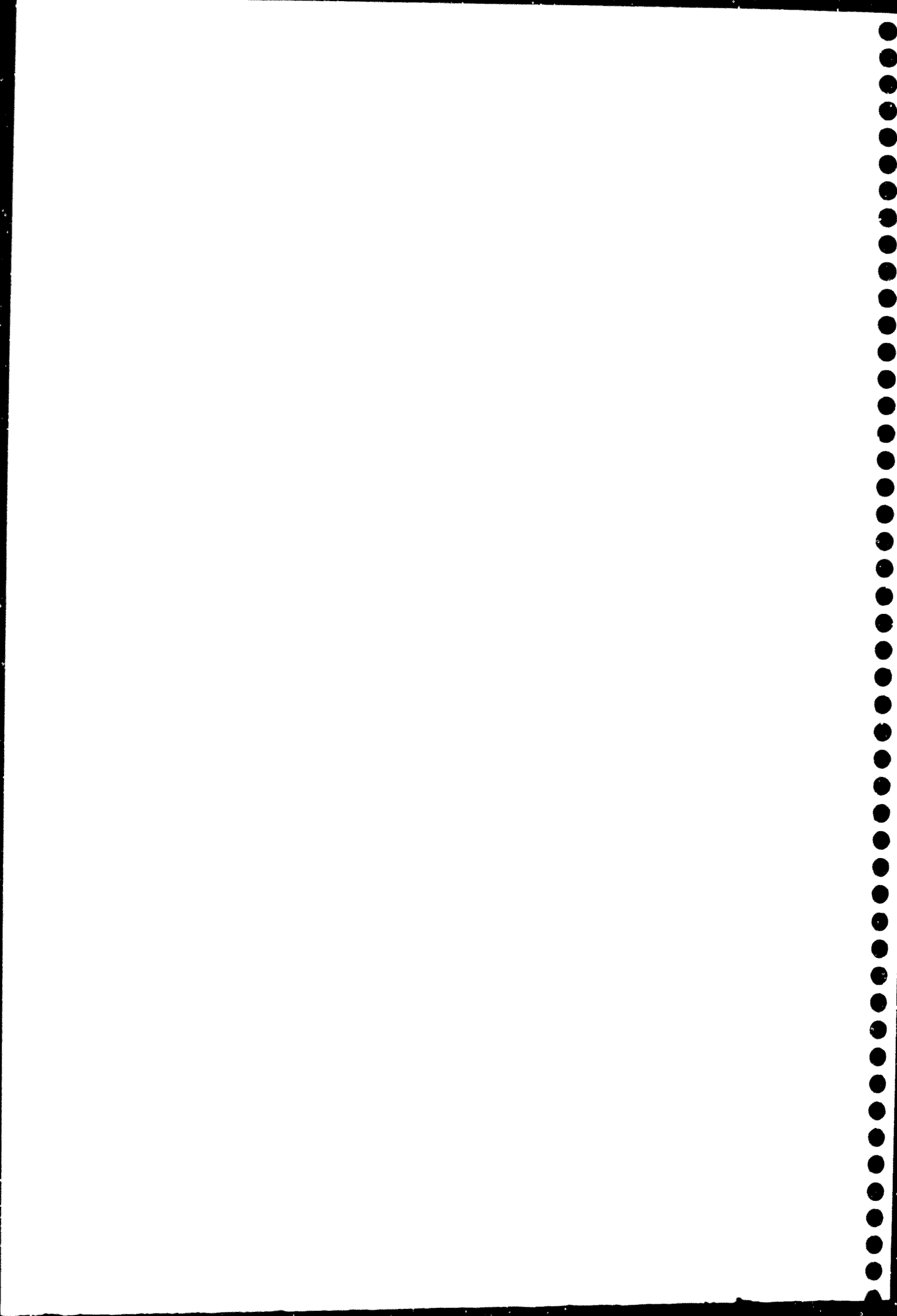
El desenvolupament biotecnològic actual ha permès que àrees com la Immunologia i la Biologia Molecular avanci a un ritme vertiginós i el seu creixement ha estat molt útil per a un major coneixement de ciències com la Fisiologia i per a una millor comprensió de la patogènesi de moltes malalties. Malgrat aquests avenços, avui encara persisteixen malalties cròniques, existents des de fa molts anys, de les quals es desconeix l'etiologia i que presenten una patogènesi amb alguns interrogants, fets que condicionen l'existència d'una terapèutica únicament pal·liativa. L'artritis reumatoide és una d'aquestes malalties; afecta un percentatge elevat de persones adultes i provoca una inflamació crònica a les petites articulacions. Té un curs devastador, fet que comporta grans repercussions socials i laborals. En aquest tipus de malalties resulta essencial disposar de models animals que permetin l'assaig de noves teràpies i que presentin mecanismes patogènics semblants als de la malaltia humana per tal de dissenyar millors estratègies terapèutiques.

L'artritis adjuvant és una patologia induïda en rata que es considera model d'artritis reumatoide humana i que cursa amb inflor, eritema i dolor i impotència funcional de les articulacions dels animals afectats.

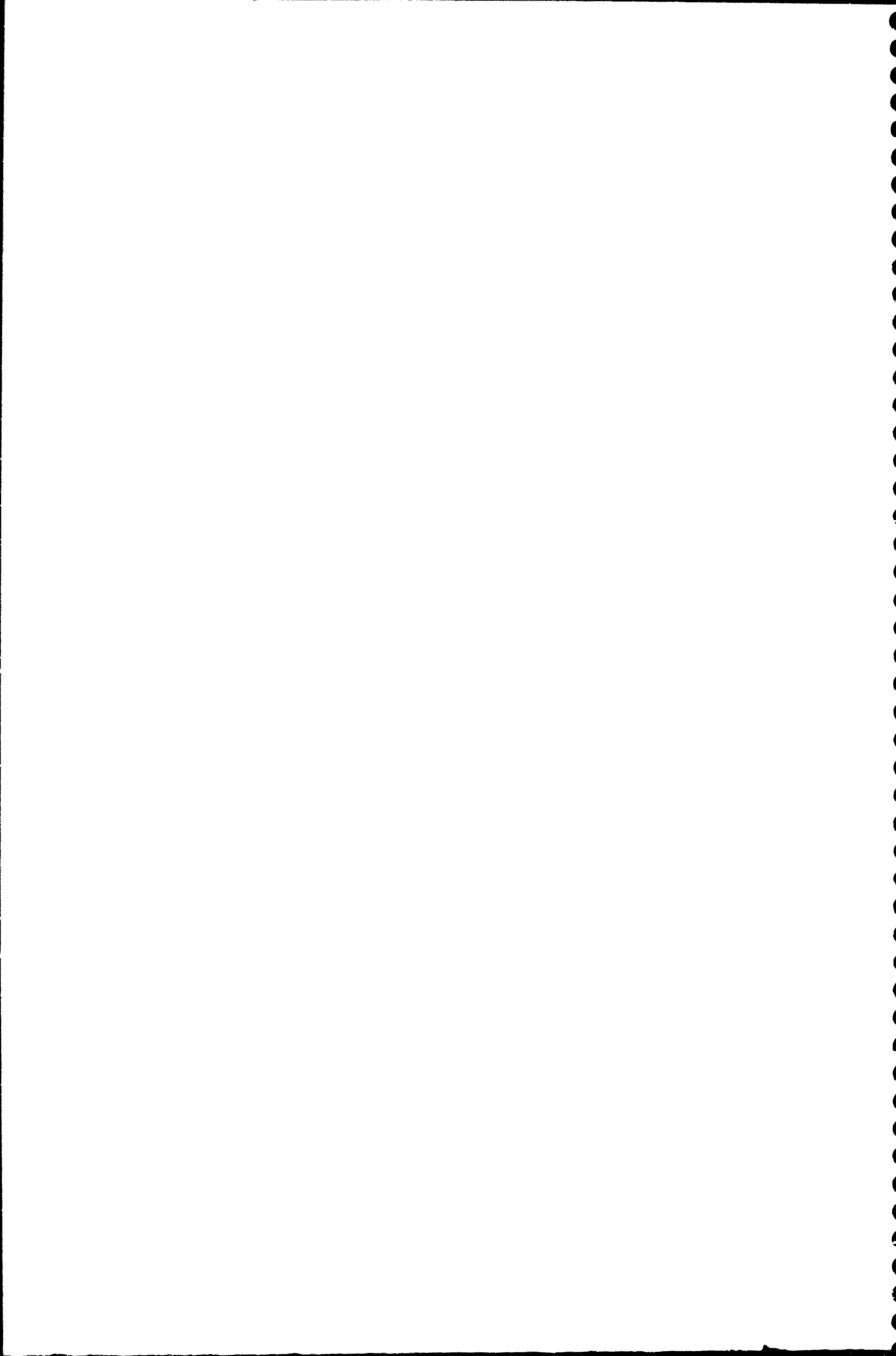
El primer objectiu plantejat en aquest estudi va ser esbrinar, amb l'ajut de marcadors específics, quins tipus cel·lulars són presents en el teixit sinovial en diferents fases de l'artritis adjuvant. El seu coneixement permetria determinar quines cèl·lules, a través de la seva infiltració o proliferació, són potencialment causants de la sinovitis. D'aquesta manera, quedarien definides les poblacions cel·lulars susceptibles de ser utilitzades com a diana en estratègies d'immunoteràpia.

Un segon objectiu d'aquest estudi va ser de tipus metodològic i va consistir en la selecció de la millor tècnica d'aïllament de limfòcits de sang perifèrica, vàlida i aplicable per a la caracterització fenotípica d'aquestes cèl·lules. Aquesta tècnica era necessària per avaluar els efectes a nivell cel·lular dels anticossos monoclonals dirigits contra determinants antigènics de la superfície de limfòcits.

El principal objectiu de la tesi va consistir en la determinació del paper adoptat per diferents subpoblacions de limfòcits tant en la fase de desenvolupament com en la fase de cronificació de l'artritis adjuvant. Aquest estudi, realitzat mitjançant una sèrie de protocols d'immunoteràpia preventiva o curativa amb diferents anticossos monoclonals, ha permès conèixer més profundament la patogènesi de l'artritis adjuvant i, d'altra banda, establir algunes indicacions en l'estudi de les noves estratègies terapèutiques dirigides a revertir el procés artrític.



INTRODUCCIÓ



IMMUNOTERÀPIA DE L'ARTRITIS REUMATOIDE

L'artritis reumatoide (AR) és una malaltia autoimmunitària d'etiologia desconeguda si bé està associada a factors genètics, hormonals, infecciosos i ambientals. Aquesta patologia crònica cursa amb proliferació de les cèl·lules de la membrana sinovial i infiltració de cèl·lules inflamatòries. El teixit inflamat o *pannus* s'expandeix cap a la cavitat articular, erosiona el cartílag i l'os i pot arribar a la destrucció de les articulacions (Harris, 1990). En sèrum i en líquid sinovial de malalts amb AR s'han trobat autoanticossos, com l'anomenat factor reumatoide (FR) dirigit contra la immunoglobulina G (IgG) (Zvaifler, 1973). Sembla ser que la membrana sinovial és el principal lloc de síntesi de FR (Smily i col., 1968; Sliwinski i Zvaifler, 1970; Wernick i col., 1985) i que els immunocomplexos formats per FR en el líquid sinovial intervien en la infiltració cel·lular de l'articulació mitjançant l'activació del sistema de complement i la formació de substàncies quimiotàctiques i vasoactives (Munthe i Natvig, 1971; Sabharwal i col., 1982).

D'altra banda, avui està clar la implicació de les respostes immunitàries mitjançades per limfòcits T en la patogènesi de l'AR. Així, s'ha demostrat la influència dels gens del complex major d'histocompatibilitat (MHC) en la susceptibilitat a patir la malaltia (Stastny i col., 1983), la presència de limfòcits en la membrana sinovial de malalts amb AR (Duke i col., 1982) i l'eficàcia de diferents teràpies dirigides contra els limfòcits T, com són el drenatge del conducte toràcic (Paulus i col., 1977), l'administració de la ciclosporina A (Weinblatt i col., 1986) i d'altres que esmentarem amb més detall a continuació.

A la Figura 1 es representen els mecanismes cel·lulars proposats en la patogènesi de l'AR. La iniciació de la resposta immunitària cel·lular i humoral requereix el reconeixement per part del limfòcit T CD4⁺ o col·laborador de l'antigen processat, complexat i presentat en la superfície de la cèl·lula presentadora d'antigen (APC, conjuntament amb el MHC de classe II. Aquest complex és reconegut pel receptor de la cèl·lula T per a l'antigen (TCR). La molècula accessòria CD4, que s'uneix a un segment molt conservat del MHC de classe II de la superfície cel·lular, afavoreix aquesta interacció.

L'activació dels limfòcits T col·laboradors està modulada per citocines immunoreguladores com la interleucina-1 (IL-1), la IL-2, la IL-4, la IL-6, el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α), el factor estimulador de colònies de macròfags i de granulòcits (GM-CSF) i l'interferó- γ (IFN- γ). Probablement algunes d'aquestes citocines també contribueixen directament a la inflamació de l'articulació. A més a més, algunes citocines, com l'IFN- γ , el TNF- α i la IL-1, poden induir l'expressió a l'endoteli de molècules d'adhesió com la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1) que augmenta l'adherència de neutròfils, monòcits i limfòcits a cèl·lules endotelials mitjançant l'antigen de superfície associat a la funció limfocítica-1 (LFA-1). La inducció d'ICAM-1 en cèl·lules endotelials promou la transmigració d'aquestes cèl·lules cap als teixits.

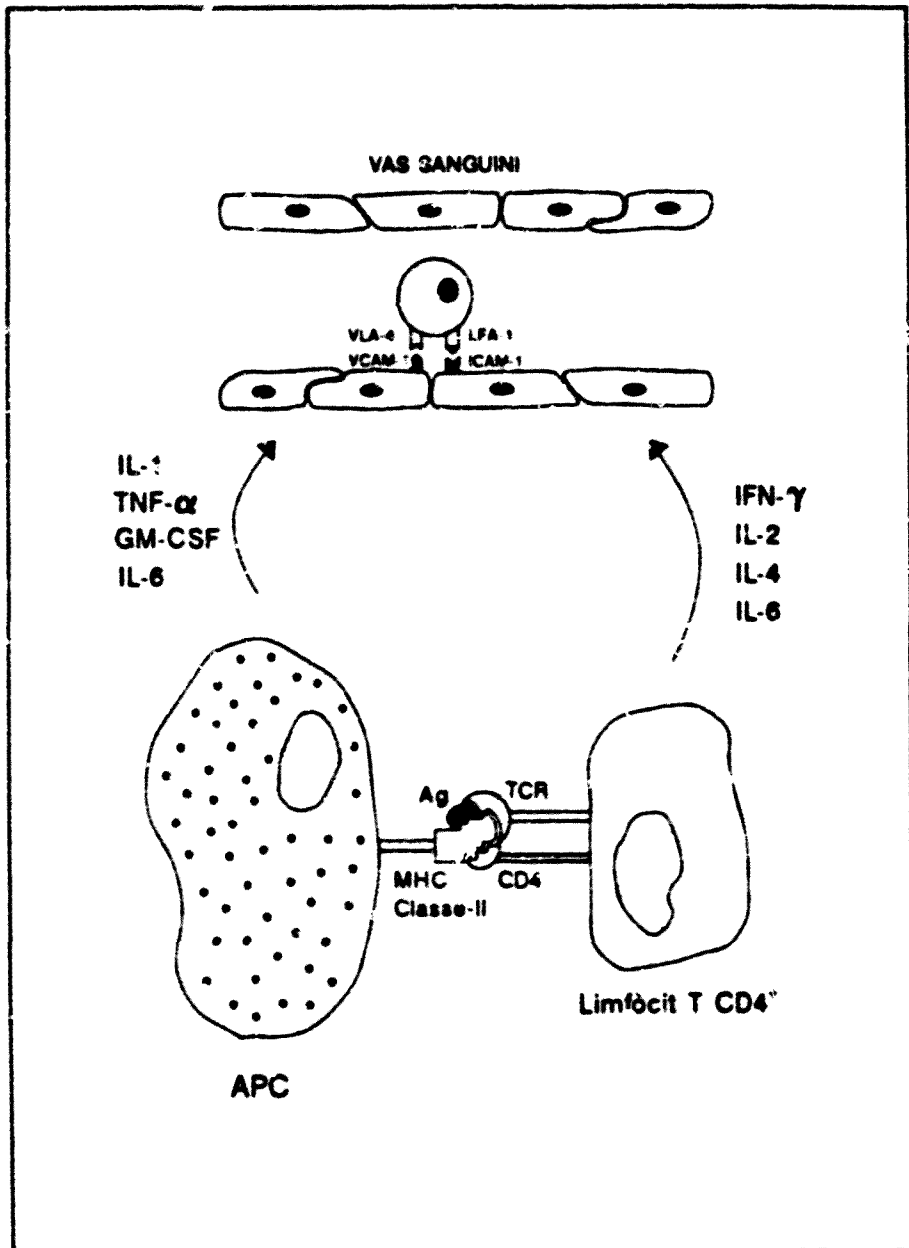


Figura 1. Mecanismes cel·lulars implicats en la patogènesi de l'AR (modificada de Moreland i col., 1993a).

Avui encara no s'ha trobat un tractament eficaç per al guariment dels pacients amb AR. Els tractaments convencionals de primera elecció, com els antiinflamatoris no esteroïdals, milloren alguns signes i símptomes de la malaltia, però no impedeixen la seva progressió. Els fàrmacs de segona elecció, com les sals d'or, la penicil·lamina, el metotrexat, la hidroxicloroquina o els corticosteroides, també proporcionen millores a alguns pacients amb AR, però presenten efectes secundaris seriosos sobre el sistema immunitari (Gittoes, 1994). D'altra banda, s'han assajat terapèutiques dirigides específicament contra els limfòcits T, com la ciclosporina A. Últimament, amb l'ajut de la Biologia Molecular, s'estan desenvolupant agents més selectius dirigits a bloquejar l'efecte de les cèl·lules més involucrades en la patogènesi de la malaltia, sense interaccionar amb la immunitat global de l'individu. A continuació, es detallen els últims estudis que s'han realitzat en el camp de la immunoteràpia de l'AR i en els seus models experimentals.

1. IMMUNOTERÀPIA AMB ANTICOSSOS

1.1. IMMUNOGLOBULINES PER VIA INTRAVENOSA (IgIV)

Les IgIV a dosis elevades s'han utilitzat en el tractament d'immunodeficiències primàries i també com a tractament profilàctic d'infeccions. Els anys 1981 i 1985, Imbach i col. van descriure els efectes positius d'aquest tipus de teràpia en pacients amb púrpura trombocitopènica idiopàtica i el 1986 es va demostrar l'eficàcia d'aquest tractament en la malaltia de Kawasaki (Newburger i col., 1986). Tot i que encara no es coneix completament el mecanisme d'acció d'aquest tipus de teràpia i que no existeixen suficients estudis a doblec cec comparats amb placebo, s'ha indicat l'ús de les IgIV en diverses immunopatologies a causa de la seva potent activitat immunomoduladora (Dwyer, 1992).

Les IgIV s'obtenen a partir de barreges d'un nombre elevat de plasmes de donants sans i, per tant, contenen anticossos dirigits contra antígens externs, contra autoantígens (autoanticossos naturals) i contra Ig (anticossos antiidiotip) (Ronda i col., 1993; Ruiz de Souza i col., 1993). Les IgIV estan constituïdes per més d'un 95% d'IgG, amb un repartiment de subclasses proporcional al que es troba en un sèrum normal, i també per petites quantitats d'IgA i d'IgM (Sany, 1994).

S'ha estudiat l'efecte de les IgIV en models experimentals d'artritis. A la dosi de 0,4 g/kg s'ha aconseguit inhibir la inducció de l'artritis adjuvant (AA) en rata (Achiron i col., 1994). Aquest tipus de teràpia va produir una davallada en la producció de TNF- α , mentre que no va modificar la reactivitat dels limfòcits T enfront d'antígens específics. Per això, els autors postulen que el tractament amb IgIV no actua inhibint el reconeixement dels antígens propis per part dels limfòcits T, sinó que inhibeix les conseqüències biològiques d'aquest reconeixement.

L'elevat cost del tractament amb IgIV justifica el fet que el nombre d'estudis realitzats en l'AR sigui encara reduït. En general, els estudis existents demostren la millora de l'estat clínic dels pacients i també l'activitat immunomoduladora de les IgIV (Combe i col., 1985; Becker i col., 1989; Tumati i col., 1990). L'any 1992, Tumati i col. van confirmar els efectes positius del tractament amb IgIV i van demostrar que l'eficàcia en la reducció dels signes i dels símptomes inflamatoris de l'AR es correlacionava amb un increment significatiu de la població CD4⁺CD45RA⁺, és a dir, dels limfòcits T verges. Cal assenyalar que en malalts amb AR s'ha trobat una reducció en el nombre d'aquesta població cel·lular en sang perifèrica i en líquid sinovial (Emery i col., 1987; Pitzalis i col., 1987). D'altra banda, però, un estudi a doble-cec de pacients amb AR incipient mostra que la teràpia amb IgIV va ser tan efectiva com les infusions de placebo (Emery i col., 1993).

Pel que fa al mecanisme d'acció de les IgIV, la pèrdua d'eficàcia observada uns mesos després de finalitzar el tractament sembla indicar que les IgIV no actuen modificant la malaltia pròpiament, sinó que presenten efectes antiinflamatoris (Tumati i col., 1992). S'ha proposat que els efectes de les IgIV poden ser el resultat del bloqueig de cèl·lules del sistema retículo-endoel·lial (Kimberly i col., 1984), d'interferències amb la formació dels immunocomplexos (Kurlander i Hall, 1986), de la disminució de l'activació de monòcits i macròfags (Mannhalter i col., 1987) o de la possible modulació de la síntesi i/o de l'alliberament de citocines proinflamàtoies i immunoreguladores (Shimozato i col., 1991). D'altra banda, les γ -globulines administrades són una font d'anticossos anti-idiotip, els quals poden regular la resposta immunitària tant a nivell de limfòcits B com de limfòcits T (Tankesterley i col., 1988; Kaveri i col., 1991). També s'ha postulat un efecte inhibidor sobre la producció d'Ig modificant la població de limfòcits T o augmentant l'activitat T supressora (Tsubakio i col., 1983; Stohl i Mayer, 1987).

D'altra banda, el fet que dones amb AR presentin millores notables durant l'embaràs i que empitjorin novament després del part ha portat a la hipòtesi del possible paper immunomodulador de les Ig de placenta. Aquestes Ig s'obtenen per elució a pH àcid a partir de barreges de teixit placentari humà. Contenen un 98-99% d'IgG i petites quantitats d'IgA (Sany, 1994). Al 1982, es va realitzar un tractament de pacients amb AR greu amb Ig de placenta i una setmana després d'iniciar el tractament es van observar resultats positius en un 62% dels pacients tractats (Sany i col., 1982). El mecanisme d'acció de les Ig de placenta tampoc no es coneix, tot i que s'ha postulat que els seus efectes poden ser mitjançats per al·loanticossos poliespecífics contra l'antigen leucocític humà (HLA) de classe II (Moynier i col., 1987).

1.2. ANTICOSSOS MONOCLONALS (AcMo)

El descobriment dels AcMo ha produït un gran impacte en la recerca biomèdica. Els AcMo han permès grans avenços en recerca bàsica, com la identificació de diferents poblacions cel·lulars i de marcadors d'activació cel·lular, que han contribuït a esbrinar els mecanismes implicats en diverses patologies autoimmunitàries. Gràcies als AcMo, s'han caracteritzat moltes molècules de superfície cel·lular que han rebut el nom de *cluster de diferenciació* (CD) seguit d'un número diferent per a cadascuna segons una nomenclatura estandaritzada (Spiegelhalter i Gilks, 1987). A més a més, els AcMo han obert noves perspectives en la teràpia de patologies autoimmunitàries, com l'AR, a causa de la seva potencialitat per modular específicament les vies implicades en la patogènesi d'una malaltia.

Els avantatges dels AcMo sobre els anticossos policlonals, com les IgIV, són obvis. L'ús d'AcMo, que en humans s'administren mitjançant la infusió intravenosa, permet seleccionar prèviament l'especificitat i l'afinitat i, per tant, les quantitats de proteïna administrades són considerablement inferiors i les preparacions d'anticossos més estandaritzades (Kalden, 1994).

Ara bé, la utilització d'AcMo obtinguts majoritàriament en ratolí comporta el desenvolupament d'una resposta anti-rosegador que pot produir toxicitat o fins i tot neutralitzar l'eficàcia de l'AcMo (Villemain i col., 1986). Per aquest motiu, s'han desenvolupat AcMo quimèrics, constituïts per la regió constant d'una Ig humana fusionada amb la regió variable d'un AcMo murí (LoBuglio i col., 1989). També en aquest cas, es va demostrar que els determinants de l'estructura de la regió variable (V) dels AcMo quimèrics encara retenien una immunogenicitat considerable, ja que la resposta anti-V de l'AcMo quimèric era similar a l'obtinguda contra un AcMo totalment xenogènic que portava la mateixa regió V (Brüggemann i col., 1989).

Una segona generació d'AcMo ha portat a l'obtenció d'anticossos humanitzats, formats per un anticòs humà al qual s'ha trasplantat el lloc d'unió a l'antigen de l'AcMo de rosegador (Riechmann i col., 1989). En aquest tipus d'anticossos humanitzats ja no es detecta resposta anti-rosegador (Hale i col., 1988).

A la Figura 2 es mostren algunes de les molècules de superfície presents en els limfòcits T col·laboradors i en les APC, les quals han estat diana en diferents tipus d'immunoteràpia amb AcMo.

L'ús d'AcMo en el tractament de malalts amb AR es troba en fase d'estudi. Els efectes obtinguts fins ara són variables i es detallen a continuació. D'altra banda, l'administració d'AcMo ha comportat, sovint, l'aparició d'efectes secundaris adversos de caràcter inespecífic, com poden ser febre, calfreds o nàusees. En alguns casos s'ha observat l'aparició de miàlgies, cefalees, malestar i hipotensió.

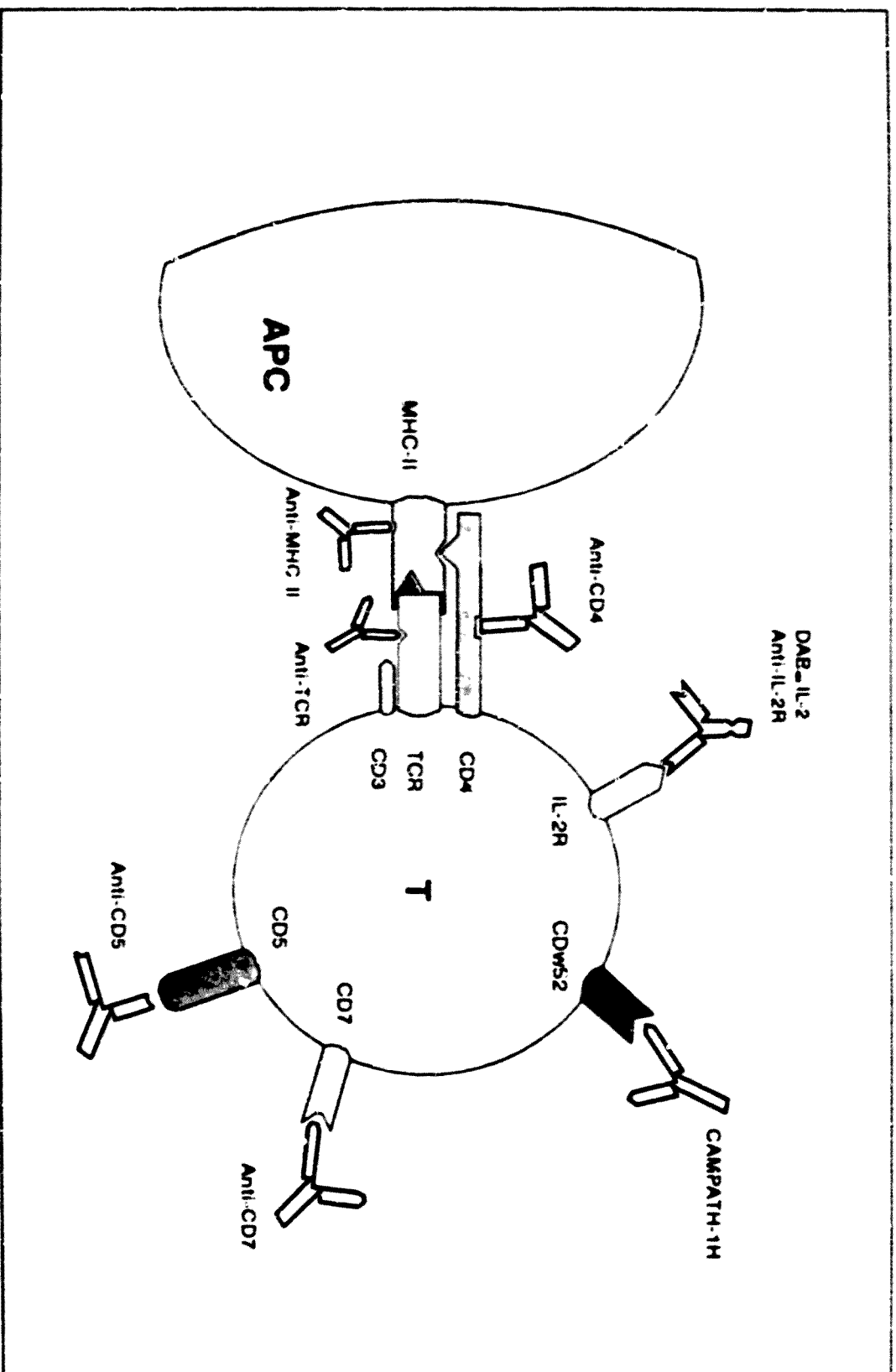


Figura 2. Moléculas de superficie de los APC i dels linfocits T CD4⁺ emprades cun a diara en la immunoteràpia amb AcMo (modificada de Kotelen, 1994).

1.2.1. AcMo anti-CD4

La molècula CD4 és una glicoproteïna de 55 kDa que s'expressa en la membrana plasmàtica dels limfòcits T col·laboradors (Reinherz i Schlossman, 1980) i que també es troba en monòcits, macròfags i granulòcits (Meloche i col., 1992).

Els lligams naturals per al CD4 present en limfòcits són les molècules MHC de classe II de les APC, les quals, a la vegada, també s'uneixen al TCR del limfòcit T (Swain, 1983; Emrich, 1988). Els limfòcits T CD4⁺ només són capaços de reconèixer l'antigen si aquest es troba en associació amb molècules MHC de classe II. El TCR es troba associat a les cadenes polipeptídiques que formen el CD3. Aquestes cadenes tenen residus de tirosina a la regió citoplasmàtica que permeten l'associació amb tirosin-cinases citoplasmàtiques, les quals sembla que estan involucrades en la transmissió del senyal (Malissen i Schmitt-Verhulst, 1993). S'ha demostrat que el contacte físic entre la molècula CD4 i el complex TCR-CD3, mitjançant una molècula MHC de classe II, inicia un fort senyal d'activació per al limfòcit T (Emrich i col., 1987 i 1988). Un possible mediador és la proteïna tirosin-cinasa p56^{lck} que es troba en associació amb la regió citoplasmàtica del CD4 (Rudd i col., 1988; Veillette i col., 1988) (Figura 3).

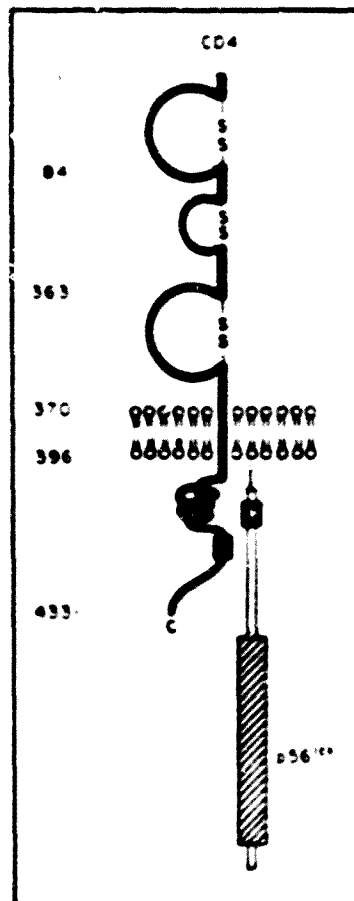


Figura 3. Estructura de la molècula CD4 i interacció amb la p56^{lck} (Rudd i col., 1991).

Quan un AcMo anti-CD4 s'uneix a la molècula CD4, l'anticòs pot impedir l'associació física del CD4 amb el TCR-CD3 (Figura 4). L'AcMo també pot preactivar la p56^{lck} i generar així un estat refractari que impedeixi l'activació del limfòcit T per la via TCR-CD3 (Tsygankov i col., 1994).

L'administració d'un AcMo anti-CD4 també pot generar la deplecció cel·lular (Fig. 4). Aquesta deplecció es pot produir per lisi de les cèl·lules mitjançant el sistema de complement, per citotoxicitat depenent d'anticòs o per apoptosi. D'altra banda, la unió de l'AcMo als antígens de superfície cel·lular pot induir la redistribució o la desaparició de la molècula de superfície corresponent, fenomen conegut com a modulació negativa o *down-regulation* (Boyse i col., 1967) (Fig. 4). Aquest procés, que es pot produir en qüestió de minuts, és antígen-específic i reversible en absència d'anticòs. Després de produir-se la unió amb l'AcMo, alguns antígens de superfície s'internalitzen ràpidament i es degraden, mentre que d'altres romanen intactes associats a la membrana cel·lular (Esmen i Little, 1976).

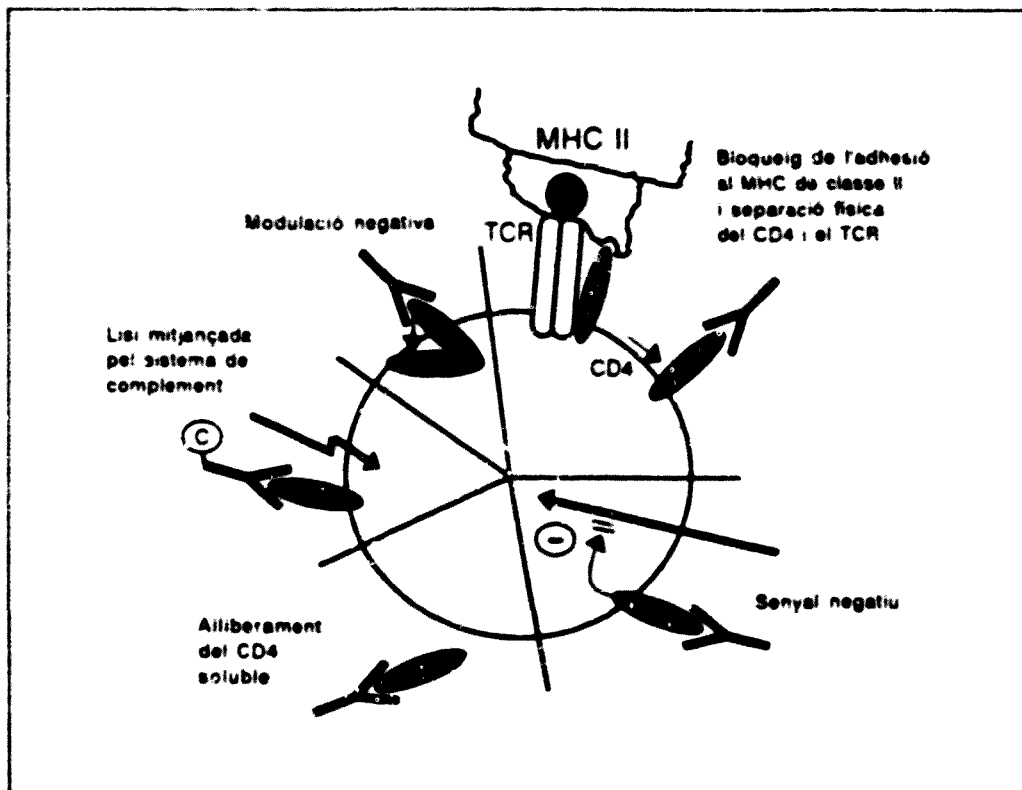


Figura 4. Possibles efectes a nivell cel·lular d'un AcMo anti-CD4 (modificada d'Emmrich i col., 1994).

L'efecte immunosupressor dels AcMo anti-CD4 s'ha demostrat *in vitro*, ja que s'ha vist que inhibeixen la proliferació de limfòcits estimulats amb antígens o mitògens (Gougeon i col., 1985; Carrera i col., 1987). D'altra banda, l'efecte immunosupressor també s'ha confirmat *in vivo* en el lupus eritematós sistèmic i en trasplantaments (Steinman, 1990; Pearson i col., 1992). Estudis en ratolins han demostrat que els AcMo anti-CD4 són capaços de prevenir la inducció de l'artritis induïda per col·lagen (AIC), tot i que són inefectius si s'administren quan la patologia ja està establerta (Ranges i col., 1985; Horn i col., 1988; Williams i col., 1994). El tractament preventiu amb AcMo anti-CD4 també ha estat capaç d'inhibir el desenvolupament de l'artritis induïda per pristà en ratolí (Levitt i col., 1992).

En relació als models d'artritis induïda en rata, s'ha demostrat l'eficàcia d'un AcMo anti-CD4 depleccionant, l'OX35, en la prevenció de l'AA (Billingham i col., 1990). Un altre AcMo anti-CD4 de rata obtingut en ratolí, el W3/25, també ha aconseguit prevenir el desenvolupament de l'artritis induïda per paret cel·lular d'estreptococ (SCW) (Van den Broek i col., 1992).

El primer assaig clínic amb anticossos anti-CD4 en el tractament de l'AR va ser desenvolupat per Herzog i col. al 1987. Un grup de 5 pacients (4 amb AR i 1 amb artritis psoriàtica) va ser tractat amb l'anticòs murí MT151, d'isotip IgG2a, a la dosi de 10 mg/dia durant 7 dies. Els pacients van experimentar una disminució en el nombre d'articulacions inflamades i millora en símptomes clínics, com ara la rigidesa matinal i el dolor. Els autors van observar una deplecció passatgera de limfòcits T circulants, ja que els recomptes tornaven a ser normals 22h després de l'administració.

Posteriorment, el mateix grup va realitzar un tractament de 8 pacients amb artritis (7 amb AR i un amb artritis psoriàtica) utilitzant el mateix AcMo MT151 i un altre AcMo també obtingut en ratolí i del mateix isotip, el VIT4. Després de 7 dies de tractament, a la dosi de 10 mg/dia, tots els pacients van mostrar una millora en els seus símptomes clínics que va durar des de 3 setmanes fins a 5 mesos. Els paràmetres de laboratori no es van modificar ni durant el tractament ni després. També en aquest estudi es va detectar una disminució de limfòcits T, sobretot de la població CD4⁺CDw29⁺, i de monòcits que es van recuperar 20-24h després (Herzog i col., 1989).

Posteriorment, Reiter i col. (1991) també van realitzar un tractament amb l'anticòs anti-CD4 MT151. Un grup de 10 pacients va ser tractat amb la dosi de 20 mg/dia durant 7 dies. La majoria dels pacients va mostrar millores en l'índex de Ritchie, en la rigidesa matinal i en altres símptomes clínics, i en cap cas es van produir efectes indesitjables. Respecte als paràmetres serològics d'inflamació, només els nivells de proteïna C reactiva van disminuir en els pacients que van respondre al tractament. Després de cada infusió, es va produir una deplecció selectiva de limfòcits T CD4⁺ i, a més a més, durant tot el període de tractament es van detectar cèl·lules CD4⁺ amb anticòs unit a la seva superfície.

Goldberg i col. (1991) van tractar 7 pacients amb AR emprant un altre AcMo, també d'isotip IgG2a, el BL4. Després de 10 dies de tractament a dosis de 20 a 40 mg/dia, els símptomes clínics de la malaltia van millorar en un principi, però a partir del dia 60 van desaparèixer quasi tots els efectes positius. Els paràmetres serològics no van ser afectats per la teràpia.

Un altre AcMo murí anti-CD4 d'isotip IgG1, el B-F5, també ha estat provat com a possible teràpia de l'AR. Wendling i col. (1991) van descriure millora clínica en el 100% dels pacients tractats (n=10) que va perdurar de 60 a 120 dies després del tractament. Tot i que els nivells de FR no van variar en aquests pacients, es va produir una disminució significativa de la velocitat de sedimentació globular (VSG), la qual cosa no s'havia trobat a l'administrar AcMo d'isotip IgG2a. Sorprenentment, estudis desenvolupats amb el mateix anticòs en un altre centre van mostrar resultats considerablement diferents als anteriors. En aquest cas, les millores en l'índex de Ritchie només es van veure en 6 dels 10 pacients tractats (Didry i col., 1991).

Un altre AcMo murí capaç de reduir les alteracions serològics dels pacients amb AR, el MAX 16H5, també és d'isotip IgG1. L'AcMo es va administrar a dosi de 0,3 mg/kg/dia durant 7 dies aconseguint una marcada, però transitòria, deplecció dels limfòcits T CD4⁺ i provocant una reducció significativa en els signes clínics en la majoria dels malalts artrítics (Horneff i col., 1991).

Un segon tractament amb el mateix anticòs MAX 16H5, realitzat 6 setmanes després del primer, va produir una deplecció molt marcada dels limfòcits T CD4⁺ que, en un pacient dels 11 tractats, va persistir durant més de 2 anys. No es va detectar cap millora en la simptomatologia clínica d'aquest pacient, tot i que la segona teràpia va reduir la VSG i els nivells de proteïna C reactiva (Horneff i col., 1992). Els mateixos autors van descriure que l'AcMo murí MAX 16H5 no només era capaç de produir deplecció de la subpoblació CD4⁺, sinó que aquesta deplecció anava acompanyada d'una disminució de l'expressió de la molècula CD4 en la superfície cel·lular fins a un 30% de la densitat inicial, una hora després de la infusió, persistint la *down-regulation* durant 28 dies (Horneff i col., 1993a). S'ha suggerit que aquest anticòs també té un efecte sobre l'expressió de la molècula CD4 en monòcits i macròfags i sobre funcions d'aquestes cèl·lules, com la secreció de citocines (Horneff i col., 1993b).

Malgrat l'efectivitat clínica de l'administració d'AcMo anti-CD4 murins, s'han descrit efectes secundaris com febre i calfreds en alguns pacients. Tot i que no s'ha vist una tendència incrementada a infeccions oportunistes, l'experiència encara és limitada. En la majoria dels pacients tractats amb anti-CD4 s'ha desenvolupat una resposta anti-ratolí. Per aquest motiu, els estudis posteriors es van dur a terme utilitzant AcMo quimèrics.

Van der Lubbe i col. (1993) van emprar l'AcMo quimèric cM-T412 per tractar 32 pacients d'AR durant 7 dies a la dosi de 10, 50 o 100 mg/dia. El tractament va produir una disminució important i immediata del nombre de limfòcits CD4⁺ circulants, que va perdurar

durant més de 12 mesos. No es va observar una correlació clara entre aquesta disminució i les diferents dosis administrades. En canvi, la dosi de 10 mg va ser menys eficaç que les dues dosis superiors, demostrant que l'efecte clínic de l'AcMo quimèric és dosi-dependent.

Posteriorment, els mateixos autors van demostrar que l'efectivitat del tractament amb 50 o 100 mg de l'anticòs quimèric cM-T412 estava relacionada amb els nivells sèrics d'anticòs administrat lliure. Així, després de les administracions de 50 o 100 mg, però no de la de 10 mg, tots els limfòcits CD4⁺ circulants tenien AcMo cM-T412 unit. Partint d'aquest fet, van postular que només amb les dosis superiors hom podia esperar la penetració de l'anticòs cM-T412 a la sinòvia, la qual cosa comportaria un control més efectiu de la inflamació local a les articulacions (Van der Lubbe i col., 1994). En aquest sentit, Kinne i col. (1994) van demostrar que la injecció d'un AcMo anti-CD4 provoca una acumulació inespecífica en òrgans limfoides secundaris rics en cèl·lules CD4⁺, com la melsa i els ganglis limfàtics i que també arriba a la sinòvia inflamada.

Moreland i col. (1993b) van realitzar un estudi emprant el mateix AcMo quimèric. En aquest cas, 25 pacients que patien AR greu van rebre dosis compreses entre 10 i 700 mg d'AcMo en total, segons el grup de tractament al qual van ser assignats. Les infusions van produir una davallada immediata dels nivells de cèl·lules CD4⁺, amb una durada de 6 mesos en alguns pacients. Es va observar una reducció significativa del nombre d'articulacions inflamades en un 57% dels pacients a les 5 setmanes i en un 41%, als 6 mesos del tractament. En aquests mateixos pacients, es va realitzar el seguiment de la població T CD4⁺ als 18 i 30 mesos després del tractament i es va observar que els nivells de limfòcits T CD4⁺ circulants estaven per sota dels nivells normals fins i tot als 30 mesos. La deplecció més important es va detectar en els grups que van rebre les dosis més elevades (Moreland i col., 1994).

D'altra banda, quan l'AcMo cM-T412 va ser emprat en un estudi a doble cec controlat amb placebo, cap dels 9 pacients amb AR tractats va mostrar millores significatives (Choy i col., 1992a). L'AcMo es va administrar en una sola dosi de 50 mg o en 4 dosis de 50 mg un cop per setmana. En tots els grups de tractament es van reduir significativament els nivells de limfòcits CD4⁺. Aquests autors van postular que l'eficàcia terapèutica no estava directament relacionada amb la limfopènia T CD4⁺.

Les anàlisis realitzades en sang perifèrica i líquid sinovial dels pacients tractats amb l'AcMo cM-T412 han demostrat que la deplecció cel·lular perifèrica no va acompanyada de canvis en el nombre de limfòcits T CD4⁺ sinovials. Aquests estudis demostren que l'efectivitat clínic està relacionada amb el percentatge de limfòcits de l'articulació que tenen unit l'AcMo cM-T412 (Choy i col., 1993). Per tant, la major eficàcia dels tractaments diaris sobre els règims intermitents podria estar relacionada amb un augment de la quantitat d'AcMo anti-CD4 que arriba a l'articulació sinovial.

En relació a la remissió de llarga durada observada en un nombre important de pacients, cal assenyalar que l'efecte inhibidor de l'AcMo sobre la interacció CD4-MHC de classe II no justifica la remissió, ja que la seva durada és superior al temps en que l'AcMo és detectat en aquests pacients (Pitzalis i col., 1994). Per explicar aquest fet, una possibilitat seria que les cèl·lules T patissin un procés d'apoptosi. En aquest sentit, s'ha postulat que quan els limfòcits T CD4⁺ estan units a l'AcMo quimèric i són estimulats pel seu antígen específic, en lloc d'activar-se i proliferar, pateixen apoptosi (Choy i col., 1992b).

Altres estudis randomitzats, en els quals s'inclou un grup tractat amb placebo, no han aconseguit demostrar l'eficàcia de l'anticòs cM-T412. Moreland i col. (1993c) van distribuir 64 pacients de diferents centres en 4 grups de tractament, que van rebre 5, 10, 50 mg del cM-T412 o placebo un cop al mes durant 3 mesos. El percentatge de pacients amb millores clíniques, considerant el nombre d'articulacions inflamades o dèbils, va oscil·lar entre el 6 i el 19% i no es van observar diferències significatives entre els diferents grups.

Van der Lubbe i col. (1995) van tractar 60 pacients d'AR incipient durant 5 dies consecutius, emprant 10, 25, 50 mg/dia de cM-T412 o placebo. Tot i que el nombre de limfòcits T CD4⁺ va disminuir significativament en els 3 grups tractats amb cM-T412 durant les 6 setmanes de seguiment, no es van observar diferències significatives en relació a l'estat clínic dels pacients. Un segon tractament, realitzat 8 setmanes després del primer, amb 50 mg/dia de l'AcMo durant 5 dies, va perllongar la deplecció dels limfòcits T CD4⁺, però tampoc no va modificar les manifestacions clíniques. A diferència d'altres estudis de tractaments amb AcMo anti-CD4, els pacients patien una AR d'aparició recent i encara no havien estat mai tractats amb fàrmacs antireumàtics de segona elecció, com els corticosteroides.

Tots aquests estudis realitzats emprant AcMo anti-CD4 de rosegador o quimèrics en la teràpia de l'AR es troben resumits a la Taula 1.

1.2.2. AcMo anti-CD7

La molècula CD7 és una glicoproteïna de 40 kDa que es troba en un 70% dels limfòcits T (Poulter i col., 1985) i la seva expressió augmenta en els limfòcits T activats (Lazarovits i col., 1987).

Les propietats immunosupressores de l'AcMo anti-CD7 han estat demostrades *in vitro* (Lazarovits i col., 1987) i també *in vivo* en trasplantaments renals (Lazarovits i col., 1993). L'any 1991, Kirkham i col. van desenvolupar un estudi pilot en pacients d'AR amb l'AcMo anti-CD7 murí RF-T2, d'isotip IgG2a. Sis pacients van rebre una dosi diària de 10 mg de l'anticòs durant 14 dies. Malgrat la marcada deplecció de limfòcits CD7⁺ en sang perifèrica i també en articulacions, només 2 pacients van mostrar millores clíniques durant un curt període de temps.

Tabla 1. Estudi d'immunoteràpia de l'AR emprant AcMo anti-CD4.

CARACTERÍSTIQUES DE LA IMMUNOTERÀPIA		EFFECTIVITAT CLÍNICA	REFERÈNCIA
AcMo	Isotip Posologia		
MT151	IgG2a 10 mg x 7 dosis	SI (5/5)	Herzog i col. (1987)
MT151/VIT4	IgG2a 10 mg x 7 dosis	SI (8/8)	Herzog i col. (1989)
MT151	IgG2a 20 mg x 7 dosis	SI (6/10)	Reiter i col. (1991)
RLA	IgG2a 20-40 mg x 10 dosis	SI (6/6)	Goldberg i col. (1991)
B-F5	IgG1 10/15/20 mg x 10 dosis	SI (10/10)	Wending i col. (1991)
B-F5	IgG1 20/30 mg x 10 dosis	SI (6/10)	Didry i col. (1991)
MAX 16H5	IgG1 0,3mg/kg x 7 dosis	SI (6/9)	Moroeff i col. (1991)
cM-T412	IgG1 quimèric 50 mg x 1 dosi 50 mg x 4 dosis	n.s.*	Choy i col. (1992a)
cM-T412	IgG1 quimèric 10/50/100 mg x 7 dosis	SI (dosi dependent)	Van der Lubbe i col. (1993)
cM-T412	IgG1 quimèric 10/50/100/150/200 mg x 1 dosi 100 mg x 3 dosis 100 mg x 7 dosis	SI (12/21-5 setmanes) SI (9/22-6 mesos)	Moreland i col. (1993b)
cM-T412	IgG1 quimèric 5/10/50 mg x 3 dosis	n.s.	Moreland i col. (1993c)
cM-T412	IgG1 quimèric 10/25/50 mg x 5 dosis	n.s.	Van der Lubbe i col. (1995)

* n.s. (no significatiu respecte a placebo)

El següent estudi es va dur a terme amb un AcMo quimèric, el CHH-380, administrant dues dosis de 4-20 mg. El tractament amb aquest AcMo va causar una deplecció dels limfòcits CD7⁺ similar a l'aconseguida en l'estudi anterior, però l'eficàcia clínica va ser mínima i els efectes nocius van ser freqüents i de tipus agut (Kirkham i col., 1992).

La manca d'eficàcia dels AcMo anti-CD7 a l'AR s'ha atribuït a que aquests pacients presenten una menor expressió de la molècula CD7 en limfòcits de sang perifèrica i de sinòvia (Lazarovits i Karsh, 1988; Lazarovits i col., 1992). També s'ha postulat que els limfòcits T patogènics a l'AR fossin CD7⁻. D'altra banda, podria succeir que l'AcMo anti-CD7 no tingués efecte per si sol sinó que actués com a adjuvant d'altres agents immunosupressors, ja que en trasplantaments renals s'utilitza com a part d'un *cocktail* immunosupressor (Pitzalis i col., 1994).

1.2.3. AcMo anti-CD5

La molècula de superfície CD5, de 67 kDa, s'expressa en tots els limfòcits T que presenten el TCR $\alpha\beta$ heterodimèric i també, en baixa densitat, en una petita subpoblació de limfòcits B (Lydyard i col., 1992).

Plater-Zyberk i col. (1994) han demostrat l'eficàcia d'un AcMo anti-CD5 en el tractament de l'AIC en ratolí. L'AcMo TIB104, d'isotip IgG2a, administrat a la dosi de 200 μ g els dies 1, 4 i 7 després de l'inici de l'artritis, va aconseguir disminuir la severitat de la patologia 6 dies després de l'inici del tractament.

En relació als estudis realitzats a l'AR, es va conjugar un AcMo murí anti-CD5 per enginyeria genètica a dues cadenes A de la ricina, una potent toxina vegetal que inhibeix la síntesi de proteïnes (Strand i col., 1990). Es va portar a terme un tractament de pacients amb AR, amb dosis de 10 a 25 mg/dia de l'immunoconjugat durant 5 dies, i es va aconseguir la deplecció reversible dels limfòcits T circulants i també va disminuir la resposta proliferativa de limfòcits T enfront d'antígens i mitògens. En molts pacients es van detectar millores clíniques però també molts efectes secundaris (Strand i col., 1990; Cush i col., 1991; Fishwild i col., 1991; Strand i col., 1991).

En un estudi posterior, 79 pacients amb AR (54 amb AR crònica i 25 amb AR incipient agressiva) van ser tractats durant 5 dies amb diferents dosis de l'immunoconjugat, sent la màxima dosi diària de 25 mg. Addicionalment, alguns pacients van rebre metotrexat i/o azatioprina conjuntament (Strand i col., 1993). Es va observar una resposta al tractament en un 50-68% dels pacients un mes després de la teràpia i en un 22-25% als 6 mesos, sent aquesta resposta superior en els pacients amb AR incipient que no pas en els que patien AR crònica. Després de 2-5 dies de tractament es va observar una deplecció de cèl·lules CD3⁺CD5⁺ i una recuperació posterior a partir del dia 15. També van aparèixer efectes

secundaris com urticària, nàusees, hipertensió, edema pulmonar, efusió pleural, reaccions anafilàctiques i artràlgies greus que es van poder resoldre sense seqüeles.

S'ha demostrat que la immunotoxina anti-CD5 en malalts amb AR inhibeix la proliferació de limfòcits T sinovials induïda per IL-2, la qual cosa indica una inhibició de l'activació dels limfòcits T en les articulacions inflamades (Verwilghen i col., 1992).

1.2.4. AcMo anti-CDw52

La glicoproteïna CDw52 és una molècula present en tots els limfòcits i en alguns monòcits (Hale i col., 1990).

L'AcMo CAMPATH-1G, anti-CDw52 obtingut en rata, es va humanitzar per tècniques d'enginyeria genètica donant lloc a l'AcMo CAMPATH-1H (Riechmann i col., 1988). Aquest AcMo va ser emprat per primera vegada per Kyle i col. (1991) en un pacient amb AR. Es va observar millora clínica durant 12 setmanes després del tractament. Posteriorment, Isaacs i col. (1992) van tractar 8 pacients que presentaven AR activa de llarga durada i que no havien respost al tractament amb dos fàrmacs antireumàtics. El tractament va durar 10 dies (4 mg els primers 5 dies i 8 mg els dies restants). Set pacients van respondre al tractament, assolint la màxima millora a les 4 setmanes. Un segon tractament de 4 d'aquests pacients va produir una altra remissió en tots quatre. Ni en el primer ni en el segon tractament no es va observar cap canvi en els paràmetres de laboratori. En cap pacient no es va detectar una resposta immunitària enfront de l'AcMo CAMPATH-1H després del primer tractament, però tres dels quatre pacients que es van tornar a tractar van quedar sensibilitzats i van desenvolupar anti-Ig després del segon tractament.

En un estudi posterior, es van utilitzar dosis superiors del CAMPATH-1H i els pacients van mostrar una bona resposta clínica, tot i que tots van desenvolupar una limfopènia persistent (Isaacs i col., 1993).

Watts i col. (1993) van utilitzar el CAMPATH-1H en dos règims d'administració diferents: una única infusió intravenosa (i.v.) o l'administració durant 10 dies per via subcutània (s.c.). Mentre que la infusió va produir només millores clíniques transitòries, el règim de 10 dies per via s.c. va ser tan efectiu com el de 10 dies per via i.v. descrit anteriorment. En aquest estudi, que inclou més de 100 pacients de centres hospitalaris diferents, van aparèixer infeccions oportunistes i també altres efectes secundaris greus.

Ruderman i col. (1995) van examinar els infiltrats cel·lulars del teixit sinovial de pacients amb limfopènia persistent causada per l'administració de l'AcMo CAMPATH-1H. Els teixits sinovials d'aquests pacients contenien infiltrats de limfòcits T i de limfòcits B. En concret, els limfòcits T CD4⁺, profundament depleccionats en sang perifèrica, eren presents en totes les zones d'infiltrats. Així, els autors van concloure que l'anàlisi de les poblacions cel·lulars

en sang perifèrica no reflecteix la resposta a la teràpia amb l'AcMo CAMPATH-1H a nivell de teixit sinovial.

1.2.5. AcMo anti-TCR

La majoria de limfòcits T expressen a la seva superfície un TCR format per les cadenes α i β (Dembic i col., 1986). A més a més, existeix una subpoblació minoritària de limfòcits T que expressen un segon tipus de receptor heterodimèric γ i δ (Brenner i col., 1986). La individualitat dels clons de limfòcits T es basa en les diferents seqüències d'aminoàcids de les regions V de les cadenes del TCR.

L'anàlisi del repertori dels limfòcits T té un interès addicional si considerem que els AcMo dirigits específicament contra limfòcits T autoreactius podrien ser útils per al tractament de malalties autoimmunitàries ja que permetria una teràpia menys immunosupressora que la resultant d'utilitzar AcMo dirigits contra la molècula CD4 o el MHC de classe II.

La immunoteràpia amb AcMo anti-TCR $\alpha\beta$ s'ha utilitzat a nivell experimental. L'AcMo R73, dirigit contra un determinant de la regió constant del TCR $\alpha\beta$ de rata (Hünig i col., 1989) s'ha administrat a rates amb AA, obtenint resultats satisfactoris (Yoshino i col., 1990a i b). També s'ha descrit l'efecte beneficiós en l'artritis induïda per SCW (Yoshino i col., 1991a) i en l'AIC en rata (Yoshino i col., 1991b). Tots els tractaments efectius van produir una marcada deplecció dels limfòcits T amb TCR $\alpha\beta$.

En relació a l'AIC en ratolí, l'administració d'un AcMo anti-TCR $\alpha\beta$, el dia de la inducció de la patologia i una altra dosi una setmana més tard, va inhibir el progrés artrític i va reduir els nivells d'anticossos anticol·lagen tipus II. Quan el tractament es va realitzar el dia 35, amb l'artritis establerta, es va produir una exacerbació de la patologia i els títols d'anticossos anticol·lagen no es van modificar. Quan es va administrar conjuntament un AcMo anti-TCR $\gamma\delta$ no es va modificar l'exacerbació de la patologia induïda per l'AcMo anti-TCR $\alpha\beta$ (Maeda i col., 1994).

A l'AIC en ratolí s'ha demostrat que determinades famílies de la regió variable de la cadena β del TCR contribueixen a la patogènesi (Banerjee i col., 1988; Chiochia i col., 1991). L'administració d'AcMo anti-V β 8 va suprimir el desenvolupament de l'AIC, mentre que anticossos dirigits contra les regions V β 2 i V β 5 van presentar sols un efecte parcial i per últim, els AcMo enfront d'altres regions V β van ser totalment inefectius (Chiochia i col., 1991). Tots els tractaments van produir una deplecció important i de llarga durada dels limfòcits T portadors de les cadenes TCR V β corresponents. Els AcMo que van ser efectius contra el desenvolupament de l'AIC també van disminuir els títols d'anticossos anticol·lagen.

Actualment, a l'AR no està clar quin és el TCR associat preferentment a limfòcits T artrítogènics. La principal dificultat a l'hora d'identificar aquest TCR és el no conèixer

l'antigen causant de la malaltia. Alguns autors han estudiat l'expressió del TCR en líquid o en teixit sinovial de pacients amb AR, i s'ha demostrat que el repertori de TCRs corresponent no és un de determinat sinó que varia (Howell i col., 1991; Paliard i col., 1991; Uematsu i col., 1991). De fet, Bucht i col. (1992) han descrit que existeix una major diversitat de TCR amb la persistència de la malaltia.

1.2.6. AcMo anti-MHC de classe II

Els antígens MHC de classe II presents a la superfície de les APC, constitueixen una possible molècula diana per a la immunoteràpia, amb la finalitat de bloquejar el reconeixement antigènic.

El 1987, ja es van utilitzar anticòssos anti-HLA de classe II procedents de placenta en malalts amb AR greu, obtenint resultats satisfactoris (Moynier i col., 1987). Més tard, es van tractar 6 pacients amb anticòssos antiidiotip dirigits contra AcMo anti-HLA de classe II (Fagiolo i col., 1989). En aquest cas, la meitat dels malalts van experimentar millores clíniques.

Posteriorment, Quagliata i col. (1993) van immunitzar pacients per via intramuscular amb un AcMo anti-HLA-DR4 per tal de generar la xarxa antiidiotípica contra aquest AcMo. Dins d'aquesta xarxa, els pacients generarien la seva pròpia resposta anti-HLA-DR4 de manera contínua. En l'estudi, però, no es va observar cap resposta clínica.

També es va realitzar un tractament amb AcMo dirigits contra el MHC de classe II a l'AIC en ratolí. Wooley i col. (1985) van emprar anticòssos monoclonals i policlonals dirigits contra antígens Ia rellevants per determinar la possible supressió o retard de l'inici de l'artritis. Malgrat que no tots els anticòssos estudiats varen exercir un efecte protector enfront de l'artritis, cal ressaltar que els anticòssos que varen ser efectius no sols van inhibir el desenvolupament de la patologia sinó que també van retardar el seu inici.

En una altra sèrie d'experiments en l'AIC de ratolí, Cooper i col. (1988) van avaluar l'efecte d'un AcMo, el M5/114.15.2, que reconeix un al·lodeterminant compartit pels dos tipus de molècules d'histocompatibilitat de tipus II (Ia i Ie) expressades en ratolins amb els haplotips H-2^b. Aquests estudis van incloure diferents pautes de tractament i l'administració d'IFN- γ murí recombinant amb la finalitat de promoure la inducció d'Ia en les cèl·lules sinovials. La inhibició de l'artritis només es va produir a l'administrar l'anticòs simultàniament a la immunització amb col·lagen. L'anticòs M5/114.15.2 va causar una modesta deplecció de les cèl·lules Ia⁺, i, en els casos on l'anticòs va reduir la incidència i va retardar l'inici de l'artritis, el títol d'anticòssos anticol·lagen també es va trobar disminuït.

Pel que fa als models de poliartritis en rata, Billingham i col. (1990) van demostrar que l'AcMo OX6 (anti-Ia) era capaç d'inhibir totalment el desenvolupament de l'AA. L'AcMo

a dosis d'1, 2 i 4 mg/rata es va administrar els dies 0, 3, 6, 9 i 12 després de la inducció de la patologia. La resposta va ser positiva i proporcional a la dosi administrada; la de 4 mg va evitar totalment el desenvolupament de l'artritis.

1.2.7. AcMo anti-ICAM-1 (anti-CD54)

Durant el procés inflamatori, les molècules d'adhesió com les selectines, les integrines (com el LFA-1) i els membres de la superfamília de les Ig (com l'ICAM-1), controlen les diferents fases involucrades en l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular i la seva migració subsegüent cap a les lesions inflamatòries.

Estudis immunohistoquímics de sinòvia de malalts amb AR han demostrat que la E-selectina, l'ICAM-1 i la molècula d'adhesió cel·lular vascular-1 (VCAM-1) s'expressen en la microvasculatura i en les cèl·lules de la capa íntima de la membrana sinovial d'aquests pacients (Cronstein i col., 1993). També s'ha demostrat que els nivells d'ICAM-1, VCAM-1 i altres molècules d'adhesió es troben augmentats en sang de pacients amb AR i que aquests nivells es correlacionen amb la VSG i altres paràmetres de mesura de l'activitat de la malaltia (Cush i col., 1993; Mason i col., 1993).

L'ICAM-1 és una glicoproteïna de superfície cel·lular de 90 kDa i és un lligam natural per al LFA-1, una molècula d'adhesió que es troba als limfòcits. Iigo i col. (1991) van realitzar un tractament de l'AA emprant un AcMo anti-ICAM-1, l'1A29, a la dosi de 5 mg/kg tres cops per setmana a partir del dia de la inducció fins al dia 26. Es va observar un efecte supressor del desenvolupament de la patologia i una marcada reducció dels paràmetres inflamatoris.

Kavanaugh i col. (1992) van realitzar un estudi a l'AR emprant un AcMo murí dirigit contra l'ICAM-1, el BIRR-1. Aquest AcMo va ser administrat durant 5 dies i 8/13 pacients van mostrar una resposta clínica favorable que va durar d'un a dos mesos. L'efectivitat clínica d'aquest AcMo podria estar mitjançada per la inhibició de la migració cel·lular cap a zones inflamatòries, la qual cosa justificaria la leucocitosi detectada en sang perifèrica d'aquests pacients.

Posteriorment, el mateix grup de recerca va tractar 31 pacients amb el mateix AcMo. En la meitat dels individus van aparèixer millores clíniques després de 8 dies del tractament i en 3 pacients els efectes van durar 90 dies. Un 74% dels pacients tractats amb aquest AcMo van desenvolupar efectes adversos (Kavanaugh i col., 1993).

L'any 1994, Kavanaugh i col. van emprar diferents protocols d'administració de l'AcMo BIRR-1 en 32 pacients amb AR. Alguns pacients van rebre l'AcMo durant 5 dies i altres només van rebre 2 dosis. Un 57% dels pacients que van rebre 5 dosis van respondre favorablement al tractament, mentre que entre els que van seguir el protocol d'administració

més curt només van respondre positivament un 33%. La durada dels efectes beneficiosos va ser molt superior en els pacients que van rebre 5 dosis. Novament, es va observar un increment de limfòcits T CD3⁺CD4⁺ en sang perifèrica, i alguns d'ells expressaven marcadors d'activació cel·lular com el HLA-DR i el IL-2R. Aquests resultats van demostrar que el tractament amb l'AcMo anti-ICAM-1 inhibeix la recirculació dels limfòcits T, fins i tot d'aquells amb capacitat migratòria incrementada.

2. IMMUNOTERÀPIA AMB CITOCINES I INHIBIDORS DE CITOCINES

Les citocines són molècules clau en la iniciació i la perpetuació de la resposta immunitària i, per tant, són dianes molt emprades en immunoteràpia. Resulta problemàtic, però, dirigir la immunoteràpia contra una única citocina, ja que, en primer lloc, la xarxa de citocines presenta redundàncies de manera que la inhibició d'una citocina determinada pot ser compensada per una altra que faci la funció de la primera; en segon lloc, les citocines són pleotrópiques, és a dir, influeixen en més d'un procés i la seva inhibició provoca la supressió tant dels efectes desitjats com dels no desitjats. Finalment, la teràpia ha de ser continuada o recurrent ja que les citocines se segueixen produint un cop es finalitza la immunoteràpia.

Malgrat tot, el desenvolupament d'inhibidors de citocines gaudeix d'un gran interès. S'han utilitzat fàrmacs inhibidors de la producció o de la secreció de citocines, antagonistes naturals com l'antagonista del receptor per a la IL-1, receptors solubles de citocines i AcMo anti-citocines.

2.1. FACTOR DE NECROSI TUMORAL- α

El TNF- α sembla ser important en el desenvolupament de l'AR. Diversos autors han descrit la presència i la síntesi local de TNF- α en la membrana sinovial reumatoide (Buchan i col., 1988; Chu i col., 1991). D'altra banda, ratolins transgènics per al gen de TNF- α humà, que expressaven alts nivells de TNF- α humà *in vivo*, van desenvolupar espontàniament una artritis destructiva a partir de les quatre setmanes d'edat i aquesta patologia es podia inhibir mitjançant l'administració d'AcMo dirigits contra el TNF- α humà (Keffer i col., 1991).

En relació als models experimentals d'artritis, s'ha demostrat la presència de nivells significativament elevats de TNF- α en les articulacions inflamades de rates amb AA (Smith-Oliver i col., 1993). A més a més, els estudis realitzats a l'AIC en rata i en ratolí han permès aprofundir en la possible implicació del TNF- α a l'artritis. L'administració intraarticular de TNF- α , abans (Brahm i col., 1992) o després (Cooper i col., 1992) de la inducció de l'AIC, va comportar una acceleració de l'inici de la patologia i una evolució més greu. D'altra banda, l'administració d'AcMo anti-TNF- α , abans o després de l'inici de l'artritis, va aconseguir reduir la gravetat de la inflamació i de la destrucció articular (Piquet

i col., 1992; Thorbecke i col., 1992; Williams i col., 1992). El tractament de l'AIC ja establert amb una combinació d'AcMo dirigit contra el TNF- α i el CD4 va comportar una reducció de la inflamació i de la destrucció articular superior a l'observada a l'administrar qualsevol dels dos AcMo per separat (Williams i col., 1994). Per últim, la infusió de receptors recombinants humans per al TNF també va reduir la freqüència i l'activitat de l'AIC (Wooley i col., 1993a).

Pel que fa a la malaltia humana, Elliott i col. (1993) van desenvolupar un tractament de l'AR amb un AcMo quimèric (humà/ratolí) anti-TNF- α , el cA2. Es van tractar 20 pacients amb 20 mg/kg de l'AcMo. Malgrat l'alta dosi administrada, el tractament fou ben tolerat sense cap efecte nociu i sense l'aparició d'anticossos contra l'AcMo administrat. Els pacients van experimentar millores clíniques i també es van observar davallades en els nivells de proteïna C reactiva i en els d'IL-6 en sèrum. Els efectes beneficiosos, però, només van durar algunes setmanes. En repetir aquest tipus de teràpia en 7 dels 20 pacients, fins a 4 cicles d'administració, es van observar efectes clínics beneficiosos de la mateixa magnitud que els aconseguits en el primer cicle. La mitjana de les millores sobre la inflamació articular i els nivells de proteïna C reactiva va ser superior a un 80% (Elliott i col., 1994a).

Es va dur a terme un estudi a doble-cec en el que els efectes de l'AcMo cA2 en 73 pacients amb AR, procedents de 4 centres diferents, es van comparar amb l'administració de placebo. En aquest cas, només 2 dels 24 pacients que van rebre placebo van mostrar millores d'una forma transitòria, mentre que 11/25 i 19/24 dels pacients que van rebre dosi baixa i alta de cA2, respectivament, van respondre satisfactòriament a la teràpia. El grau de millora del grup tractat amb la dosi més alta (10 mg/kg) va ser superior al 60% en relació al nombre d'articulacions inflamades i als nivells de proteïna C reactiva (Elliott i col., 1994b).

2.2. INTERLEUCINA-1

La IL-1 és capaç d'induir l'alliberament de metal·loproteïnases per part dels condrocits i d'estimular la producció de prostaglandina E₂ i col·lagenasa per part de les cèl·lules sinovials (Dinarello, 1991). A més a més, la IL-1 estimula la resorció òssia, l'activació dels limfòcits T i l'expressió de molècules d'adhesió com el LFA-1 i l'ICAM-1.

In vitro, els monòcits procedents de sang perifèrica de pacients amb AR produeixen més IL-1 que les cèl·lules provinents d'individus sans o de pacients amb osteoartritis (Goto i col., 1990; Dularay i col., 1992; Ruschen i col., 1992). Igualment, els monòcits aïllats del líquid sinovial de pacients artrítics produeixen més IL-1, després de la seva estimulació *in vitro*, que les cèl·lules sanguínies dels mateixos pacients (Dularay i col., 1992). Per aquests motius, la inhibició de l'activitat de la IL-1 és una estratègia lògica per intentar disminuir el procés inflamatori de l'AR.

S'han descrit diverses modalitats per reduir l'activitat de la IL-1 com són els anticossos anti-IL-1, els receptors solubles per a la IL-1, i els anticossos antireceptors o antagonistes de receptors (Dinarello, 1993). A l'AIC en ratolí, el tractament amb anticossos anti-IL-1 va aconseguir suprimir la degradació de proteoglicans i prevenir la inflamació i la destrucció del cartílag (Van de Loo i col., 1992; Van den Berg i col., 1994).

Arend i col. (1989) van identificar l'antagonista del receptor per a la IL-1 (IL-1ra), un inhibidor natural de la IL-1. El IL-1ra recombinant (rIL-1ra) bloqueja la secreció de prostaglandina E_2 i de col·lagenasa induïda per IL-1 en les cèl·lules sinovials (Dinarello, 1991). L'administració de rIL-1ra a l'AIC va reduir la incidència i va accelerar l'inici de la patologia (Wooley i col., 1993b). En l'artritis induïda per SCW, el rIL-1ra va inhibir en un 60% la inflor articular i l'erosió del cartílag (Schwab i col., 1991).

Respecte a l'AR, es va realitzar un tractament amb rIL-1ra durant 28 dies, per via s.c. Al cap de 7 dies, els pacients van mostrar una reducció significativa del nombre d'articulacions dèbils i dels índexs serològics d'inflamació (Lebsack i col., 1991). Posteriorment, es va dur a terme un estudi a doble cec amb 175 pacients d'AR procedents de diferents centres. El rIL-1ra es va administrar durant una setmana i a les tres setmanes es van observar millores en 4 paràmetres representatius de l'eficàcia clínica (Lebsack i col., 1993).

2.3. INTERLEUCINA-2

Per actuar específicament contra limfòcits T involucrats en les respostes immunitàries potencialment patogèniques, s'han desenvolupat AcMo dirigits contra marcadors de superfície expressats en els limfòcits T activats.

Quan els limfòcits T s'activen, expressen el receptor per a la IL-2 (IL-2R) d'alta afinitat, el qual no s'expressa en limfòcits T en repòs (Rubin i Nelson, 1990). D'altra banda, el IL-2R també s'expressa en limfòcits B activats (Waldmann i col., 1984). La interacció de la IL-2 amb el IL-2R inicia la proliferació cel·lular que culmina amb l'aparició de limfòcits T efectors (Waldmann, 1993). Tot i que per inhibir aquesta interacció hom podria bloquejar la pròpia molècula d'IL-2, tots els estudis terapèutics han estat dirigits a bloquejar el IL-2R.

Banerjee i col. (1988) van emprar un AcMo IgM anti-IL-2R de ratolí obtingut en rata, el 7D4, per tractar l'AIC en ratolí. Aquest AcMo, que s'uneix al IL-2R en un lloc diferent al locus que indueix la proliferació de limfòcits T, es va administrar a dosi de 200 μ g/dia des del dia -1 al dia 6 després de la immunització. El tractament va disminuir un 50% la incidència i la gravetat de l'artritis.

També existeixen estudis que descriuen l'administració d'AcMo anti-IL-2R a l'AA en rata. L'any 1988, Stunkel i col. i Fergusson i col., emprant l'AcMo ART-18 a la dosi de 5 mg/kg durant els dies 0-10 després de la injecció de l'adjuvant, no van aconseguir inhibir el

desenvolupament de l'AA. D'altra banda, però, els mateixos autors van descriure la inhibició de l'artritis induïda per transferència de limfòcits T emprant el mateix AcMo. Aquesta discrepància en l'efectivitat de la immunoteràpia s'atribueix a que la transferència de l'artritis es realitza amb limfòcits que expressen IL-2R a la seva superfície (Billingham, 1994).

El tractament de l'AA utilitzant altres AcMo anti-IL-2R, concretament l'OX39 i el CSA, tampoc va resultar efectiu (Billingham i col., 1989 i 1990). D'altra banda, s'han realitzat estudis amb AcMo bifuncionals formats per una regió d'unió dirigida cap al IL-2R i una altra cap a alcal·loïds de la Vinca. Un d'aquests AcMo es va aplicar com a teràpia de l'artritis transferida amb limfòcits procedents de rates amb AA. Aquest AcMo complexat a la vinblastina, administrat cada 2 dies des del moment de la transferència fins al dia 8 (50 µg/rata), va produir un efecte beneficiós sobre l'artritis. En canvi, quan aquest AcMo es va emprar en l'AA, es va observar un empitjorament de la patologia si s'administrava durant els dies 0-3 postinducció i un efecte beneficiós si la teràpia començava després del dia 10 postinducció (Billingham, 1994).

En relació a l'AR humana, el primer estudi amb un AcMo anti-IL-2R va ser realitzat l'any 1989 per Kyle i col. L'AcMo de rata CAMPATH-6, d'isotip IgG2b, va ser administrat a 3 pacients durant 10 dies. Dos pacients van respondre positivament a la teràpia durant 3 mesos amb canvis significatius en els índexs de dolor, en la rigidesa matinal i en l'índex de Ritchie.

Una terapèutica alternativa, possiblement més efectiva, és la de bloquejar el IL-2R amb la mateixa IL-2, ja que aquesta té molta més afinitat per al seu receptor que un AcMo. El DAB₄₀₆IL-2 és el producte d'una fusió genètica sintètica que consisteix en IL-2 recombinant conjugada a la toxina de la diftèria. El resultat és una IL-2 que s'uneix al seu receptor amb alta afinitat i que alhora produeix la lisi de la cèl·lula a causa de la toxina (Williams i col., 1987). Bacha i col. (1992) van realitzar un tractament de l'AA emprant aquest compost durant la fase de latència de la patologia (dies -1 al 9 després de la inducció) i sobre l'artritis establerta (dies 11 al 21 després de la inducció). Mentre que l'administració realitzada en rates amb AA establerta no va modificar els paràmetres clínics de la patologia, el tractament realitzat en la fase de latència va aconseguir retardar l'aparició dels signes inflamatoris i va reduir el grau d'inflamació de 2 a 4 vegades respecte al grup artrític control.

En estudis en humans utilitzant el DAB₄₀₆IL-2, s'han descrit millores clíniques ràpides en la majoria dels casos d'AR, sense modificacions importants del nombre de limfòcits T (Sewell i Trentham, 1991). Posteriorment, Sewell i col. (1993) van tractar 19 pacients amb AR refractària al metotrexat, durant 5 o 7 dies consecutius, emprant dosis de 0,07 a 0,1 mg/kg/dia de DAB₄₀₆IL-2. Els pacients tractats a la dosi mitja o alta van experimentar millores significatives.

2.4. INTERLEUCINA-6

S'ha descrit la possible implicació de la IL-6 en la immunopatogènesi de l'AR, en la inflamació crònica i en la destrucció osteoarticular (Feldmann i col., 1990; Harris, 1990; Dasgupta i col., 1992). La IL-6 és sintetitzada per limfòcits, monòcits, fibroblasts (Arend i Dayer, 1990), cèl·lules endotelials i cèl·lules sinovials responsables de la producció local d'aquesta citocina en les articulacions reumatoides (Guerne i col., 1989). D'altra banda, la IL-6 és un factor de maduració de limfòcits B i estimula la producció de proteïna C reactiva (Gauldi i col., 1990).

A l'AR, tot i que es troben nivells elevats d'IL-6 en sèrum en comparació amb els controls, les concentracions d'IL-6 són més elevades en el líquid sinovial, fet que reflecteix la producció local d'aquesta citocina per part de la sinòvia reumatoide (Firestein i col., 1988; Hirano i col., 1988; Houssiau i col., 1988). Els nivells d'IL-6 en l'AR es correlacionen amb l'activitat de la malaltia (Swaak i col., 1988; Dasgupta i col., 1992). Cal dir que també en l'AA es troben augmentats els nivells d'IL-6 i que també en aquest cas es correlacionen amb els signes morfològics de la patologia (Theisen-Popp i col., 1992). A més a més, els mateixos autors han demostrat que l'agent inductor de l'AA, el *Mycobacterium tuberculosis*, és un potent inductor de la producció d'IL-6 per part de les cèl·lules espièniques *in vitro*.

En base a aquests resultats, es va realitzar un tractament de l'AR amb un AcMo anti-IL-6 obtingut en ratolí, el B-E8, d'isotip IgG1 (Wendling i col., 1993). En aquest estudi, els pacients es van tractar prèviament (de 3 a 12 mesos abans) amb un AcMo anti-CD4. L'AcMo anti-IL-6 es va administrar durant 10 dies (10 mg/dia, via i.v.) i les millores clíniques i bioquímiques observades van ser transitòries, amb una durada d'aproximadament dos mesos. Sorprenentment, els nivells d'IL-6 en sèrum van augmentar en la majoria dels pacients.

2.5. INTERFERÓ- γ

L'IFN- γ és una citocina secretada pels limfòcits T activats que poseeix efectes immunomoduladors i antiproliferatius (Moreland i col., 1993a). L'habilitat de l'IFN- γ per induir i estimular l'expressió cel·lular d'antígens del MHC de classe II ha suggerit la seva implicació en la patogènesi de malalties autoimmunitàries com l'AR (Rosa i Felious, 1984).

En estudis realitzats a l'AIC en ratolí existeixen resultats contradictoris sobre l'efecte de l'administració d'IFN- γ recombinant (rIFN- γ) (Mauritz i col., 1988; Nakajima i col., 1990). Aquestes discrepàncies podrien ser el resultat de les diferents vies emprades en l'administració de la citocina i també en la pauta d'administració. A l'AA, en funció de la fase de l'artritis en que s'inicia el tractament, s'han obtingut resultats molt diferents, que van des de la supressió de la patologia fins a l'empitjorament dels signes artrítics (Jacob i col., 1989). En l'artritis induïda per SCW, l'administració de rIFN- γ va suprimir la migració de leucòcits cap a la sinòvia. Aquest efecte és causat, probablement, per l'habilitat de l'IFN- γ

per disminuir l'expressió de receptors d'adhesió i migració dels monòcits circulants (Wahl i col., 1991).

En l'AR s'han descrit nivells baixos o fins i tot absència d'IFN- γ en la sinòvia (Veys i col., 1988a). En base a l'assumpció que aquests nivells negligibles d'IFN- γ en el líquid sinovial són un defecte clínicament rellevant a l'AR, s'han desenvolupat estudis clínics per determinar l'eficàcia del tractament amb rIFN- γ , però només s'han detectat millores clíniques mínimes (Veys i col., 1988b; Cannon i col., 1989; Pincus i col., 1990).

3. VACUNACIÓ AMB LIMFÒCITS T

Aquest tipus d'immunoteràpia consisteix en inactivar els clons de limfòcits T autoreactius responsables de la patologia autoimmunitària mitjançant la injecció de dosis subpatogèniques de limfòcits T específics per a l'autoantigen.

El 1983, Holoshitz i col. van aïllar línies de limfòcits T procedents d'animals induïts amb AA que proliferaven enfront del *Mycobacterium tuberculosis*. Aquests autors van demostrar que aquestes línies cel·lulars eren capaces de transferir la patologia a rates irradiades i també de "vacunar" contra el desenvolupament de la patologia en rates no irradiades, les quals esdevenien resistents a la posterior inducció d'AA.

Lider i col. (1987) van descriure que algunes línies de limfòcits T que no eren efectives en la vacunació de l'AA podien transformar-se en immundgens efectius mitjançant el seu tractament amb pressió hidrostàtica, la qual augmenta la rigidesa de la bicapa lipídica i provoca l'agregació i una major exposició dels components de membrana al sistema immunitari (Shinitzky, 1984). La inoculació de les cèl·lules tractades amb pressió hidrostàtica va induir una ràpida remissió de l'AA establerta i una resistència a induccions subseqüents.

Altres estudis també han descrit l'eficàcia de la vacunació amb limfòcits T a l'AA (Cohen i Weiner, 1988; Mer i col., 1990) i a l'AIC en ratolí (Kakimoto i col., 1988; Chiochia i col., 1991). Un estudi recent de Chiochia i col. (1994) a l'AIC descriu diferents efectes de la vacunació en funció de l'hibridoma anticòl·lagen tipus II emprat per a la vacunació, aconseguint des d'una supressió de llarga durada fins a una exacerbació de la patologia.

L'ús de la vacunació amb limfòcits T a l'AR resulta difícil ja que no s'ha identificat l'antigen específic causant. Estudis mitjançant tecnologia amb àcid desoxiribonucleic (DNA) suggereixen una selecció local dels limfòcits T amb un TCR específic en la membrana sinovial reumatoide (Savill i col., 1987; Miltenburg i col., 1990). Per aquest motiu, Van Laar i col. (1993) van tractar pacients artrítics amb un clon de limfòcits T obtingut del seu líquid o teixit sinovial observant una resposta clínica moderada, sense modificació de la VSG o dels nivells de proteïna C reactiva.

4. IRRADIACIÓ GANGLIONAR TOTAL

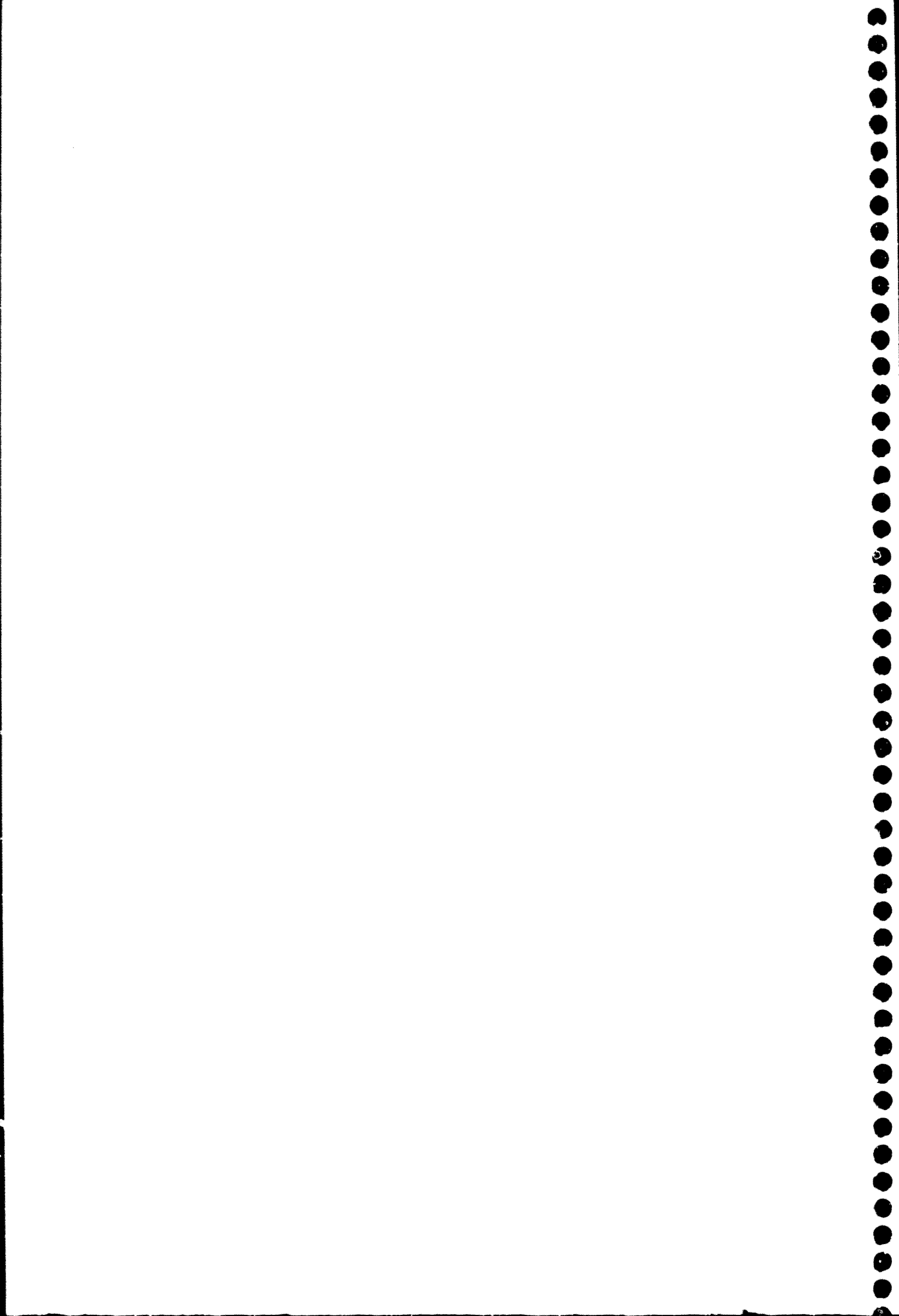
La irradiació ganglionar total és una tècnica radioteràpica, difosa per Kaplan el 1972 i que s'utilitza habitualment per al tractament de la malaltia de Hodgkin. Aquesta tècnica permet la irradiació de la major part del teixit limfàtic ganglionar de l'organisme. La seva utilització en el tractament de malalties autoimmunitàries i en la preparació per a trasplantaments es basa en les alteracions immunològiques observades en els pacients de la malaltia de Hodgkin tractats amb radiacions (Posner i col., 1981).

Estudis realitzats en animals de laboratori van mostrar que el tractament causa leucopènia, però que, a les tres setmanes, el nombre de granulòcits es recupera i persisteix una limfopènia, durant la qual els limfòcits T són gairebé inexistents. Els limfòcits B es recuperen als 4 mesos, però la limfopènia T és de llarga durada. A més a més, les respostes primària i secundària mitjançades per anticossos també presenten alteracions (Valls i Algara, 1991). S'ha demostrat l'eficàcia d'aquest tipus de tractament en l'AA en rata, on el règim de radioteràpia ha produït remissions de llarga durada (Shurman i col., 1981).

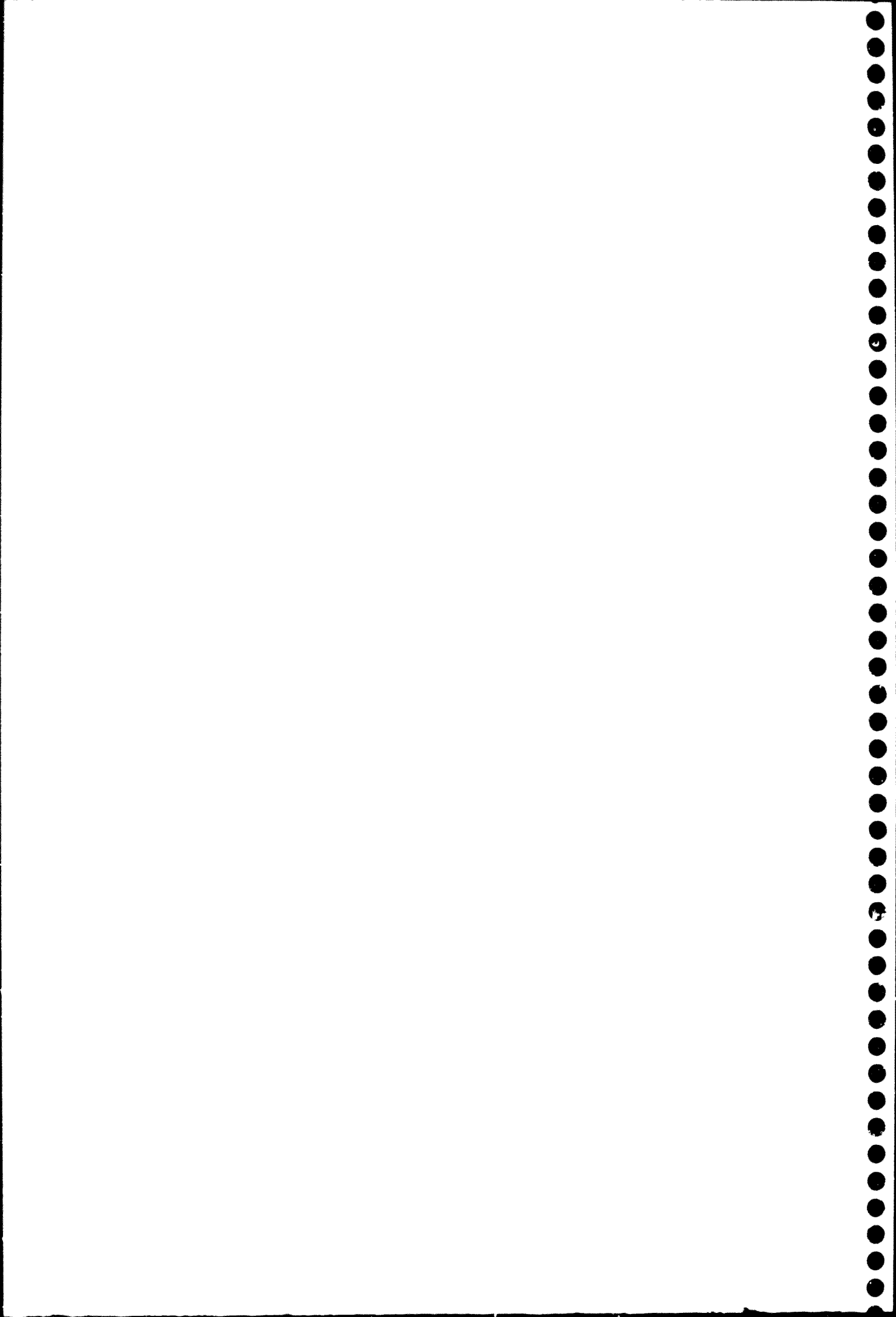
En relació als estudis realitzats en malalts amb AR, la irradiació ganglionar total proporciona, en un gran nombre de pacients, millores substancials en l'evolució clínica de la malaltia que romanen durant alguns anys després del tractament (Tanay i col., 1987; Trentham i col., 1987). La limfopènia que s'observa en aquests pacients tractats és causada bàsicament per una reducció en el nombre de cèl·lules CD4⁺, la qual cosa provoca la inversió del quocient CD4/CD8 (Strober i Holoshitz, 1990). Durant la radioteràpia no existeix una deplecció selectiva de cèl·lules CD4⁺, el que succeeix és que les cèl·lules CD4⁺ es recuperen amb més dificultat que les CD8⁺ (Kotzin i col., 1983).

Els efectes tòxics d'aquest tipus de teràpia comprenen astènia, anorèxia, nàusees o diarrea, els quals són normalment moderats i assumibles. En alguns pacients amb AR es presenta una leucopènia greu o una trombocitopènia que obliga a suspendre el tractament. També es donen casos d'infeccions per herpes zòster i infeccions bacterianes (Valls i Algara, 1991).

Els avenços en el coneixement dels mecanismes immunològics involucrats en la patogènesi de l'AR, conjuntament amb el desenvolupament d'agents biològics dirigits contra els elements crítics d'aquests mecanismes, ha facilitat l'aplicació de les noves tendències terapèutiques que aquí s'han comentat. Els models experimentals d'artritis són útils per conèixer els mecanismes que intervenen en la perpetuació de l'artritis. Cal esmentar que els AcMo són eines bàsiques per aquests descobriments. Tot i que ja s'han realitzat estudis preliminars en humans, encara es necessiten més treballs per determinar els règims d'administració més apropiats i per definir les combinacions terapèutiques que potenciïn la seva efectivitat clínica. D'altra banda, calen estudis a doble-cec controlats per placebo per establir l'eficàcia de les diferents formes d'immunoteràpia.



DISSENY EXPERIMENTAL



L'artritis adjuvant és una patologia que s'indueix en rata mitjançant una suspensió micobacteriana i que ha estat objecte d'estudi del nostre grup de recerca durant els últims anys. Estudis previs realitzats en el nostre laboratori van demostrar la presència d'una limfocitosi en sang perifèrica de rates amb AA i, per tècniques de citometria de flux, es va detectar un augment en el nombre de limfòcits T CD8⁺ més pronunciat que l'augment en el nombre de limfòcits T CD4⁺. Així, es va establir que el quocient CD4/CD8 era inferior en els animals artrítics que en els controls sans (Franch i col., 1994a).

Considerant el desequilibri present en sang perifèrica com a precedent, el primer objectiu del present treball va consistir en esbrinar quins tipus cel·lulars estan implicats en el procés artrític a nivell local, i per això, es va realitzar un estudi immunohistoquímic de la membrana sinovial de genoll de rates amb AA a diferents temps de la seva evolució (Figura 5-1). En aquest estudi es va observar un increment en la població de cèl·lules CD8⁺ en el teixit sinovial d'animals artrítics respecte el teixit dels animals sans, fet coincident amb els resultats de sang perifèrica. Per altra banda, la presència de cèl·lules CD5⁺ (limfòcits T) era molt reduïda en els teixits procedents d'animals artrítics. Aquests resultats van mostrar la presència de cèl·lules CD8⁺CD5⁻ i van suggerir la possibilitat que es tractés de limfòcits T- γ/δ , alguns dels quals presenten aquest fenotip, hipòtesi reforçada pel fet que l'AA s'indueix mitjançant una suspensió de micobacteri i per la resposta proliferativa dels limfòcits T- γ/δ *in vitro* enfront d'antígens micobacterians (Haregewoin i col., 1989; Janis i col., 1989).

Per identificar aquestes cèl·lules com a limfòcits T amb TCR- γ/δ calia disposar d'un AcMo específic per a aquests limfòcits de rata, anticòs que no existia fins aquells moments. Coincidint amb aquest fet, el grup del Prof. Dr. T. Hünig, de Würzburg (Alemanya), va produir i caracteritzar l'AcMo V65 dirigit contra el TCR- γ/δ de rata (Kühnlein i col., 1994). La relació amb aquest grup de Würzburg, i posteriorment amb el dels Prof. Dr. F. Emmrich i Dr. R.W. Kinne d'Erlangen (Alemanya), va conduir a la realització d'un treball en col·laboració entre els tres grups de recerca per tal d'esbrinar la possible implicació dels limfòcits T- γ/δ en l'AA. Per això es van dissenyar diferents protocols d'immunoteràpia a l'AA amb l'AcMo V65 (Figura 5-2,3,4). El tractament es va realitzar en diferents fases de la patologia experimental, però en cap cas es va aconseguir suprimir o millorar la patologia.

Després d'observar que els limfòcits T- γ/δ no intervenien directament en el desenvolupament del procés artrític experimental, vam tornar a dirigir l'atenció cap als limfòcits T- α/β , concretament cap a la població CD4⁺ i la CD8⁺. Estudis de transferència realitzats per Holoshitz i col. (1983) i Taurog i col. (1983) havien demostrat un paper essencial dels limfòcits T CD4⁺ en el desenvolupament de l'AA. Quedava per veure, però, si els limfòcits T CD8⁺ exercien algun efecte complementari o capaç de modular el dels limfòcits T CD4⁺.

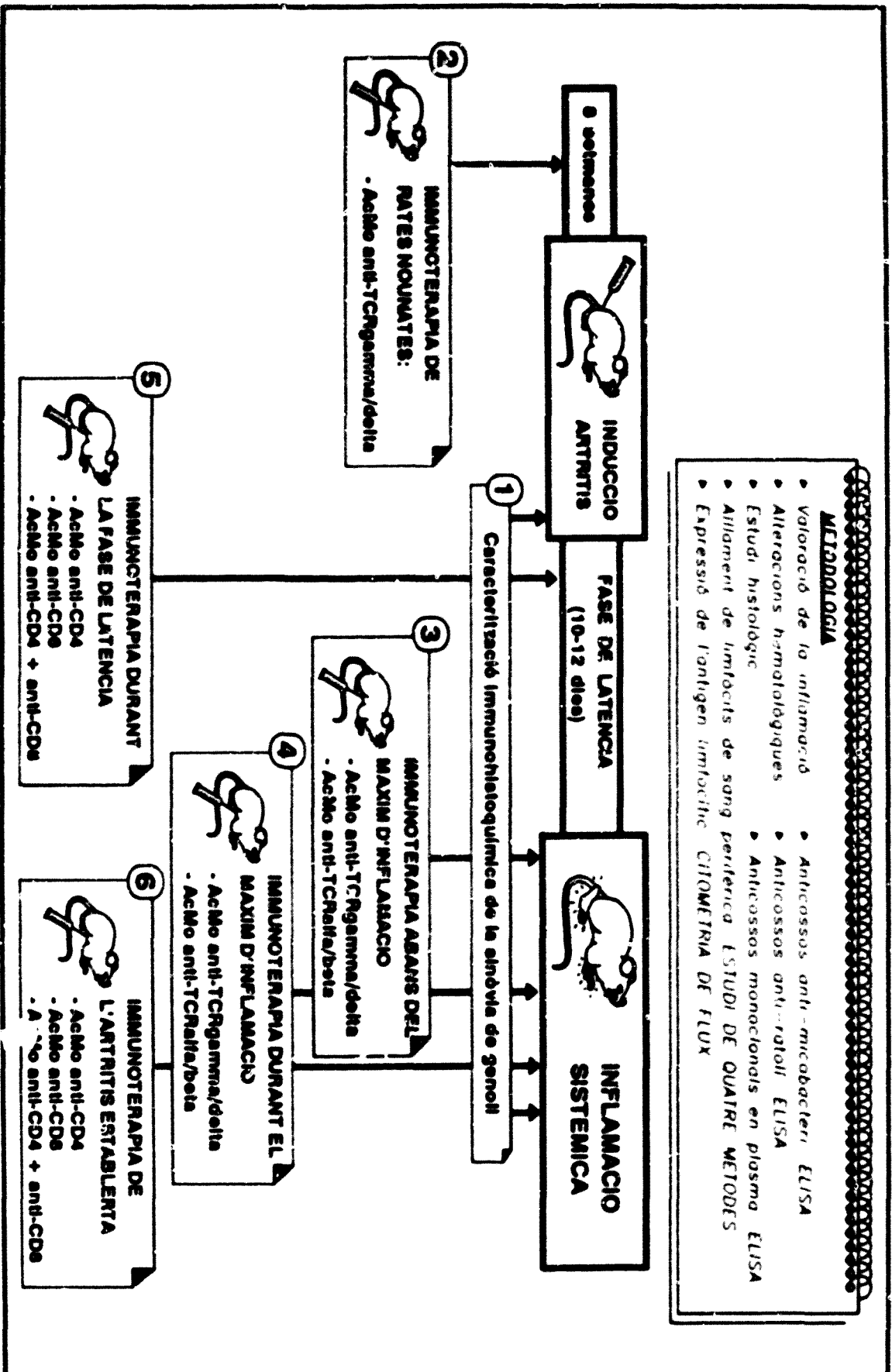


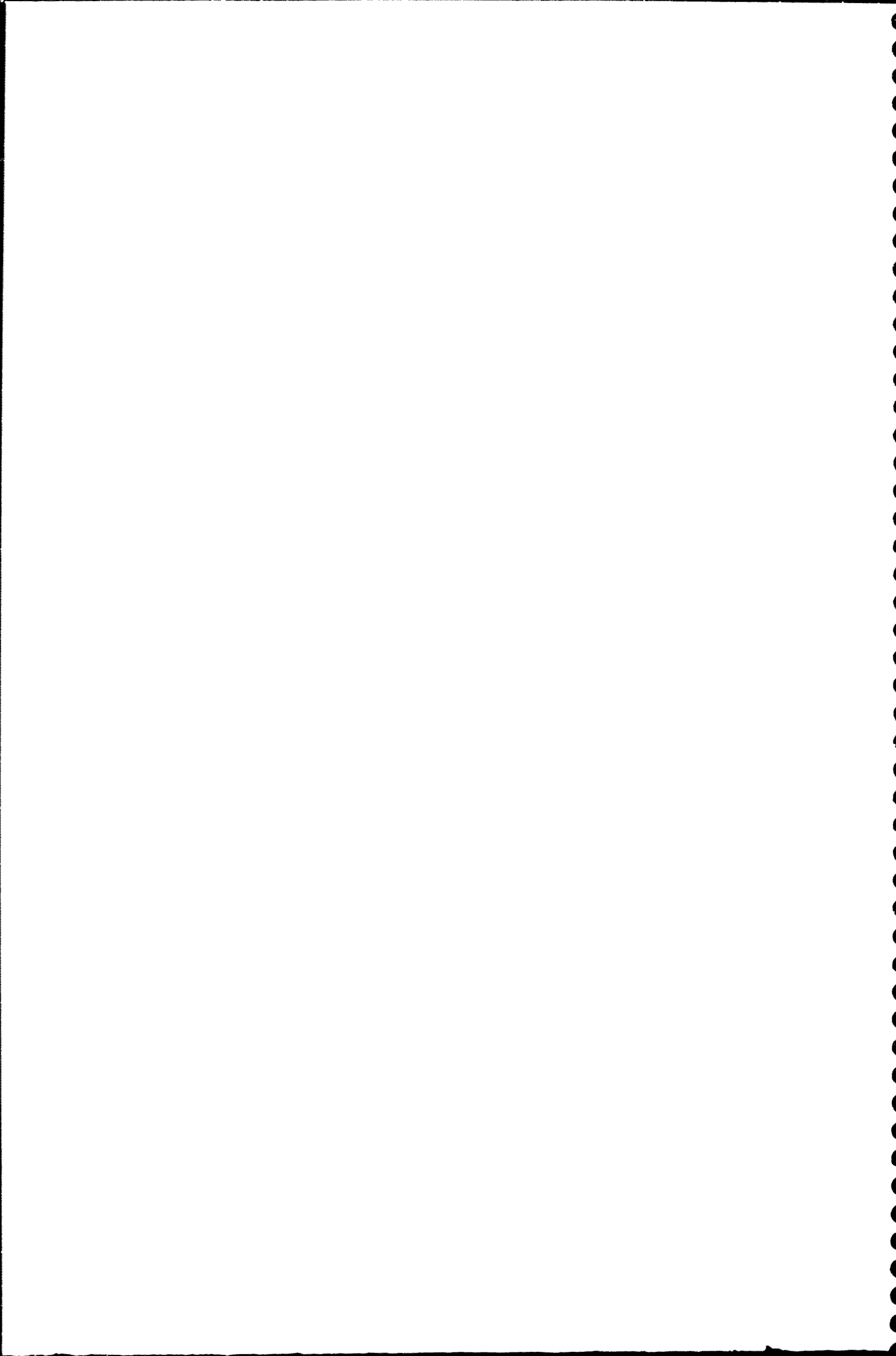
Figura 5. Esquema del disseny experimental.

Per estudiar la implicació de les subpoblacions limfocítiques CD4⁺ i CD8⁺ en el desenvolupament de l'artritis es va realitzar una immunoteràpia amb AcMo dirigits contra ambdós tipus cel·lulars durant la fase de latència de la patologia (Figura 5-5).

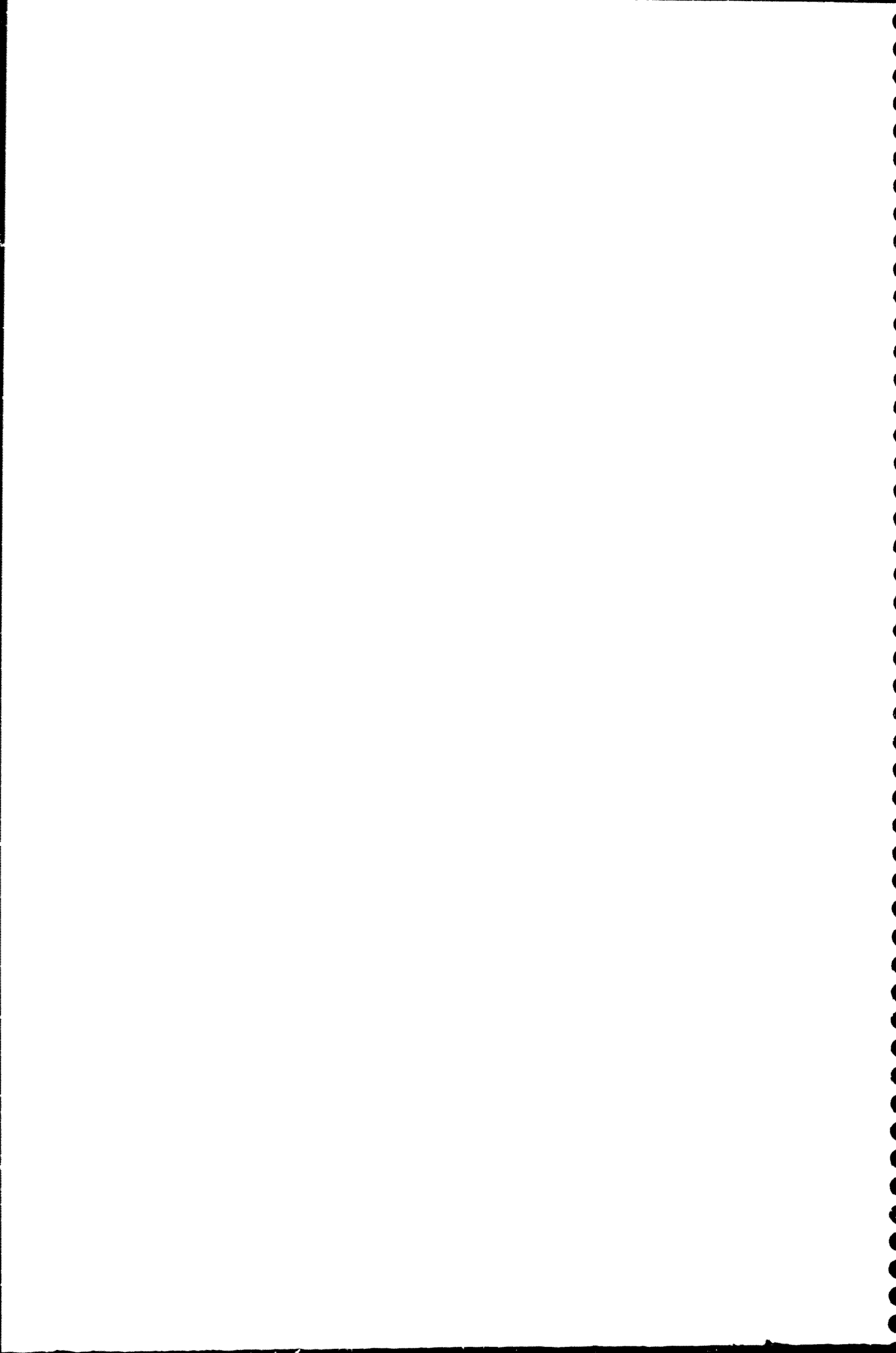
Com a fase prèvia, es va determinar la dosi òptima d'administració de cada AcMo. Per això, es van administrar dosis úniques de W3/25 (0,5, 1, 2 i 3 mg) i d'OX8 (0,5, 1 i 2 mg) a rates sanes i es va avaluar la seva capacitat per eliminar els limfòcits T amb expressió antigènica normal de CD4 o CD8, respectivament. Així es van escollir les dosis de 3 mg de W3/25 i d'1 mg d'OX8. Per realitzar els tractaments corresponents, era necessari disposar de grans quantitats d'AcMo (aproximadament 300 mg de W3/25 per cada protocol d'immunoteràpia) i amb aquesta finalitat es van iniciar i posar a punt en el nostre laboratori tècniques de cultiu d'hibridomes i d'obtenció d'ascites en ratolins Balb/c.

Es va estudiar l'efecte de l'administració dels AcMo a nivell cel·lular. Ens vam plantejar fer un seguiment de les subpoblacions de limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ per citometria de flux a diferents intervals durant i després del tractament. Un pas molt important per a l'anàlisi citomètrica de les poblacions de sang perifèrica és l'aïllament dels limfòcits. Per aquest motiu, i com a pas previ, es van comparar els efectes sobre les poblacions limfocítiques de rata d'un gradient de sedimentació Ficoll-Isopaque adaptat a rata amb tres mètodes de lisi d'eritròcits aplicats normalment a sang humana: clorur amònic, reactiu de Becton & Dickinson i el sistema Coulter Q-prep. Tot i que els quatre mètodes van proporcionar resultats similars, es va triar el mètode de lisi amb clorur amònic perquè no afecta selectivament cap subpoblació de limfòcits T, i pel seu baix cost i fàcil aplicabilitat.

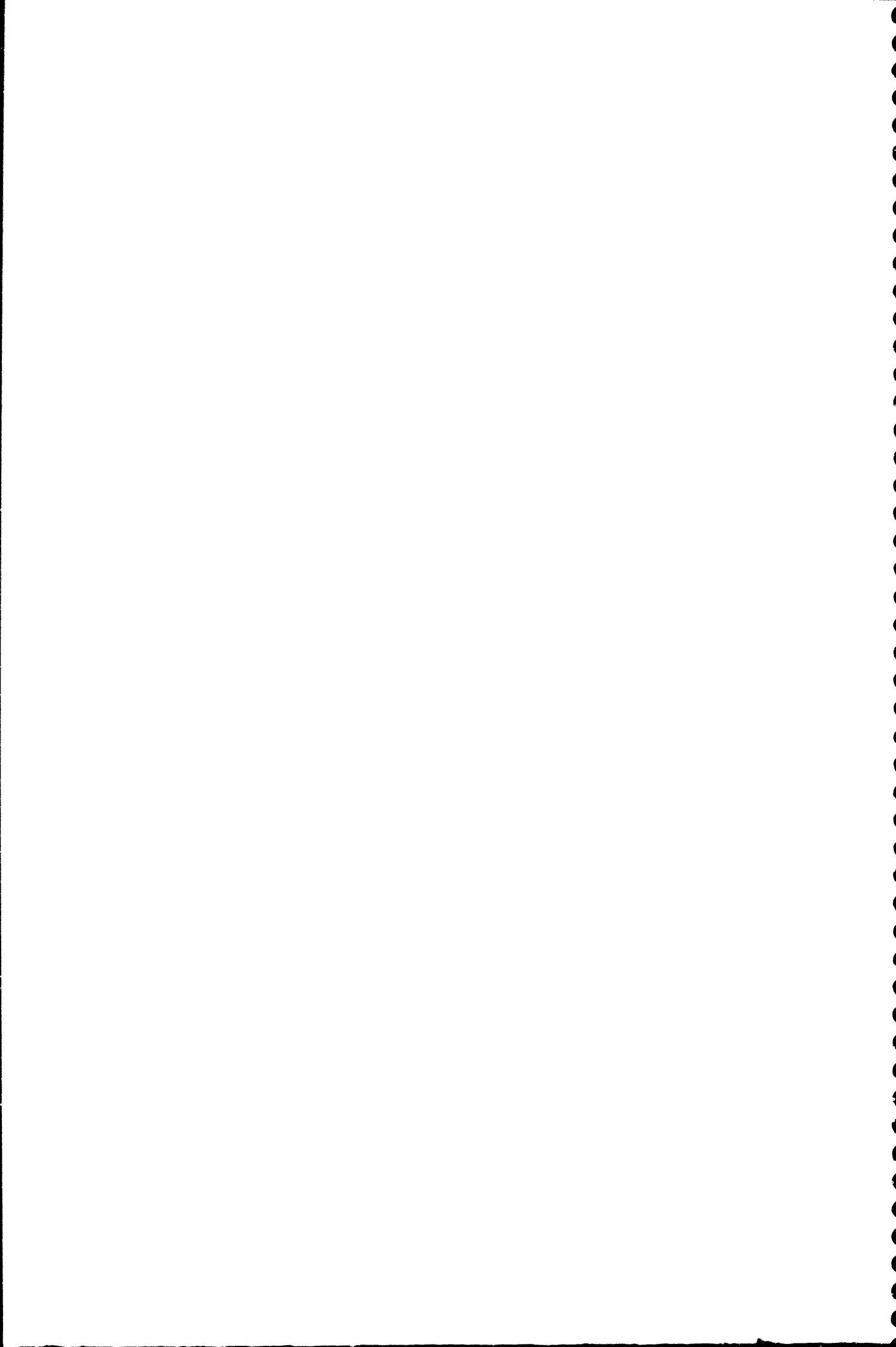
Es va portar a terme un tractament preventiu de l'AA amb l'AcMo W3/25 (anti-CD4), amb l'AcMo OX8 (anti-CD8) i amb tots dos AcMo conjuntament (Figura 5-5). L'administració d'OX8 no va modificar l'evolució normal de la patologia. En canvi, l'AcMo W3/25 no només va aconseguir prevenir el procés inflamatori de l'AA sinó que va induir un estat de resistència enfront d'una segona inducció tardana amb *Mycobacterium buryicum*. L'efectivitat clínica del tractament preventiu amb l'AcMo anti-CD4 ens va portar a analitzar, com a últim objectiu d'aquest treball, si aquest AcMo era també efectiu en l'artritis ja establerta (Figura 5-6).



ARTICLES



Article 1



IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES IN SYNOVIAL TISSUE DURING THE COURSE OF ADJUVANT ARTHRITIS

The Journal of Rheumatology 22:124-132 (1995)

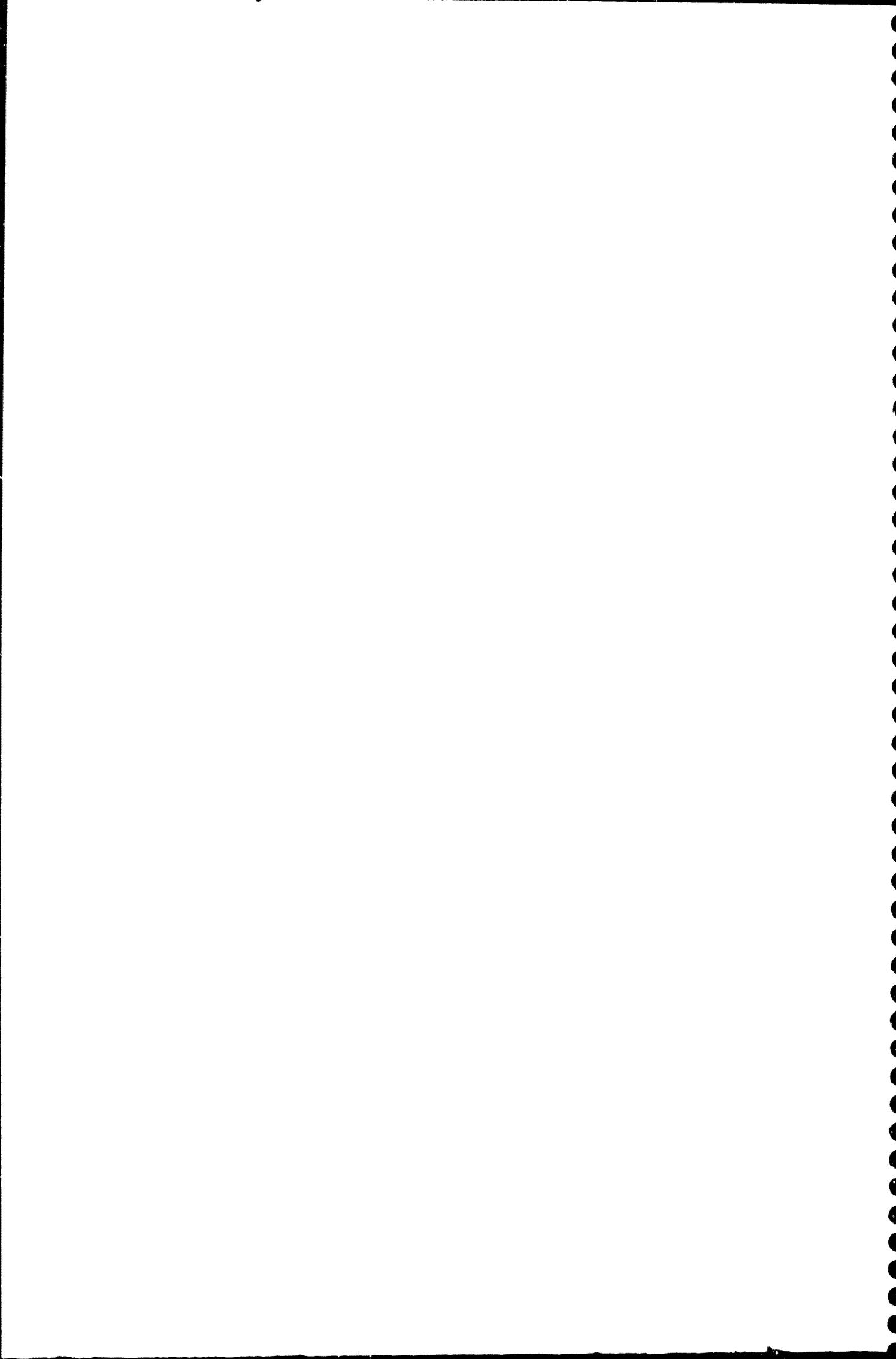
RESUM

Objectiu: Estudiar els canvis immunohistoquímics que es produeixen en les membranes sinovials de genoll de rates durant el curs de l'AA. Determinar l'efecte del tractament amb dexametasona sobre la presència i distribució de cèl·lules immunocompetents en el teixit sinovial artrític.

Material i mètodes: L'AA es va induir a rates Wistar mitjançant una única injecció d'una suspensió de *Mycobacterium burycicum*. Els dies 7, 14, 17, 21, 28 i 42 postinducció es van extreure les membranes sinovials del genoll i immediatament es van congelar en nitrogen líquid. La caracterització immunohistoquímica es va dur a terme en talls criostàtics mitjançant el marcatge, pel mètode peroxidasa-antiperoxidasa, amb els següents AcMo: OX19 (anti-CD5), W3/25 (anti-CD4), OX8 (anti-CD8), OX6 (anti-Ia), OX33 (anti-CD45RABC o anti-LCA) i OX39 (anti-CD25).

Resultats: Els dies de màxima inflamació articular, es va observar un engruiximent de tota la sinòvia i la formació de replegaments de la capa íntima cap a la cavitat articular. Aquests canvis van anar acompanyats de la presència d'un gran nombre de cèl·lules mononuclears i d'alguns neutròfils a la capa subíntima sinovial. En l'estudi immunohistoquímic es van identificar algunes cèl·lules disperses CD5⁺, presents exclusivament en alguns teixits sinovials inflamats (dies 14 i 21 postinducció). També es va demostrar un increment en la proporció de cèl·lules CD8⁺ i en el nombre de cèl·lules CD4⁺ i cèl·lules Ia⁺ en el teixit sinovial artrític respecte al teixit control sa. Les cèl·lules CD25⁺, portadores del IL-2R, es van observar en fases precoces (dia 7) i el seu nombre va ser elevat durant tot l'estudi. El tractament amb dexametasona va aconseguir controlar el procés artrític i el patró immunohistoquímic de les sinòvies procedents d'animals tractats, a excepció de l'increment de cèl·lules CD8⁺, va ser comparable al del teixit sa.

Conclusions: En la membrana sinovial inflamada de rates amb AA s'ha demostrat un augment de cèl·lules mononuclears, a partir del dia 14 postinducció, sense la presència d'acúmul de limfòcits T, suggerint que els macròfags poden ser el tipus cel·lular majoritàriament causant de la sinovitis a l'AA.



Immunohistochemical Changes in Synovial Tissue During the Course of Adjuvant Arthritis

CARME PELEGRÍ, ÀNGELS FRANCH, CRISTINA CASTELLOTE, and MARGARIDA CASTELL

ABSTRACT. *Objective.* To study immunohistochemical changes occurring in knee synovial membranes of rats during the time course of adjuvant arthritis (AA). The effect of treatment with dexamethasone after establishment of arthritis was also studied.

Methods. AA was induced in Wistar rats by means of a single injection of a suspension of *Mycobacterium butyricum*. On Days 7, 14, 17, 21, 28 and 42 after induction, synovial membranes were obtained, frozen and sectioned on a cryostat. Tissue sections were tested by peroxidase-antiperoxidase method, using the following monoclonal antibodies: OX19 (CD5), W3/25 (CD4), OX8 (CD8), OX6 (Ia), OX33 (LCA) and OX39 (CD25).

Results. Knee synovial membranes obtained from arthritic rats on days of maximum inflammation showed few or no CD5+ cells, a higher proportion of CD8+ cells, and a higher number of CD4+ and Ia+ cells than healthy synovial tissues. CD25+ cells were observed from Day 7 postinduction and remained numerous throughout the study.

Conclusion. Few T lymphocytes (CD5+) were found in arthritic synovial membrane, whereas an increase of cells expressing CD8, CD4, CD25, Ia, and LCA was found. These increases (except CD8) are not evident in dexamethasone treated rats. (*J Rheumatol* 1995; 22:124-32)

Key Indexing Terms:

ADJUVANT ARTHRITIS
HISTOLOGY

SYNOVIAL MEMBRANE
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disorder of unknown etiology and pathogenesis. The inflammatory process involves the joint synovium, which becomes markedly thickened due to synovial cell proliferation and infiltration by inflammatory cells. Inflamed tissue, known as pannus, expands into the joint cavity, erodes cartilage and bone, and eventually leads to the destruction of the joint¹. In rheumatoid synovial membranes lymphocytes and plasma cells are infiltrated. Most lymphocytes are T cells, located around the blood vessels², and the number of T helper lymphocytes is 4 to 10 fold that of the T suppressor cytotoxic subset^{3,4}. Plasma cells produce antibodies, like rheumatoid factor^{5,6}. Many small blood vessels are present throughout the synovial tissue and there are fibrin deposits in the articular cavity⁷.

Adjuvant arthritis (AA) is widely used to study the physiology, biochemistry and pharmacology of inflammation, and as a model of cell mediated autoimmune disease, human arthritis and chronic pain. AA was first induced in rats by Stoerk in 1954⁸, and later by Pearson in 1956⁹. AA is

restricted to the rat and can be produced by a single injection of the cell walls of various bacteria or their components. However, the exact immunogen remains unknown. Characteristically, 10-14 days after the injection of adjuvant, swelling, warmth, erythema and tenderness appear in the distal joints and tendons of affected animals. Maximum severity usually develops between Days 14 and 28 postinduction⁹.

Earlier we studied blood lymphocyte subsets in rats during the time course of AA¹⁰. We found lymphocytosis in arthritic animals, and phenotype analysis revealed that the ratio CD4/CD8 decreased in this pathology, since the rise in CD8+ cells was more pronounced than the increase in CD4+ cells. Although the histological changes in the articulation are well characterized in AA^{11,12}, there are few reports of immunohistochemical studies with monoclonal antibodies (Mab), which would allow detailed examination of cellular populations present in inflamed synovial tissue. Our aim was to study immunohistochemical changes occurring in synovial tissue from the knees of arthritic rats during the time course of adjuvant arthritis using Mab against lymphocyte markers. This study allowed us to complete the findings in peripheral blood. We also studied the effect of treatment with dexamethasone (DXT), to determine the influence of this immunosuppressive drug on the presence and distribution of immunocompetent cells in inflamed synovial tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Outbred female Wistar rats (Charles River, Barcelona, Spain) weighing 190-225 g were housed in plastic cages in groups of 4 or 5 with

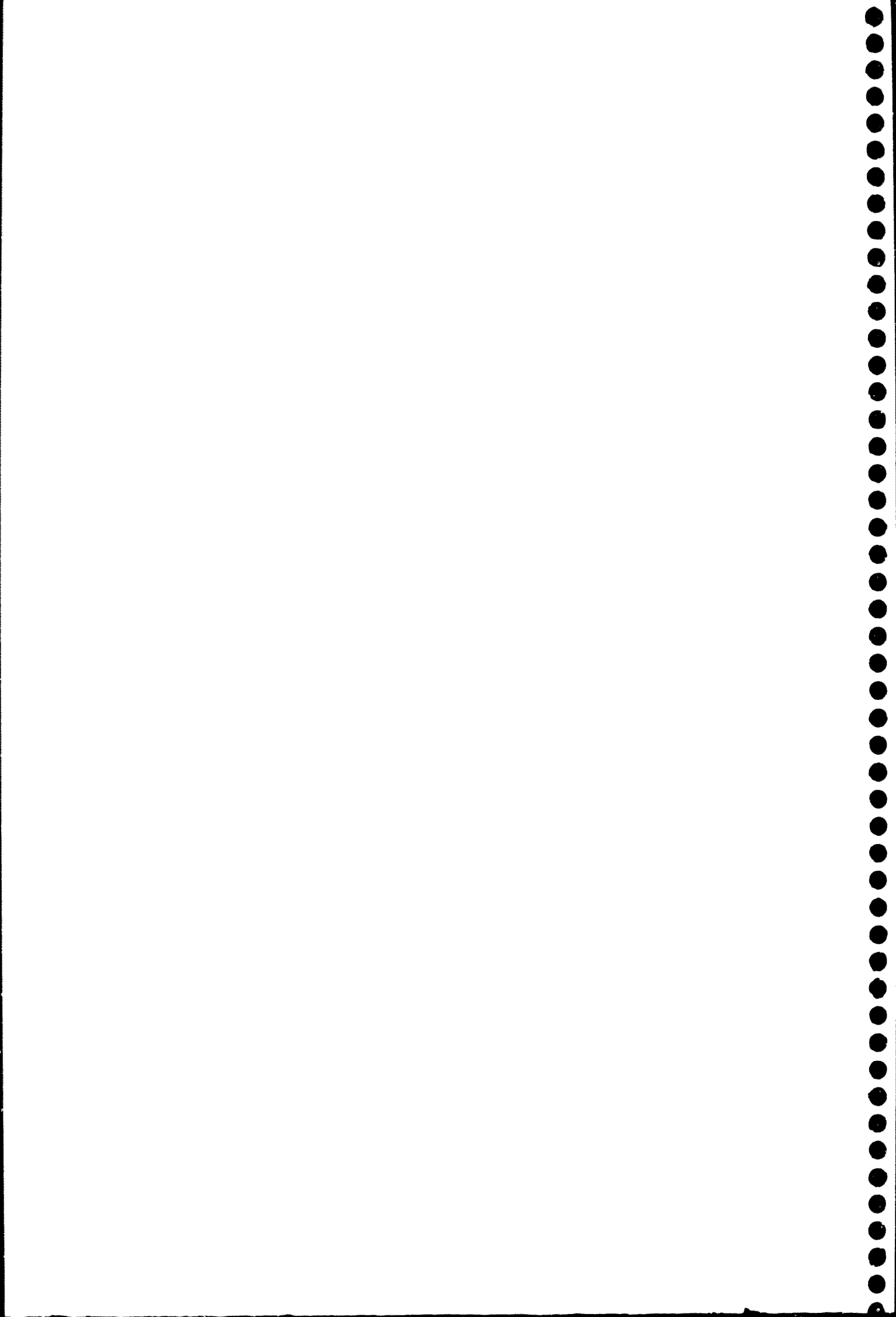
From the Experimental Immunopathology Research Group, Unit of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Supported by grants from the CIRIT and FIS (ref. 92/0707).

C. Pelegrí, PharmM, Recipient of a Fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia; A. Franch, PhD, Associate Professor of Physiology; C. Castellote, PhD, Professor of Physiology; M. Castell, PhD, Professor of Physiology, Faculty of Pharmacy.

Address reprint requests to C. Pelegrí, Unitat de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona (Spain).

Submitted June 9, 1993; revision accepted June 14, 1994.



food and water *ad libitum*. Temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity (55%) and light cycle (on from 8 to 20 h) were controlled.

Induction and assessment of arthritis. Rats were intradermally injected at the base of the tail with 0.1 ml of a liquid vaseline suspension of heat killed *Mycobacterium butyricum* (0.5%) (Difco Laboratories, Detroit, MI). The subsequent lesions in the 4 paws were each graded from 0 to 4 according to erythema and edema of the periarticular tissue. Arthritic index (AI) for each animal was established as the sum of the score for each of the 4 paws. The maximum value of AI was thus 16, and an AI below 2 was considered nonarthritic. Evaluation of arthritis was carried out on Days 7, 14, 17, 21, 23, 25, 28, 35 and 42 postinduction by a double blind method.

Pharmacologic treatment. A group of rats with established arthritis were treated po with DXT at a dose of 0.3 mg/kg/day in a volume of 10 ml/kg body weight, from Day 17 until Day 28 postinduction. The drug was administered as a suspension in an aqueous solution containing carboxymethylcellulose (0.1%) and Tween 20 (0.1%). The arthritic control group received 10 ml/kg body weight of the same vehicle.

Cryostat sections of synovial membranes. Knee synovial membranes from control and arthritic rats were obtained on Days 7, 14, 17, 21, 28 and 42 postinduction. On Day 28, knee synovial membranes from DXT treated rats were also removed. Membranes were scored from 1 to 4 according to edema, bloodstained appearance and size. This score is referred to as synovium index (SI), healthy synovia have an SI of 1. After extraction, synovial membranes without patella and meniscus were immediately embedded in OCT, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for sectioning. Six to eight μm -thick cryostat sections were cut at -30°C . After fixing with acetone for 10 min at 4°C , sections were stored at -20°C for immunohistochemistry assay. To improve the conservation of the morphology of the tissue in sectioning, immunohistochemical staining was performed, in a previous study on spleen, after overnight or 1 h fixation with 1% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH = 7.2).

Monoclonal antibodies. Several mouse antrab Mab were used for the immunohistochemical study. OX19 Mab reacts with the CD5 determinant, which is present in large amounts in all T lymphocytes¹⁴ (Seralab, Sussex, UK). W3/25 reacts with the rat counterpart of the CD4 antigen, which is present on a T helper cell and certain macrophages¹⁵. The OX8 Mab reacts with the CD8 present on T suppressor cytotoxic cells¹⁶ and OX6 reacts with common determinants in the Ia molecules¹⁷. We also used OX33, which recognizes leukocyte common antigen present on B cells¹⁸, and OX39, which reacts with CD25 or interleukin 2 receptor (IL2R)¹⁹ (Seralab, Sussex, UK). CD4, CD8, anti-LCA and anti-Ia Mab were kindly provided by Dr. A. F. Williams, Oxford, UK.

In some experiments, Mab against rat macrophages, ED1 and ED2²⁰, were used. These Mab were kindly supplied by Dr. Dijkstra, Amsterdam, The Netherlands.

Immunohistochemical staining technique. The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method was used. Frozen sections were rehydrated with phosphate buffered saline (PBS) for 10 min. Endogenous peroxidase activity was inhibited with H_2O_2 in PBS (0.3%) for 30 min. After 3 washes in PBS for 10 min each, the tissue was incubated for 20 min with rabbit serum diluted 1:10 in PBS to avoid background. Sections were then incubated with each Mab for 60 min at room temperature. Sections were then washed in PBS (3 \times 10 min). The second step was rabbit antimouse Ig (Dako) (1:40 for 60 min) containing 5% rat serum to avoid background. After further washing, slides were incubated with mouse PAP (Dako) (1:250 in PBS), for 30 min at room temperature. Peroxidase activity was demonstrated by incubation with 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride (DAB, Sigma), 0.25 g/l in PBS. Reaction was stopped with PBS. Nuclear staining was performed with Delafield hematoxylin (Merck). Negative controls were performed both without the primary antibody and with an isotype matched control antibody. Sections were examined with a Reichert Jung Polivar II microscope and photographed on Eukhrome 64E film.

Scoring of positive cells. Sections were scored from 0 to 4 according to

the relative number of positive cells: 0 if no positive cell was found, 1 if the number of positive cells was less than 10%, 2 if the number was between 10-50%, 3 if the number of positive cells was 50-90% and 4 if $> 90\%$ of the cells were positive.

Histologic study. Synovial membranes from some arthritic and some healthy rats were embedded in paraffin, and 8 μm thick sections were cut on a microtome. Conventional hematoxylin-eosin staining (HE) was performed.

Enzymatic digestion of synovial tissue. Cell suspension of synovial tissue was obtained by enzymatic digestion with collagenase P (2 mg/ml) (Boehringer-Mannheim) and DNase (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma).

Statistical analysis. The U Mann Whitney test was used to analyze the data.

RESULTS

Inflammation. The degree of inflammation (measured as arthritic index, AI) of the arthritic group on the different days is shown in Figure 1. The animals did not present any sign of inflammation on day 7 post-induction. By Day 14, 86% (45/52) of the rats injected with *Mycobacterium butyricum* had developed arthritis (AI > 2), and these were selected for the rest of the study, the remaining 7 animals were not used. Healthy animals, which had not received *M. butyricum*, showed AI = 0 throughout the study. Arthritic indices of selected arthritic animals from Day 14 to 42 were significantly higher than those of the healthy animals ($p < 0.01$).

DXT administration produced a decrease in articular swelling (Figure 1), showing significantly lower AI than the untreated arthritic group from 4 days after the beginning of treatment until the last day studied ($p < 0.05$). Thus, on Day 28 the AI of DXT treated rats were not significantly different from those of healthy animals.

Macroscopic study of synovial tissue. Figure 2 shows 2 representative synovial membranes obtained from knees of an arthritic rat on Day 14 and a healthy rat of the same age. The arthritic synovium was much larger (about 3-fold weight) than the healthy tissue and was also bloodstained. Synovium indices scored in arthritic synovial tissue are summarized

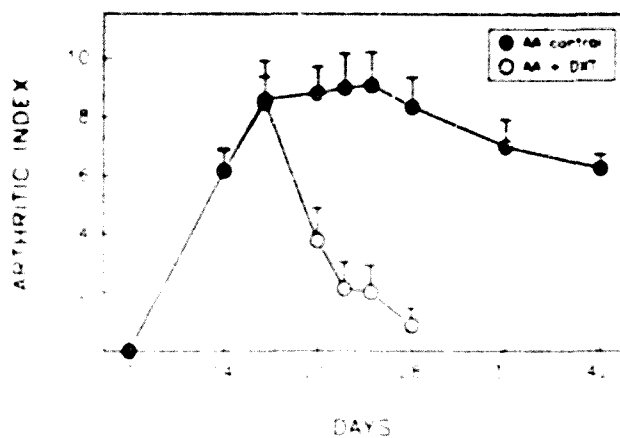


Fig. 1. Time course of arthritic index (mean \pm SEM) measured in arthritic rats (●) and in DXT treated arthritic rats (○). Arthritic index was established as the sum of the score for each of the 4 paws according to erythema and edema of the periarticular tissue (from 0 to 4, each paw). Each point represents the mean of 6-10 animals.

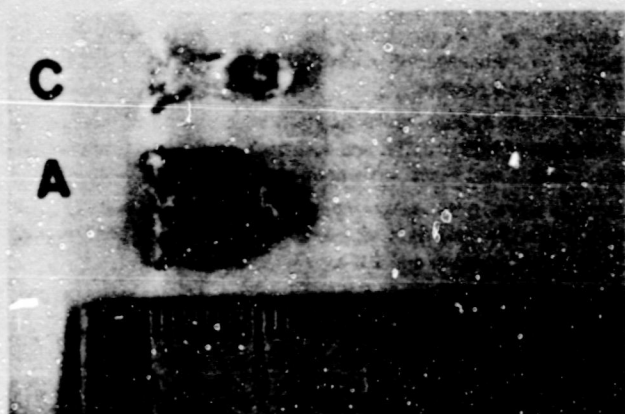


Fig. 2. Synovial tissue obtained from knee of healthy control (C) and arthritic (A) rat from Day 14. Note the differences in the appearance between the 2 synovial membranes.

in Table 1. Synovia from 7 days after induction were similar to those of healthy rats. Those obtained 14 days after induction, however, were the largest and the most blood-stained. There were significant differences between arthritic and healthy synovial scores from Day 14 until the last day of the study (Day 42) ($p < 0.05$).

The synovial membranes obtained on Day 28 from arthritic animals treated with DXT were similar to those of healthy tissues in 25% of cases, according to their synovium scores. However, considering all the tissues studied (Table 1), there were significant differences between treated and healthy membranes ($p < 0.02$).

Histological study. Synovial membranes from healthy knees contained 1 or 2 rows of lining cells (synoviocytes), and fat cells and some blood vessels in the subintimal area (Figure 3A). Collagen webs were scarce in the subintimal area.

Seven days after the induction of arthritis, the appearance of synovial membranes was similar to that of healthy membranes. The only differences seen were a higher number of vessels than in healthy tissues and the presence of some neutrophils in the subintimal area.

Inflammatory changes, such as hyperplasia and hypertrophy of the lining synoviocytes, were observed from Day 14 to 21 postinduction (Figure 3B). The synovial lining was thrown into marked folds. In the subintimal area cell density was high, with a large number of irregularly arranged collagenous fibers. In the joint space next to the synovial lining, some mononuclear cells and neutrophils were seen enmeshed in fibrin webs. No difference was observed between sections through different levels of arthritic synovia.

Four weeks after the induction, knee synovial membranes had a low cell density in the subintimal area, and the lining layer also tended to become reestablished.

Figure 3C shows a synovial membrane from an arthritic rat treated with DXT. This treatment, which reduced artic-

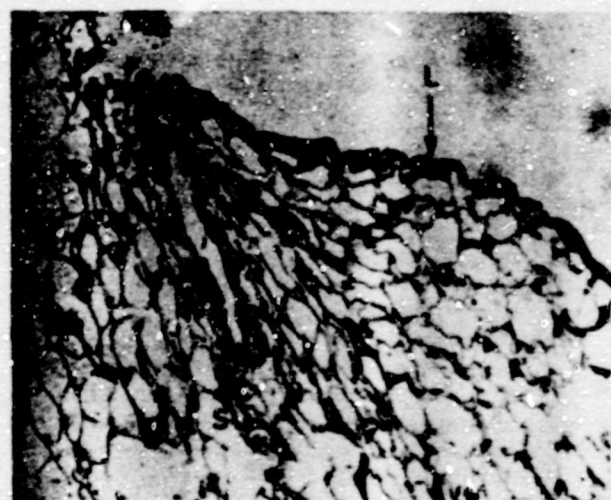
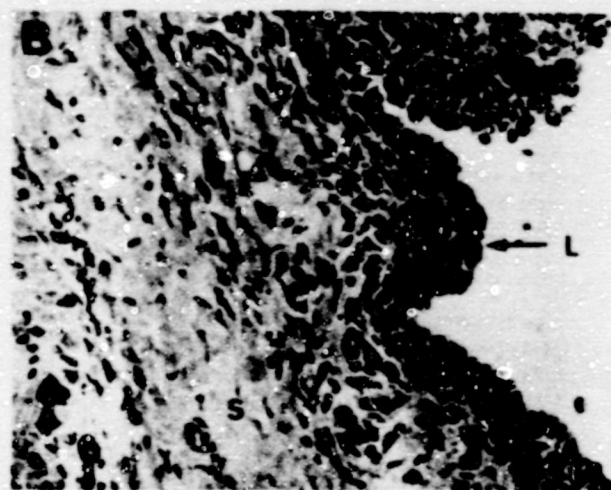
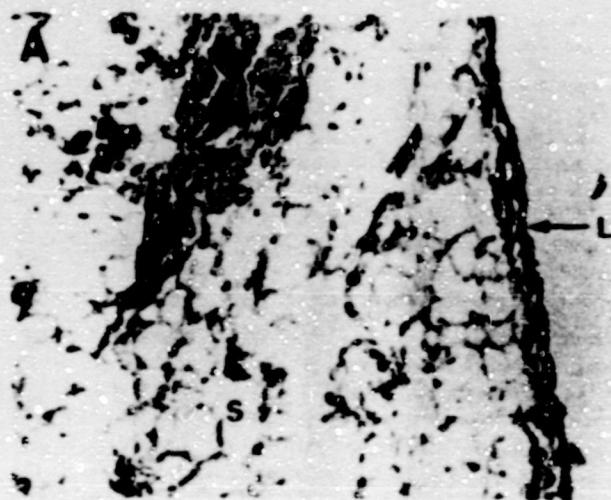


Fig. 3. Histological study of knee synovial membrane by H and E staining. (A) Healthy synovium, (B) arthritic synovium from Day 14 postinduction, (C) synovium from an arthritic rat treated with DXT. Magnification: (A) $\times 144$, (B, C) $\times 225$. L = synovial lining, S = subintimal layer.

Table 1. Mean and range (in brackets) of synovium index scores in synovial tissue from arthritic rats and from DXT treated arthritic rats. Synovium indexes were established from 1 to 4 according to edema, bloodstained appearance, and size. Each mean was obtained from 6-10 animals

Day 7		Day 14		Day 17		Arthritis Day 21		Day 28		Day 42		DXT Day 28	
R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L
1	1	2.50*	2.95*	2*	2.60*	1.40*	1.90*	1.62*	1.37*	1.37*	1.87*	1.31*	1.69*
(1)	(1)	(1-4)	(1-4)	(1-4)	(1-4)	(1-2)	(1-3)	(1-3)	(1-2)	(1-2)	(1-3)	(1-2)	(1-3)

R = tissue obtained from right knee. L = tissue obtained from left knee. * p < 0.05 vs healthy rats

ular inflammation measured as AI, also reduced synovitis. In DXT treated animals, the lining contained 1 or 2 rows of cells, and there was no collagen web. The only difference between healthy and DXT treated tissues was the presence of marked folds in the synovial lining of treated animals.

Immunohistochemical characterization of synovial membrane. To study cell populations of the synovial membrane, frozen sections were cut on a cryostat. To obtain good sections from synovial tissue, various fixation methods were previously assayed in spleen tissue. Paraformaldehyde conserves tissue morphology, but it can denature some antigens. Overnight fixation with paraformaldehyde produced negative results with CD4 and CD5 Mab (data not shown). Fixation with paraformaldehyde for 1 h produced positive results with CD8, anti-Ia and anti-LCA Mab (data not shown). However, with this fixation method a high background was seen and the results with CD4 and CD5 Mab were not as clear as those obtained with acetone. Fixation with acetone gave positive staining for all the Mab assayed. Therefore, although it did not conserve tissue morphology as well as

paraformaldehyde, acetone fixation was chosen to study cell populations in rat synovial tissue.

Every synovial membrane was evaluated according to the number of cells that showed positive staining for each Mab distributed in synovial lining or subintimal area. Results obtained for each antibody from healthy rats and treated and untreated arthritic rats are summarized in Table 2. Figure 4 shows photographs of representative arthritic synovia stained with the Mab assayed.

No CD5+ cell was found in healthy synovial membranes. Some dispersed CD5+ cells were observed in arthritic synovial membranes obtained on Days 14-21 after arthritis induction (Figure 4A). The reduced number of CD5+ cells was confirmed when a cell suspension of several arthritic synovial membranes was examined. This cell suspension was obtained by enzymatic digestion and after overnight incubation at 37°C to remove adherent cells. FACS analysis of this cell suspension showed few cells with the forward/side scatter characteristic of lymphocytes (data not shown).

A large number of CD4+ cells were observed on healthy tissue sections. In arthritic sections, however, the number of positive cells was much higher than in sections obtained

Table 2. Mean and range (in brackets) of scores (from 0 to 4 according to the relative number of positive cells) given by positive cells observed for each antibodies in synovial tissue from healthy, arthritic and DXT treated rats. Each mean was obtained from 6-10 animals

	Healthy Day 0		Day 7		Day 14		Arthritis Day 17		Day 21		Day 28		Day 42		DXT Day 28	
	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
	CD5+	0.28 (0-2)	0.43 (0-2)	0 (0)	0 (0)	0.20 (0-1)	1.60* (1-3)	0 (0)	1 (0-2)	0.40 (0-1)	1.80* (1-3)	0.25 (0-1)	0.75 (0-2)	0.75 (0-2)	0.75 (0-2)	0.12 (0-1)
CD4+	2.71 (2-3)	2.57 (2-3)	2 (2)	2.25 (2-3)	3 (3)	3 (3)	2 (1-3)	2.60 (2-3)	2.40 (2-3)	2.80 (2-3)	2.50 (2-3)	2.50 (2-3)	2 (0-3)	2 (0-3)	2.43 (1-3)	2.37 (2-3)
Ia+	2.83 (2-3)	2.28 (2-3)	2.25 (2-3)	2 (2)	2.60 (2-3)	2.80 (2-3)	2.60 (2-3)	2.60 (2-3)	2.80 (2-3)	3* (3)	2.62 (2-3)	2.87* (2-3)	2.75 (2-3)	2.50 (2-3)	2.25 (1-3)	2.50 (2-3)
CD8+	0.71 (0-2)	0.71 (0-1)	1 (0-2)	1.25 (0-2)	0.60 (0-2)	1.80* (1-3)	1 (0-2)	1.75* (1-3)	1.20 (0-2)	2.40* (2-3)	0.75 (0-2)	1.62* (1-2)	0.75 (0-2)	0.75 (0-2)	1.57 (1-3)	1.37* (1-2)
LCA+	0.71 (0-2)	1.14 (0-2)	1.50 (0-3)	1.50 (1-2)	1.40 (0-3)	2.20* (1-3)	1.20 (0-2)	1.60 (0-3)	1.20 (0-2)	1.80* (1-3)	1.25 (0-2)	1.62 (1-2)	1.75 (1-2)	1.75 (1-2)	0.43 (0-1)	1 (0-2)
E.2R+	0.71 (0-2)	1.43 (0-2)	2* (1-3)	2 (2)	1.40 (1-2)	1.60 (0-2)	1.40 (1-2)	1.80 (1-3)	1.20 (0-2)	2 (1-3)	1.75* (1-2)	1.87 (1-2)	1.75* (1-2)	2 (2)	0.57 (0-2)	1.37 (0-2)

* p < 0.05 vs healthy rats. L = synovial lining. S = subintimal area.

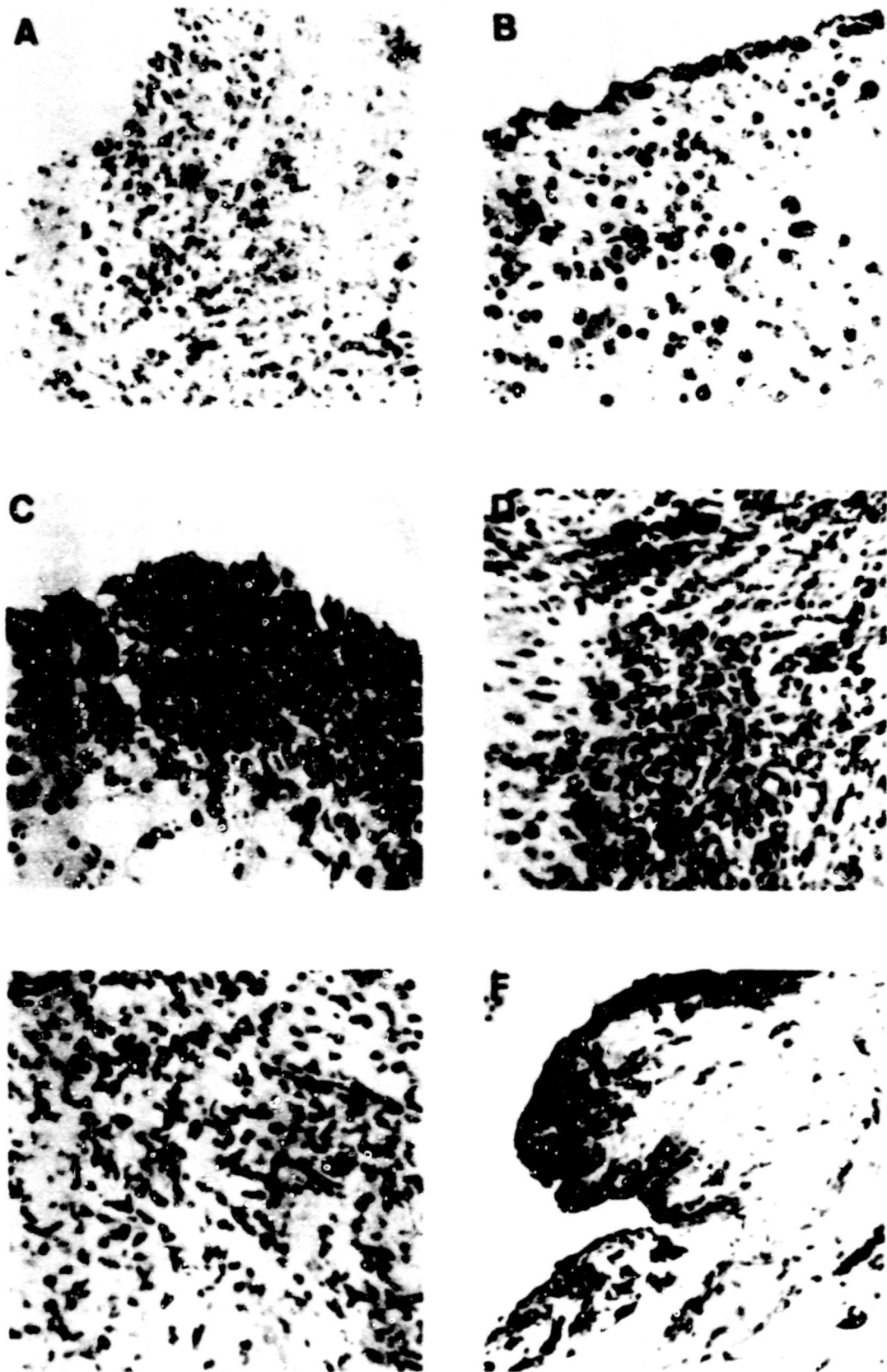


Fig. 4. Cryostat sections of arthritic rat synovial membranes stained by PAP method. (A) CD5+ cells (tissue from Day 14 postinduction), (B) CD4+ cells (tissue from Day 17 postinduction), (C) Ia+ cells (tissue from Day 21 postinduction), (D) CD8+ cells (tissue from Day 21 postinduction), (E) LCA+ cells (tissue from Day 14 postinduction), and (F) E-2R+ cells (tissue from Day 7 postinduction). Magnification $\times 225$.

from healthy animals both in the synovial lining and the subintimal area. When we considered the proportion between positive and negative cells, arthritis induction did not produce any change in the proportion of CD4+ cells. Figure 4B shows a section of an arthritic synovial membrane obtained on Day 17 postinduction and stained with CD4 antibody.

Anti-Ia antibody showed a high percentage of positive cells in the lining of both healthy and arthritic synovial membranes. However, a significantly higher percentage of Ia+ cells in the subintimal area of arthritic tissues was observed on Days 21 (Figure 4C) and 28 ($p < 0.05$ with respect to healthy animals) (Table 2).

Incubation with CD8 antibody led to a significantly higher percentage of positive cells in the subintimal layer of arthritic synovial membranes obtained on Days 14–28 postinduction (Figure 4D) with respect to healthy animals, which showed only a few CD8+ cells in their synovial membranes ($p < 0.05$) (Table 2).

Nonarthritic animals presented only a few LCA+ cells on their synovial membranes. Induction of AA was followed by a significantly higher percentage of LCA+ cells in synovial membranes from Day 14 (Figure 4E) to Day 21 postinduction with respect to healthy animals ($p < 0.05$) (Table 2).

CD25 antibody showed significant differences between healthy and arthritic membranes. Arthritic tissues from Day 7 to 42 postinduction showed a higher number of CD25+ cells at the synovial lining ($p < 0.05$ compared to healthy tissues) (Table 2). Synovial tissue obtained on day 7 postinduction is shown in Figure 4F.

Staining of macrophages with ED1 and ED2 Mab was carried out in several arthritic synovial membranes. These results were compared to those obtained in consecutive sections with anti-CD5, anti-CD4 and anti-CD8 Mab. Figures 5A and 5B show the presence and distribution of ED1+ and ED2+ cells in a synovial membrane obtained on Day 14 postinduction. The distribution, size and morphology of monocyte/macrophage cells are similar to those observed for CD4+ and CD8+ cells (Figures 5C and 5D, respectively)

in the same synovial membrane. However, no CD5+ cell was observed (Figure 5E).

Synovial membranes obtained on Day 28 from rats treated with DXT showed similar characteristics to those obtained from healthy tissues for CD4, CD5, anti-Ia, anti-LCA and CD25 Mab. Only in the case of CD8 antibody was the percentage of positive cells similar to that of arthritic synovia (Table 2).

DISCUSSION

Synovial membrane cells of arthritic rats during the time course of AA were studied using immunohistochemical techniques. For this purpose synovial tissue was obtained from arthritic rats on Days 7, 14, 17, 21, 28 and 42 postinduction. We have also analyzed synovial membranes from healthy rats and arthritic rats treated with DXT.

Immunohistochemical study was performed on cryostat sections of synovial membranes. Rat synovium contains many fat cells, which hinders cryostat section. Fixation was first tested with paraformaldehyde, which conserves morphology effectively. However, this agent, used overnight or for only 1 h, denatured certain antigens and produced background interference. Therefore, although it does not produce such good tissue preservation as paraformaldehyde, acetone fixation was chosen to study cell populations in rat synovial tissue.

Immunohistochemical analysis of healthy knee synovial membranes revealed that there were only a few or no CD5+, CD8+, LCA+ and CD25+ cells. However, a large number of CD4+ and Ia+ cells were present in the healthy membranes. This is not surprising, since CD4 antigen is present in macrophage-like cells (synoviocytes A)²¹ and Ia antigen is present in dendritic cells²², in addition to activated lymphocytes and B cells¹⁷.

In the early stages of AA (Day 7 postinduction), without any sign of inflammation, knee synovial membranes of induced animals showed few changes. HE staining revealed the presence of more blood vessels than healthy membranes. PAP staining showed a pattern similar to that of noninduced

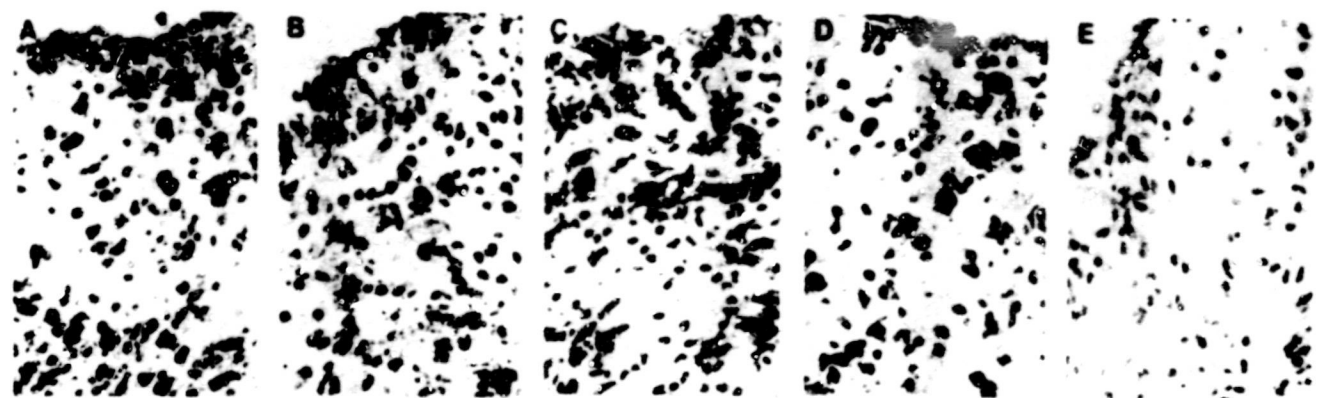


Fig. 5. Cryostat sections of arthritic rat synovial membranes stained by PAP method. (A) ED1+ cells, (B) ED2+ cells, (C) CD4+ cells, (D) CD8+ cells, (E) CD5+ cells. Magnification $\times 175$.

animals; the only exception was the presence of cells bearing IL-2R. CD25+ cells were scarcely seen in healthy tissue, but 7 days after induction the percentage increased. These cells could be activated lymphocytes, but dendritic cells of synovial lining cannot be ruled out. Moreover, CD5+ cells were not found in arthritic synovial tissue on Day 7, and it has been described that the antibody used against CD25 (OX39) is able to label some dendritic cells¹⁹.

From Day 14, when arthritis signs were well established, arthritis induction led to great alterations in knee synovial membranes. The synovial lining became thicker and tended to form large folds in the articular cavity. A higher number of cells appeared in the subintimal area, many of which were mononuclear, although neutrophils were observed in some samples. Clear lymphocyte clusters were not seen. This finding disagrees with histological analysis of Pearson, *et al*¹¹, although Mohr, *et al*¹² and Turog¹³ did not report lymphocyte clusters. Moreover, the immunohistochemical analysis showed few or no CD5+ cells in the synovia of arthritic animals, and the reduced number of lymphocytes in diseased tissue was confirmed after tissue digestion and posterior analysis by flow cytometry. This result does not agree with the histochemical study reported by Larsson, *et al*⁴ or with that by DeJoy, *et al*⁵, who performed digestion of synovial membranes from AA rats 7 days postinduction, and who were able to quantify CD5+ cells. Issekutz, *et al*⁶ were also able to quantify T lymphocyte accumulation in adjuvant arthritic synovia by a kinetic study. The differences between these results and ours could indicate the presence of lymphocytes in synovial tissue in a short phase of the disease, or a restricted location of the lymphocytes, which we did not detect, although sections from several levels of the tissue were studied.

Many CD4+ cells were observed in arthritic synovia after Day 14 postinduction. Most of the CD4+ cells appeared to be macrophages, because of their size and the cytoplasmic staining observed that is characteristic of this kind of cell⁷. To determine the distribution of macrophages in arthritic synovia, we performed a further analysis of some tissues with ED1 and ED2 markers. The size, morphology of ED1+ and ED2+ cells and their distribution was similar to that of CD4+ cells. Therefore the low number of CD5+ cells and the high number of macrophages seen with ED1 and ED2 Mab suggest that most CD4+ cells observed in arthritic synovia were cells of the macrophage/monocyte line, which could be a result of proliferation of lining synoviocytes and/or an increased recruitment of monocytes.

On the other hand, a higher number of Ia+ cells was also observed in arthritic tissue from 14 days after arthritis induction. The number of these cells was again higher than the number of CD5+ cells, showing that they were not activated lymphocytes but possibly dendritic cells that are Ia+, as Steinmann, *et al*²⁰ described. The high number of macrophages and dendritic cells may contribute to the patho-

genesis of AA, as has been described in rheumatoid arthritis²¹, collagen induced arthritis and antigen induced arthritis^{22, 29, 30}.

The immunohistochemical analysis of knee synovial membranes after the establishment of AA also revealed several CD8+ cells dispersed on the synovial lining and subintimal areas of arthritic tissue. These results were not expected after the observation of CD5+ cells. Anti-CD8 antibody appears to stain not only T cells, since the number of CD8+ cells is higher than the number of CD5+ cells. The relatively high number of CD8+ cells could reflect the presence of T cells bearing gamma-delta receptors, some of which are found to be CD8+ and CD5+³¹. This would not be surprising, since T gamma-delta lymphocytes recognize mycobacterial determinants^{32, 34} and can be observed in human arthritic synovia³³. However, when we tested anti-CD8 and ED1 or ED2 Mab in consecutive sections, the size and distribution of positive cells were similar. Anti-CD8 Mab reactivity needs clarification, but our results indicate that it may recognize macrophage-like cells.

The presence of B lymphocytes was also studied in knee arthritic synovia by OX33 antibody, which reacts with LCA present in rat B lymphocytes, but not in T cells³⁵. We observed a higher number of LCA+ cells in arthritic synovia than in healthy tissue. Further analysis of positive cells revealed that most LCA+ cells were mononuclear and too large to be lymphocytes. So, OX33 antibody may have stained proliferating or infiltrating mononuclear cells, instead of being specific for B lymphocytes. New studies about OX33+ cells in arthritic synovium are necessary.

In order to determine the effect of an immunosuppressor drug on immunocompetent cell distribution in arthritic synovia, we treated arthritic animals with DXT from Day 17 to 28 postinduction. This treatment led to a reduction in articular swelling, and by macroscopic analysis, treated synovia appeared almost similar to healthy tissues. The immunohistochemical study revealed a decrease in the number of positive cells for the antibodies studied. Only CD8+ cells were present in the same proportion in synovia obtained from DXT treated animals and in membranes from untreated animals. DXT has potent antiinflammatory properties that appear to be mediated by the induction of a phospholipase inhibitory protein³⁶ and, recently, it has been described that DXT inhibits the expression of collagenase and other secreted proteases³⁷. These actions could be the causes of restoration of synovitis, but it is surprising that DXT did not affect CD8+ cell distribution. Further knowledge of CD8+ cells in arthritic synovia would help to explain the effect of DXT on these cells.

In summary, the study of cell populations present in inflamed synovial tissue of adjuvant arthritic rats revealed that the number of mononuclear cells greatly increased from Day 14 postinduction, but no lymphocyte cluster was seen. Sparse CD5+ cells were observed in AA, which suggests that syn-

ovitis in AA could be due mainly to macrophages rather than to T lymphocytes. To complete our earlier findings about peripheral blood lymphocytes in this pathology, here we used the same range of antibodies. However, the results showed that Mab against well defined subsets of lymphocytes are able to react to other tissue cells. This was observed with anti-CD4 Mab, which is known to stain some macrophages, but also in OX8 (against CD8) and OX33 (against LCA of B lymphocytes). Further studies about OX19- OX8+ cells, OX19- OX39+ cells and OX33+ cells are required and could be important in understanding the arthritic process.

ACKNOWLEDGMENT

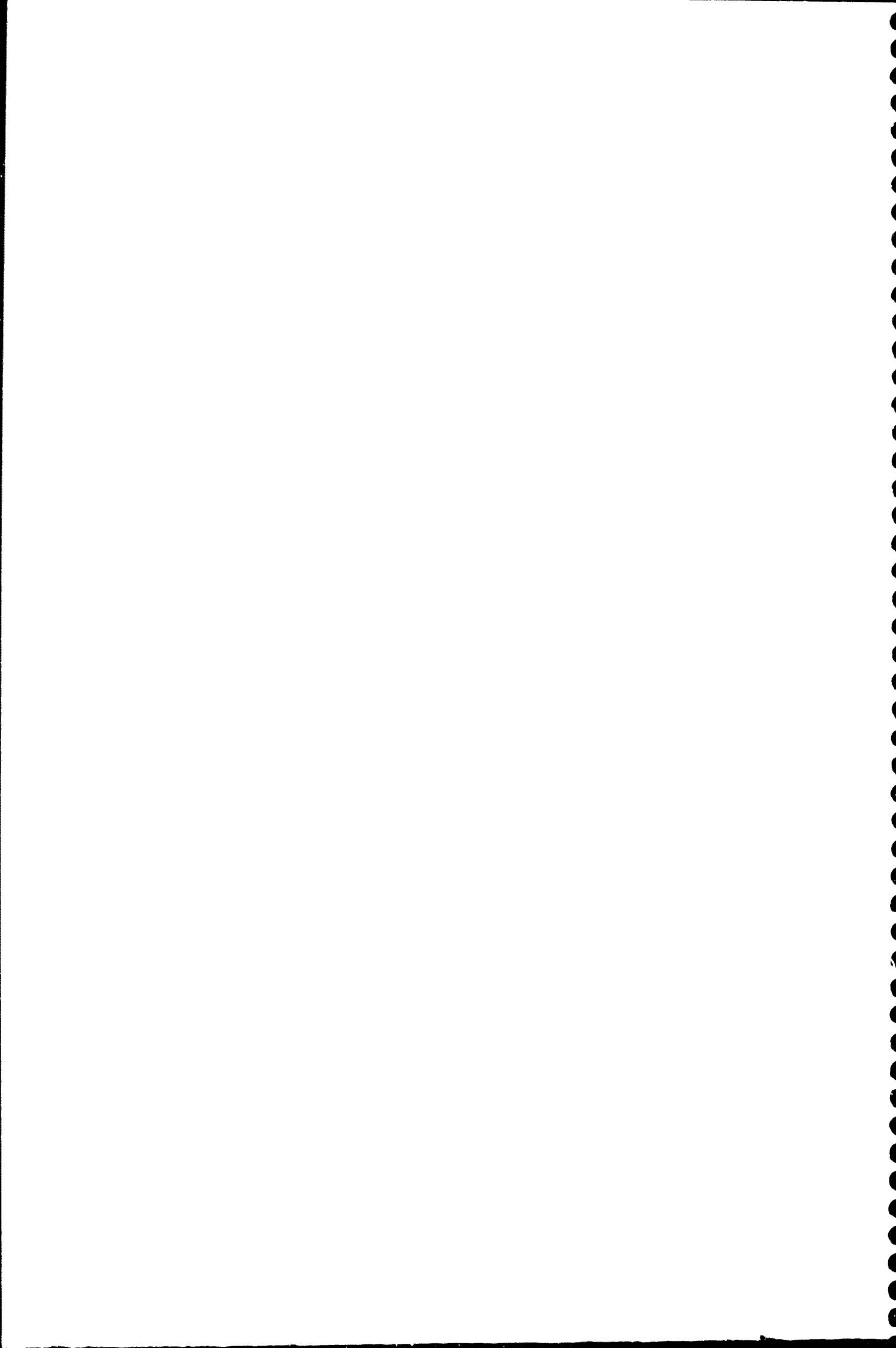
The authors thank Dr Josep G Vaiero for his help in making the photographs, Dr Isidre Ferrer for his contribution to the histologic study and Dr Jordi Vilaplana for his assistance with the statistical analysis of the data. The authors are also grateful to Mr Robin Rycroft for his assistance in the English preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis: Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277-89.
- Meijer CJLM, van de Putte LBA, Lafeber GJM, De Haas E, Cats A. Membrane and transformation characteristics of lymphocytes isolated from the synovial membrane and paired peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1990;39:75-81.
- Duke O, Panayi G, Janossy G, Poulter LW. An immunohistological analysis of lymphocyte subpopulations and their microenvironment in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1982;49:22-30.
- Meijer CJLM, Graaf-Reitsma CB, Lafeber GJM, Cats A. *In situ* localization of lymphocyte subsets in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis with monoclonal antibodies. *J Rheumatol* 1982;9:359-65.
- Nakao H, Eguchi K, Kawakami A, et al. Phenotypic characterization of lymphocytes infiltrating synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: analysis of lymphocytes isolated from minced synovial tissue by dual immunofluorescent staining. *J Rheumatol* 1990;17:142-8.
- d'Eshouges JR, Delacambre B, Leonardelli J, Defrance D, Ramaert-Guillot M, Ramaert-Guillot B. Seconde vues sur la présence de fer dans la synoviale articulaire. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1976;43:469-73.
- Stoerk HD, Bieleński TC, Bedzelovich T. Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants. *Am J Pathol* 1954;30:615.
- Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;91:95-101.
- Castell M, Castellote MC, Queralt J. Anti-immunoglobulin antibody detection in adjuvant arthritis by an ELISA technique. *Pathol Res Pract* 1986;181:664-7.
- Franch A, Castellote C, Castell M. Blood lymphocyte subsets in rats with adjuvant arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:461-6.
- Pearson CM, Waksman BH, Sharp JT. Studies on arthritis and other lesions induced in rats by mycobacterial adjuvant V. Changes affecting the skin and mucous membranes. Comparison of experimental process with human disease. *J Exp Med* 1961;113:485-91.
- Pearson CM, Wood FD. Studies of arthritis and other lesions in rats by the injection of mycobacterial adjuvant. VII. Pathological details of the arthritis and spondylitis. *Am J Pathol* 1963;42:73-87.
- Taniguchi JD, Argente DC, McReynolds RA. Adjuvant arthritis. *Methods Enzymol* 1988;162:639-55.
- Dailman MJ, Thomas ML, Green JR. MRC OX-19. A monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses. *Eur J Immunol* 1984;14:260-7.
- White RAH, Mason DW, Williams AF, Galfre G, Milstein C. T-lymphocyte heterogeneity in the rat. Separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J Exp Med* 1978;148:664-73.
- Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR, Mason DW, Williams AF. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1980;10:619-15.
- McMaster WR, Williams AF. Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol* 1979;9:426-33.
- Woollet GR, Barclay AM, Puklavec M, Williams AF. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985;15:168-73.
- Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, et al. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50 000 M_r detected only on CD4 positive blasts. *Mol Immunol* 1987;24:1281-90.
- Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985;54:589-99.
- Jefferies WA, Green JR, Williams AF. Authentic T helper CD4 (W3.25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1985;162:117-27.
- Steinmann RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells: features and functions. *Immunol Rev* 1980;53:127-47.
- Mohr W, Wild A. Adjuvant arthritis. *Arzneim Forsch (Drug Res)* 1976;26:1860-6.
- Larsson E, Holmdahl R, Klareskog L. *In vivo* treatment with W3.13 (anti-pan T) but not with OX8 (anti-cytotoxic suppressor T) monoclonal antibodies impedes the development of adjuvant arthritis in rats. *Immunology* 1985;56:383-91.
- DeJoy SQ, Ferguson-Chanowitz K, Oronsky AL, Zabriskie JB, Kerwar SS. Studies of the homing of Mycobacterium-sensitized T lymphocytes to the synovium during passive adjuvant arthritis. *Cell Immunol* 1990;130:195-203.
- Issekutz AC, Issekutz TB. Quantitation and kinetics of polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte accumulation in joints during adjuvant arthritis in the rat. *Lab Invest* 1991;64:656-63.
- Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Dencker L, Gustafson G, Larsson E. Appearance of different lymphoid cells in synovial tissue and in peripheral blood during the course of collagen II-induced arthritis in rats. *Scand J Immunol* 1985;21:197-204.
- Poulter LW, Duke O, Hobbs S, Janossy G, Panayi G, Seymour G. The involvement of interdigitating (antigen presenting) cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Exp Immunol* 1983;51:247-54.
- Johnson WJ, Muirhead KA, Meunier PC, et al. Macrophage activation in rat models of inflammation and arthritis. *Arthritis Rheum* 1986;29:1122-30.
- Dijkstra CD, Dopp EA, Vogels MC, Van Noorden CJF. Macrophages and dendritic cells in antigen-induced arthritis. An immunohistochemical study using cryostat sections of the whole

- knee joint of rat. *Scand J Immunol* 1987;28:513-23.
31. Goodman T, Lefrançois L: Expression of the $\gamma\delta$ T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 1988;333:855-8.
32. Raulat DH: Antigens for $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 1989;339:342-3.
33. O'Brien R, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK: Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 1989;57:667-74.
34. Born W, Hall L, Dallas A, et al: Recognition of a peptide antigen by heat shock reactive $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Science* 1990;249:67-9.
35. Andreu JL, Trujillo A, Alonso JM, Mulero J, Martínez-A C: Selective expansion of T cells bearing the $\gamma\delta$ receptor and expressing an unusual repertoire in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:1008-14.
36. Flower RJ: Background and discovery of lipocortins. *Agents Actions* 1985;17:255-62.
37. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park K-K, et al: Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; 62:1189-204.

Article 2



DEPLETION OF γ/δ T-CELLS DOES NOT PREVENT OR AMELIORATE, BUT RATHER AGGRAVATES RAT ADJUVANT ARTHRITIS

Arthritis and Rheumatism (en premsa)

RESUM

Objectiu: Esbrinar la possible implicació dels limfòcits T- γ/δ mitjançant l'administració d'un tractament amb un AcMo anti-TCR- γ/δ en diferents fases de la patologia.

Material i mètodes: L'AA es va induir a rates Lewis mitjançant una única injecció d'una suspensió de *Mycobacterium tuberculosis*. L'AcMo anti-TCR- γ/δ V65 es va administrar a rates amb AA seguint diferents protocols: un protocol preventiu, en el qual es van tractar rates noutates amb dosis progressives de V65 durant 8 setmanes, fins al moment de la inducció de l'AA; i dos protocols curatius, iniciats abans i durant el màxim d'inflamació, respectivament. La gravetat de l'artritis es va avaluar mitjançant paràmetres clínics (índex d'artritis i increment de volum articular), hematològics (VSG) i histològics (grau de destrucció de l'articulació de tornell). L'efecte de l'AcMo sobre les cèl·lules diana en sang i ganglis limfàtics es va analitzar per citometria de flux.

Resultats: L'administració de l'AcMo V65, en els diferents protocols utilitzats, va conduir a l'absència de limfòcits amb expressió normal del TCR- γ/δ . Aquest efecte cel·lular, observat en sang i en ganglis limfàtics, no va comportar modificacions en els paràmetres clínics ni hematològics de l'AA. Ara bé, quan el tractament es va iniciar abans del màxim d'inflamació, es va observar un grau de destrucció articular significativament superior al de les rates artrítiques control.

Conclusions: Els limfòcits T- γ/δ no intervenen en el desenvolupament ni en la perpetuació de l'AA. L'empitjorament en la destrucció articular observat quan el tractament s'inicia abans d'assolir la màxima inflamació articular suggereix un paper protector fase-depenent dels limfòcits T- γ/δ a l'AA.

Arthritis & Rheumatism

Official Journal of the American College of Rheumatology

William P. Arend, M.D.
Editor

1 September, 1995

Dr. Carme Pelegri
Unit of Physiology
Faculty of Pharmacy
Av. Joan XXIII s/n
08028 Barcelona
SPAIN

RE: Manuscript # 95D-55-FL/RV

Dear Dr. Pelegri,

We are pleased to accept for publication in *Arthritis and Rheumatism* your manuscript entitled, "Depletion of gamma/delta T-Cells Does Not Prevent or Ameliorate, But Rather Aggravates Rat Adjuvant Arthritis."

You will receive a set of proofs when the galleys return from the printer. Please contact Jane Diamond, Managing Editor, if you have any questions concerning the preparation of your manuscript. She can be reached at:

The American College of Rheumatology
60 Executive Park South
Suite 150
Atlanta, GA 30329
404-633-3777

Sincerely,



William P. Arend, M.D.
Editor

Arthritis and Rheumatism Editorial Office
University of Colorado Health Sciences Center, B-117
4200 E. Ninth Avenue, Denver, CO 80262
303-270-6655 FAX 303-270-7593

DEPLETION OF γ/δ T-CELLS DOES NOT PREVENT OR AMELIORATE, BUT RATHER AGGRAVATES RAT ADJUVANT ARTHRITIS

By Carme Pelegrí, Petra Kühnlein, Eberhard Buchner, Carsten B. Schmidt, Angels Franch, Margarida Castell, Thomas Hünig, Frank Emmrich, and Raimund W. Kinne.

Carme Pelegrí, PharmM, Angels Franch, PhD, Professor of Physiology, Margarida Castell, PhD, Professor of Physiology: Experimental Immunopathology Research Group, Unit of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain; Petra Kühnlein, Biologist, Thomas Hünig, PhD, Professor of Immunology: Institute of Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; Eberhard Buchner, Graduate Student, Carsten B. Schmidt, Graduate Student, Raimund W. Kinne, MD, Senior Research Associate: Immunology Unit, Department of Medicine III, University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany; Frank Emmrich, MD, Professor of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Institute of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany.

C. Pelegrí is supported by a grant of Ministerio de Educación y Ciencia, Spain; P. Kühnlein by SFB 165, Germany; E. Buchner and C. Schmidt by the Graduiertenkolleg Erlangen, Germany; Prof. Emmrich and Dr. Kinne by the German Ministry for Research and Technology (BMFT; FKZ 01 VM 8702 and 01 VM 9311).

Address reprint requests to: Carme Pelegrí, Unit of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Key words: γ/δ T cells, immunoregulation, adjuvant arthritis.

Running head: γ/δ T cells in rat adjuvant arthritis

γ/δ T-cells preferentially recognize mycobacterial antigens in humans and mice and are increased in peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Treatment of mycobacterium-induced rat adjuvant arthritis with a monoclonal antibody directed against the γ/δ -TCR revealed that γ/δ T-cells do not promote or perpetuate arthritis, but may rather play a protective role.

ABSTRACT

Objective: To investigate the role of γ/δ T-cells in *Mycobacterium tuberculosis*-induced rat adjuvant arthritis (AA).

Methods: Rats with AA were injected with the anti- γ/δ -TCR monoclonal antibody (MAb) V65 according to a preventive and to a pre-peak and a late therapeutic schedule. Arthritis severity and joint destruction were monitored, and depletion of target cells was analyzed by flow cytometry.

Results: Although all protocols successfully depleted γ/δ -TCR^{bright} cells in peripheral blood and lymph nodes, none of the regimens influenced clinical parameters of AA. If rats were treated before the clinical peak of AA, however, joint destruction was significantly more severe than in vehicle-treated rats.

Conclusion: γ/δ T-cells do not promote or perpetuate rat AA. Aggravation of joint destruction upon pre-peak anti- γ/δ treatment suggests a stage-dependent protective role of γ/δ -T-cells in AA.

INTRODUCTION

A subpopulation of T-cells expresses a TCR distinct from the conventional α/β -TCR, i.e., a TCR composed of a γ and a δ chain (1). In humans (2) and mice (3), γ/δ T-cells preferentially recognize mycobacterial antigens, such as heat shock or stress proteins (4), and dominate the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis* (MT).

γ/δ T-cells are enriched in peripheral blood and synovial fluid of patients with juvenile rheumatoid arthritis (5), as well in adults with rheumatoid arthritis (RA; 6, 7), although the latter finding appears controversial (8). In addition, γ/δ T-cells appear to bear pathogenetic relevance in collagen-induced arthritis (CIA) in mice (9). It is therefore conceivable that γ/δ T-cells may also be relevant in other experimental models of arthritis, such as rat adjuvant arthritis (AA), in particular since rat AA is induced by mycobacterial antigens (10).

In rat AA, treatment with the monoclonal antibody (MAb) R73 directed against the α/β -TCR (11) ameliorated arthritis when given in established disease, and completely prevented it when given from birth until induction of the disease (12, 13). However, it remained to be excluded whether γ/δ T-cells also play a role in AA, either independently of α/β T-cells, or on the basis of mutual helper functions (14). This question can now be directly answered, as a MAb directed against the rat γ/δ -TCR, named V65, has recently become available (15).

Regimens with the MAb V65 initiating around or before the clinical peak of arthritis, as well as postnatal treatment for 8 weeks before induction of AA, were therefore applied. The effects were monitored by assessment of clinical, hematological, and histological signs of arthritis; fluorocytometric analyses of the γ/δ and α/β T-cell subpopulations were performed in peripheral blood, popliteal, and mesenteric lymph nodes. Control treatments were either vehicle (phosphate-buffered saline; PBS), or the MAb MAX.16H5 (16) as isotype-matched Ig with irrelevant specificity; the above mentioned anti- α/β -TCR MAb R73 (11) was used as positive control.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Female Lewis Crl/Br rats (7-9 weeks old) and pregnant Lewis Crl/Br rats were purchased from Charles River Wiga (Sulzfeld, Germany). Lewis 1F rats (6-9 months old) were obtained from the Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover, Germany). They were housed two per cage, with food and water *ad libitum*. Constant temperature (21°C), relative humidity (60%), and a 12 h light-dark cycle were maintained. The animals were allowed 2 weeks to adjust to the housing conditions before the experiments began.

Induction and assessment of AA: Rats were injected intradermally into the tail base with 0.5 mg of heat-killed MT (R37 Ra; Difco, Detroit, MI, USA) in 0.1 ml of paraffin oil (Riedel de Hën AG, Seelze, Germany). For determination of the arthritic score, lesions of

the four paws were graded from 0 to 4 according to the extent of erythema and edema of the periarthritic tissue as described by Wood et al. (17). The maximum score per animal was 16. One or 2 days before initiating treatment, the animals were subdivided into groups with equal mean severity of arthritis. All scorings were performed in a blinded fashion. The hind paw volume was measured using a non-invasive plethysmometer chamber (Ugo Basile, Comerio, Italy), and expressed as the mean of the volumes of both hind paws. The body weight of the rats was monitored with a balance (precision 1 g; Sartorius, Göttingen, Germany). For all parameters, the results of treated and untreated AA rats were compared with those of normal, non-arthritic rats.

Antibodies: The MABs R73 to the rat α/β -TCR (mouse IgG₁; 11) and V65 to the rat γ/δ -TCR (mouse IgG₁; 15) were used. The concentration of MAB R73 in ascites was determined using a standard ELISA technique (18). The concentration of MAB V65 in PBS-dialyzed ascites was analyzed by titration with a TCR- α/β , γ/δ ⁺, CD3⁺ T cell hybridoma (III.89.1.4; 15), using indirect immunofluorescence, fluorocytometry, and a MAB V65 standard. An isotype-matched anti-human CD4 MAB (MAX.16H5; mouse IgG₁; 16) was used as negative control. MAB OX19 (anti-CD5) was a kind gift of Dr. A. Williams (19), and MAB 1F4 (anti-CD3) was kindly provided by Dr. M. Miyasaka (20). For immunofluorescence assays, MABs were purified and FITC-labeled by standard techniques. Phycoerythrin-conjugated F(ab')₂ donkey anti-mouse IgG [F(ab')₂ donkey anti-mouse-IgG-PE] was purchased from Dianova (Hamburg, Germany).

Optimization of the doses for treatment: To determine the dose of MAB V65 sufficient to deplete γ/δ -TCR⁺ cells in peripheral blood and lymph nodes, adult normal Lewis 1F rats received a single i.p. injection of 0.1 or 0.5 mg PBS-dialyzed V65 ascites. On days 2, 4, and 8 after injection, PBMC, and cervical lymph nodes were obtained. Cell preparation and consecutive fluorocytometric analyses were performed as described below. The results were compared with those of vehicle-injected control rats.

Treatment protocols: Two different treatment protocols were performed in adult rats: A) around the peak of arthritis 3 groups of 9 animals each were injected with MAB V65 at doses of 0.25, 0.5 or 2 mg, respectively, on days 15, 18 and 21 after induction of AA. This experimental design was chosen with the aim of directly comparing the present to the above mentioned results on the effects of the MAB R73 in AA (12, 13). Healthy animals, PBS-treated arthritic rats, and animals injected with 0.07 mg of MAB R73 on the same dates (each group n = 9), were used as negative and positive controls, respectively. B) before the peak of arthritis 2 groups of animals (n = 6 each) were administered 2 mg MAB V65, the dose which had marginally affected the clinical score when given around the peak of AA, or 2 mg MAB R73, on days 12, 15, and 18. Two additional groups of arthritic rats (n = 6 each) received either 2 mg of MAB MAX.16H5 as IgG, isotype-matched control, or PBS.

In the protocol before induction of AA, newborn rats (n = 15) were pretreated for 8 weeks twice weekly by i.p. injections of increasing doses of the MAB V65 dissolved in 0.1 ml of

PBS, i.e., 0.1 mg during the first three weeks, 0.2 mg from the fourth to the sixth week, and 0.5 mg during the last two weeks before induction of arthritis. Control newborn rats ($n = 6$) received equal volumes of vehicle i.p. on the same dates. AA was induced 1 day after the last antibody administration.

Hematological parameters: Blood samples were obtained from the tail vein at regular intervals following induction of arthritis (see Figure 2 for details) for the determination of erythrocyte sedimentation rate (ESR) and total leukocyte count. ESR was determined by mixing 45 μ l blood with 10 μ l Na-Citrate (5% in distilled water), then drawing the mixture into a glass capillary, allowing the erythrocytes to sediment for 1 h, and finally measuring the distance in mm from the meniscus of the serum to the edge of the sedimented erythrocytes.

The total number of circulating leucocytes was counted in 200 μ l of blood mixed with 20 μ l of 0.05 M Tritriplex[®] III (Merck, Darmstadt, Germany) using a Sysmex E-5000 M/CS cell counter (Sysmex Toa Medical Electronics, Hamburg, Germany).

Preparation of cell suspensions: PBMC and lymph nodes from separate groups of PBS-, R73-, and V65-treated adult arthritic rats were obtained one day after the end of treatment. PBMC and lymph nodes from newborn animals were obtained on day 0, i.e., immediately before induction of AA. PBMC were isolated by centrifugation over Ficoll-Isopaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and collected from the interface. Cell suspensions of mesenteric, popliteal, and cervical lymph nodes were prepared by passage through stainless steel sieves.

Flow cytometry: Cells were stained with antibodies at saturating concentrations. For one and two-color immunofluorescence labeling, 2×10^5 nucleated cells were suspended in 100 μ l of PBS/0.2% BSA/0.02% NaN₃. For one-color stainings, FITC-labeled or unlabeled MAb detected with the secondary PE-labeled antibody were used. For two-color labeling, cells were incubated for 15 min on ice with an unlabeled MAb, followed by 15 min treatment with F(ab')₂ donkey anti-mouse-IgG-PE. Staining was completed using 10 μ g/ml normal mouse IgG, and FITC-conjugated MAbs directed to the second marker. Cells were washed with PBS/0.2% BSA/0.02% NaN₃ between every step, except after the blocking step with normal mouse IgG. Specificity of staining was confirmed using isotype-matched control MAb for both staining procedures. Analyses were performed on a FACScan[®] flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Forward/side scatter gates were set to include all viable nucleated cells. Ten thousand events were analyzed using the Lysys II[®] software and the results were displayed as dot plots. Results of γ/δ T-cell depletion were obtained from 2 animals for each staining.

To determine whether there were saturating levels of free MAb V65 in circulation, a small amount of blood was obtained from the tail vein of treated or pretreated animals 7 or 3 days after the last injection, respectively. Sera at dilutions 1 : 2 - 1 : 16 were incubated with the

TCR α/β , γ/δ ⁺, CD3⁺ T-cell hybridoma III.89.1.4 (15). F(ab')₂ donkey anti-mouse-IgG-PE was used as secondary Ab. Fluorocytometry was performed as above.

Determination of Anti-MT antibodies: Plasma levels of anti-MT antibodies were measured as described previously (21).

Histological examination: At the end of the experiments (day 29 to 38) rats were sacrificed, and joints excised for histological analyses of undecalcified cryostat sections. Four additional groups of rats (n = 6 each), one treated with the MAb V65 according to the pre-peak protocol and the others treated with control medications, were sacrificed on day 20 of AA to obtain histological samples on this intermediate day of arthritis.

Ankle and metatarsal joints were frozen in methylbutane cooled in liquid nitrogen. Cryosectioning of undecalcified joint samples was performed as described previously (22), using a motor-driven cryostat (Bright, Huntingdon, UK) equipped with a retraction microtome. Sections were stained with Giemsa solution. To estimate the degree of cartilage and bone destruction, a semiquantitative scoring system was used in which 0 = no erosion of cartilage or bone, 1 = unequivocal erosion of < 10% of cartilage and bone cross sections, 2 = erosion of < 50%, 3 = erosion of 50% - 90%, and 4 = erosion of > 90% of cartilage and bone cross sections. Sections were independently scored in a blinded fashion by two observers.

Immunohistological analysis: This analysis was performed as described previously (23).

Statistical analysis: Differences for all parameters among different treatment groups were analyzed by means of the Mann-Whitney-U-test, using the StatView II™ program. Significant differences were accepted for P values ≤ 0.05 .

RESULTS

Optimization of the doses for treatment: In pilot experiments in non-arthritic rats, a single i.p. injection of either 0.1 or 0.5 mg of MAb V65 induced a massive depletion (93 to 96%) of the γ/δ -TCR^{brwt} cell subpopulation in peripheral blood already 2 days following injection; such depletion became virtually complete (99%) on day 8 (data not shown). In cervical lymph nodes there was a 52% depletion of γ/δ -TCR^{brwt} cells on day 2; the depletion increased to 91 - 96% on day 4 to 8 (data not shown).

Treatment with PBS: Arthritic rats treated with PBS developed a full-blown arthritic syndrome, i.e., marked arthritic scores (Figure 1, A and B) and augmented hind paw volumes (Figure 1, C and D); diseased animals also displayed marked loss of body weight (Figure 1, E and F), high ESR (Figure 2, A and B), and increased total leukocyte counts (Figure 2, C and D).

Treatment with the anti- γ/δ TCR MAb V65:

All three different doses of the anti- γ/δ T-cell MAb V65 (0.25 [data not shown], 0.5 and 2 mg), failed to ameliorate any of the clinical (Figure 1), or hematological parameters (Figure 2) of rat AA, regardless of whether treatment was begun around the peak of arthritis (days 15, 18, 21; Figure 1, A, C, and E; Figure 2, A and C) or before the peak (days 12, 15, 18; Figure 1, B, D, and F; Figure 2, B and D). The highest dose of the MAb administered around the peak of AA induced some improvement of the arthritic score alone (Figure 1 A), but this did not attain statistical significance in comparison with vehicle-treated arthritic controls.

In peripheral blood of vehicle-treated AA rats (n = 2) the percentage of γ/δ^+ , CD3⁺ T-cells in PBMC was 1.27% and 1.41%; in popliteal lymph nodes this percentage was 1.01% and 1.37%, and in mesenteric lymph nodes 0.97% and 1.01% (Figure 3, A, C, and E).

Treatment of AA rats (n = 2) with 2 mg of the MAb V65 according to the pre-peak protocol induced 87 - 90% depletion of γ/δ -TCR/CD3^{brwt} cells in peripheral blood (Figure 3, A and B), as well as in popliteal (Figure 3, C and D) and mesenteric lymph nodes (Figure 3, E and F). The therapeutic schedule around the peak of AA induced a similar percentage of depletion (83 - 96%).

Following treatment, a TCR^{brwt} population of cells appeared, in particular in peripheral blood, with a roughly 5-fold decreased mean fluorescence intensity (MFI) for both the γ/δ -TCR and CD3 (Figure 3 B).

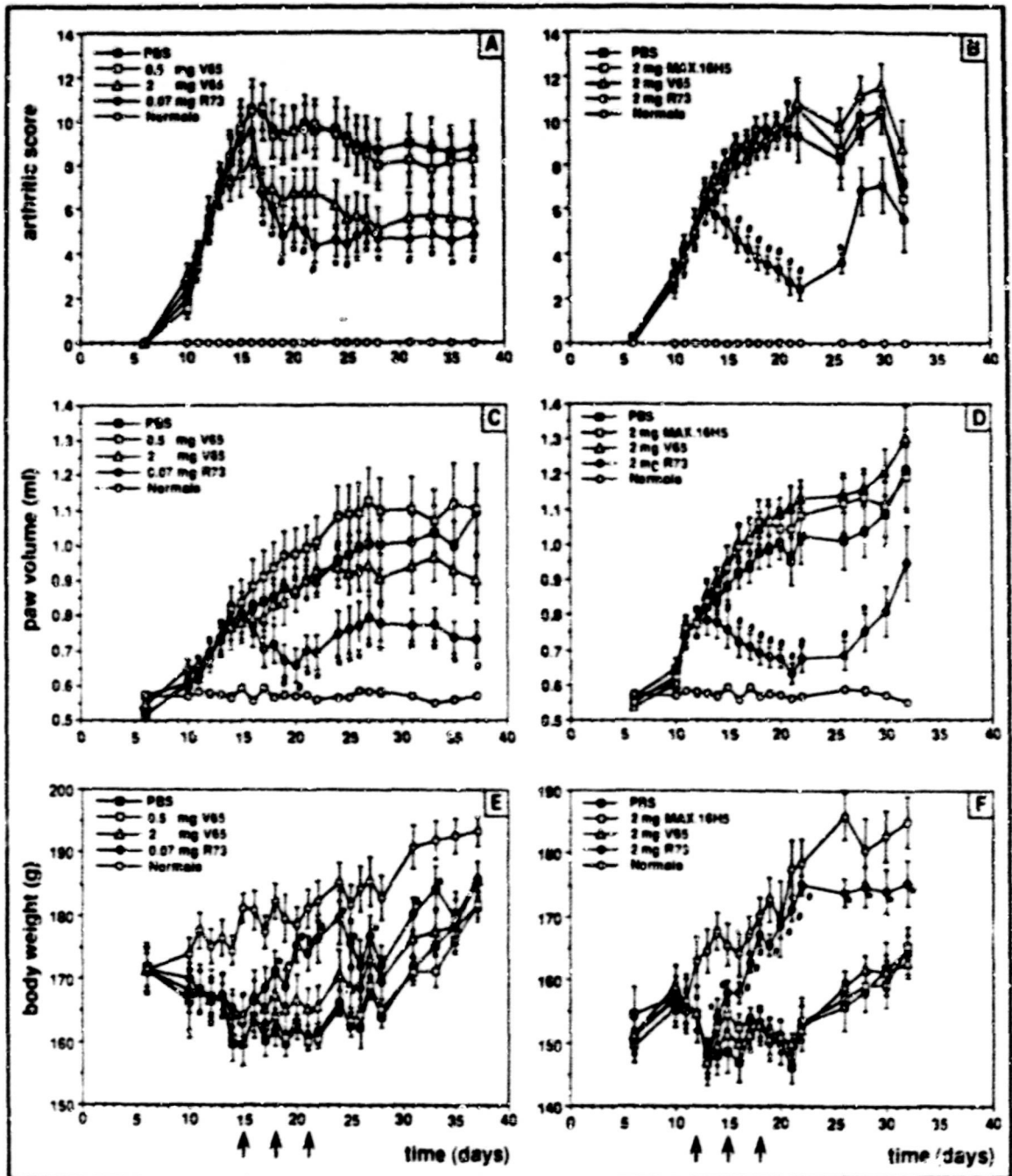


Figure 1: Time course of arthritic score (A and B), hind paw volume (C and D), and body weight (E and F) upon treatment of established AA. Regimens were initiated either around the peak of arthritis (each group $n = 9$; days 15, 18, and 21 indicated by arrows in A, C, and E) or before it (each group $n = 6$; days 12, 15, and 18 indicated by arrows in B, D, and F). Clinical parameters remained unaffected by either dose of the anti- γ/δ MAb V65, though the highest one (2 mg) given around the peak of AA induced a non-significant improvement limited to the arthritic score (A). Treatments with either dose or regimens of the anti- α/β MAb R73 ameliorated all clinical parameters; suspension of pre-peak treatment was followed by marked rebound of clinical signs (B, D, and F). Values are means \pm SEM. * $P < 0.05$; # $P < 0.01$ in comparison with vehicle-treated arthritic rats.

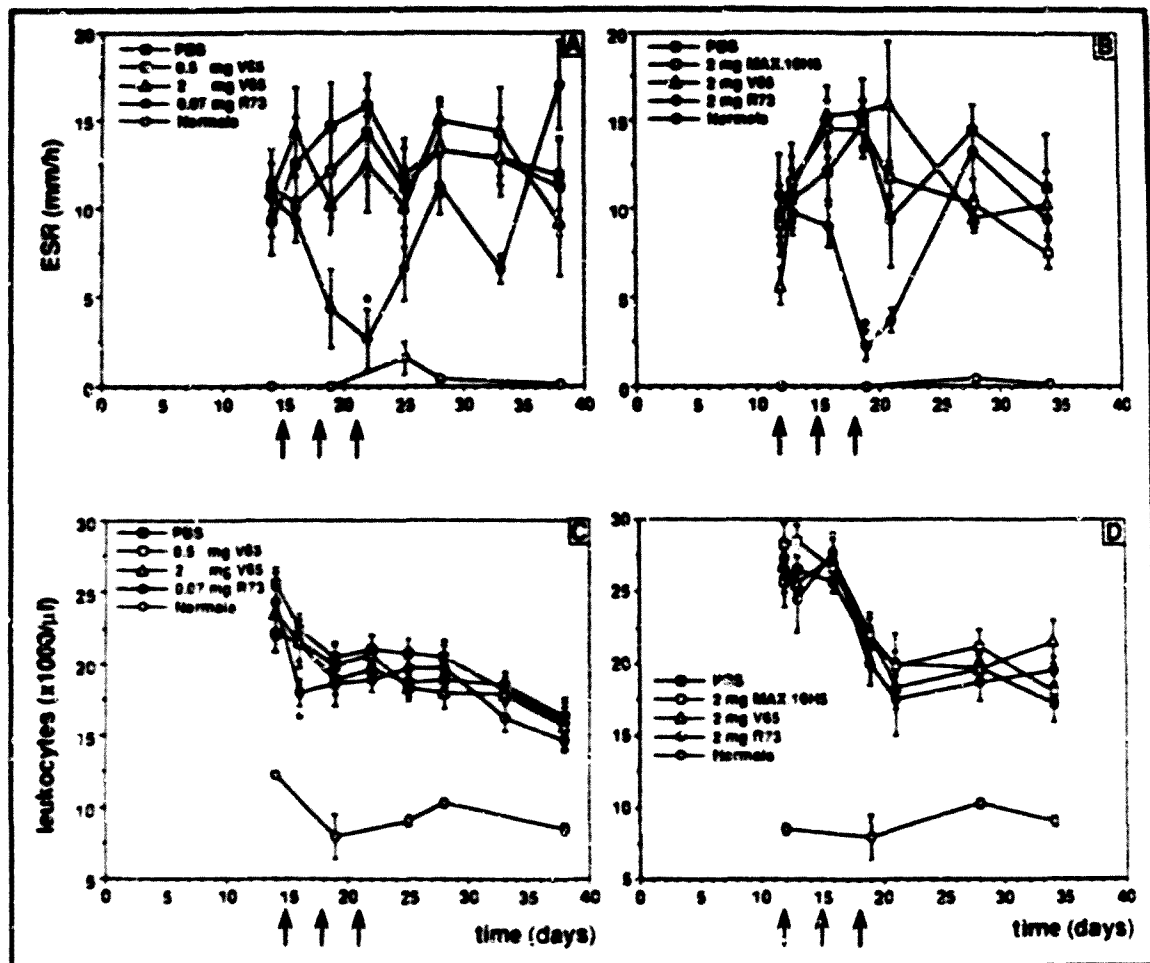


Figure 2: Time course of erythrocyte sedimentation rate (ESR; A and B) and total leukocyte count (C and D) upon treatment as described in Figure 1. ESR and total leukocyte count remained unaffected by treatment with either doses or protocols of the anti- γ/δ MAb V65. Treatment with the anti- α/β MAb R73 improved both parameters, but only transiently during or immediately after treatment. Values are means \pm SEM. * $P < 0.05$ in comparison with vehicle-treated arthritic rats.

A comparison of the percentage of TCR^{bright} cells in vehicle-treated rats with that of the TCR^{dim} population in V65-treated rats indicated that at least 42% of γ/δ T-cells in PBMC and lymph nodes were either depleted or had completely modulated their γ/δ -TCR (for details see legend to Figure 3); the degree of depletion or modulation of γ/δ T-cells could not be clearly assessed due to low total percentages of γ/δ T-cells (data not shown).

There was no consistent influence of treatment with the MAb V65 on the frequency of α/β T-cells or the MFI of α/β expression in blood, popliteal or mesenteric lymph nodes (data not shown).

Seven days following the end of treatment with 2 mg of the MAb V65 around the peak of AA, there were still saturating levels of free antibody in the sera of treated rats (data not shown).

Postnatal treatment with the MAb V65 before induction of AA: Pretreatment of newborn rats with increasing doses of MAb V65, from 0.1 to 0.5 mg, twice a week for 8 weeks, failed to prevent arthritis. Rather, arthritic score and paw volume were slightly, but not significantly higher than those in vehicle-treated AA rats throughout the course of the disease (Figure 4, A, B, and C).

Fluorocytometry on the day of induction of AA showed that this postnatal regimen induced 83% depletion of γ/δ -TCR^{bright} cells in peripheral blood (Figure 5, A and B). This depletion reached 93% in popliteal lymph nodes and 88% in mesenteric lymph nodes (Figure 5, C through F).

A population of cells with a 5 to 10-fold reduced MFI for the γ/δ -TCR appeared, in particular in peripheral blood, indicating downregulation of TCR molecules (Figure 5 B).

A comparison of the percentage of TCR^{bright} cells in vehicle-treated animals to that of the TCR^{dim} population in V65-treated rats indicated that at least 38% of γ/δ T-cells in PBMC and lymph nodes were either depleted or had completely modulated their γ/δ -TCRs, i.e., had become γ/δ -TCR^{dim}.

There was no major influence of pretreatment with the anti- γ/δ -TCR MAb on the MFI of α/β -TCR expression (data not shown), or on the frequency of α/β T-cells (Figure 5). The frequency of these cells varied between 55 and 70% in pretreated rats; however, a similar variability was also observed in PBMC and lymph nodes of rats pretreated with PBS.

On day 0 before induction of AA there were saturating levels of free MAb V65 in the sera of animals pretreated with this MAb (data not shown).

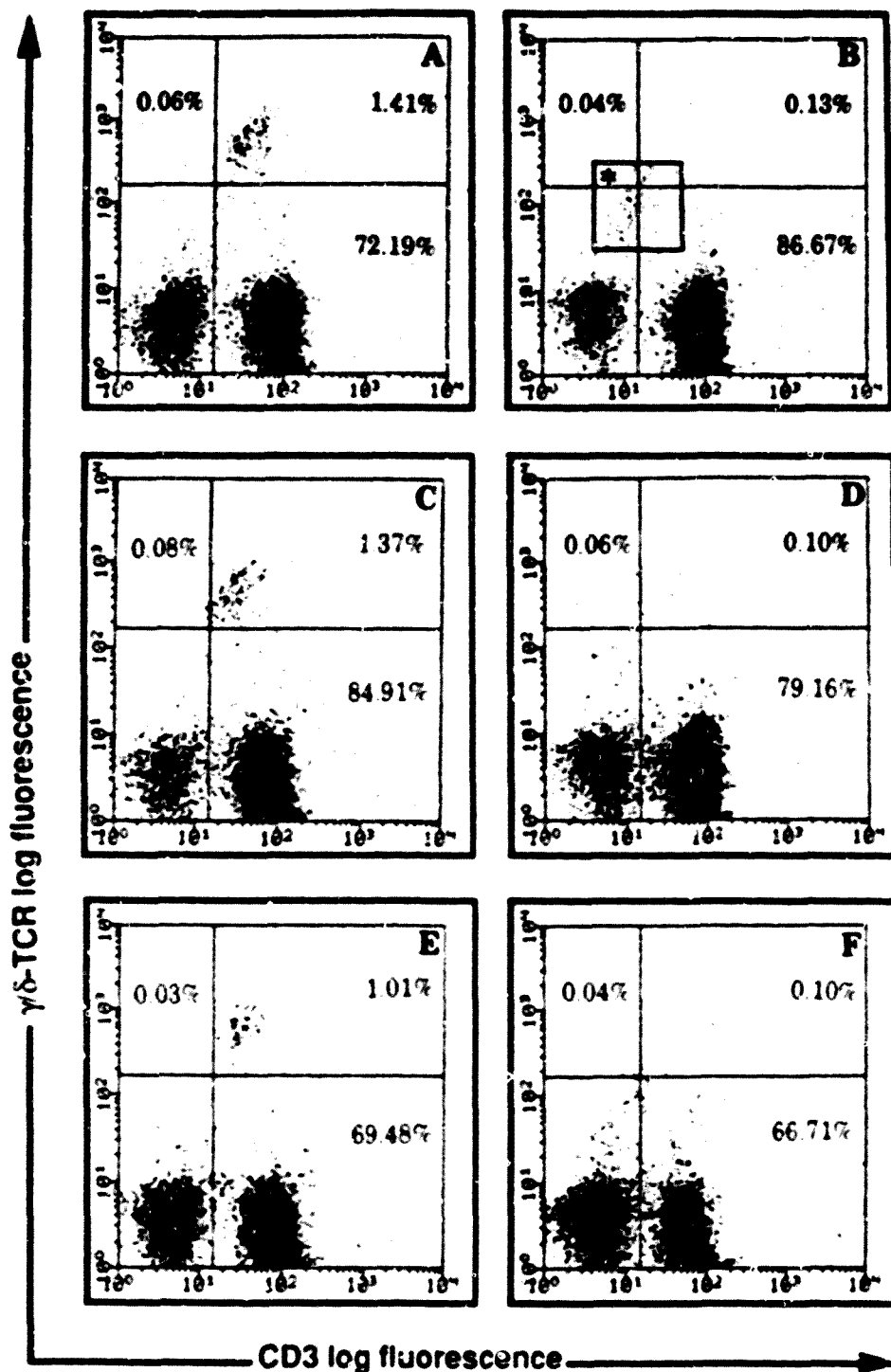


Figure 3: Two-color flow cytometric analyses of PBMC and lymph node cells obtained one day after the last administration of vehicle (A, C, and E) or 2 mg of the anti- γ/δ MAb V65 according to the pre-peak protocol (B, D, and F). Correlation of γ/δ -TCR with CD3 expression is shown in A and B for PBMC, in C and D for popliteal lymph nodes, and in E and F for mesenteric lymph nodes ($n = 2$ for each organ; one animal is shown). There was a depletion of approx. 90% of γ/δ -TCR^{high} cells in both peripheral blood and lymph nodes. In addition, there appeared a population with decreased MFI for both the γ/δ -TCR and CD3 (* in B).

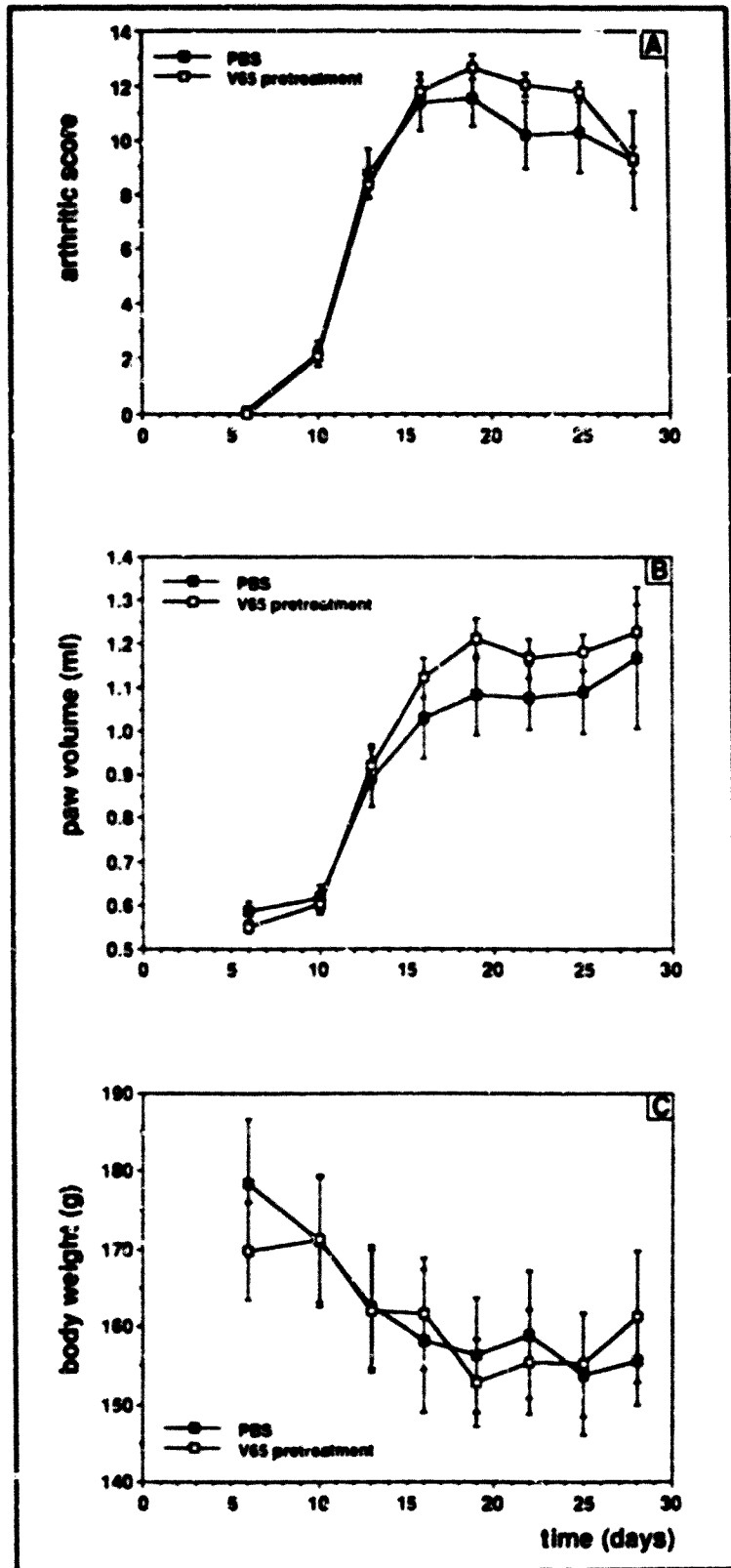


Figure 4: Time course of arthritic score (A), hind paw volume (B) and body weight (C) following postnatal treatment before induction of AA with vehicle (n = 6) or with the anti- γ/δ MAb V65 (n = 15). There were no significant differences between groups. Values are means \pm SEM.

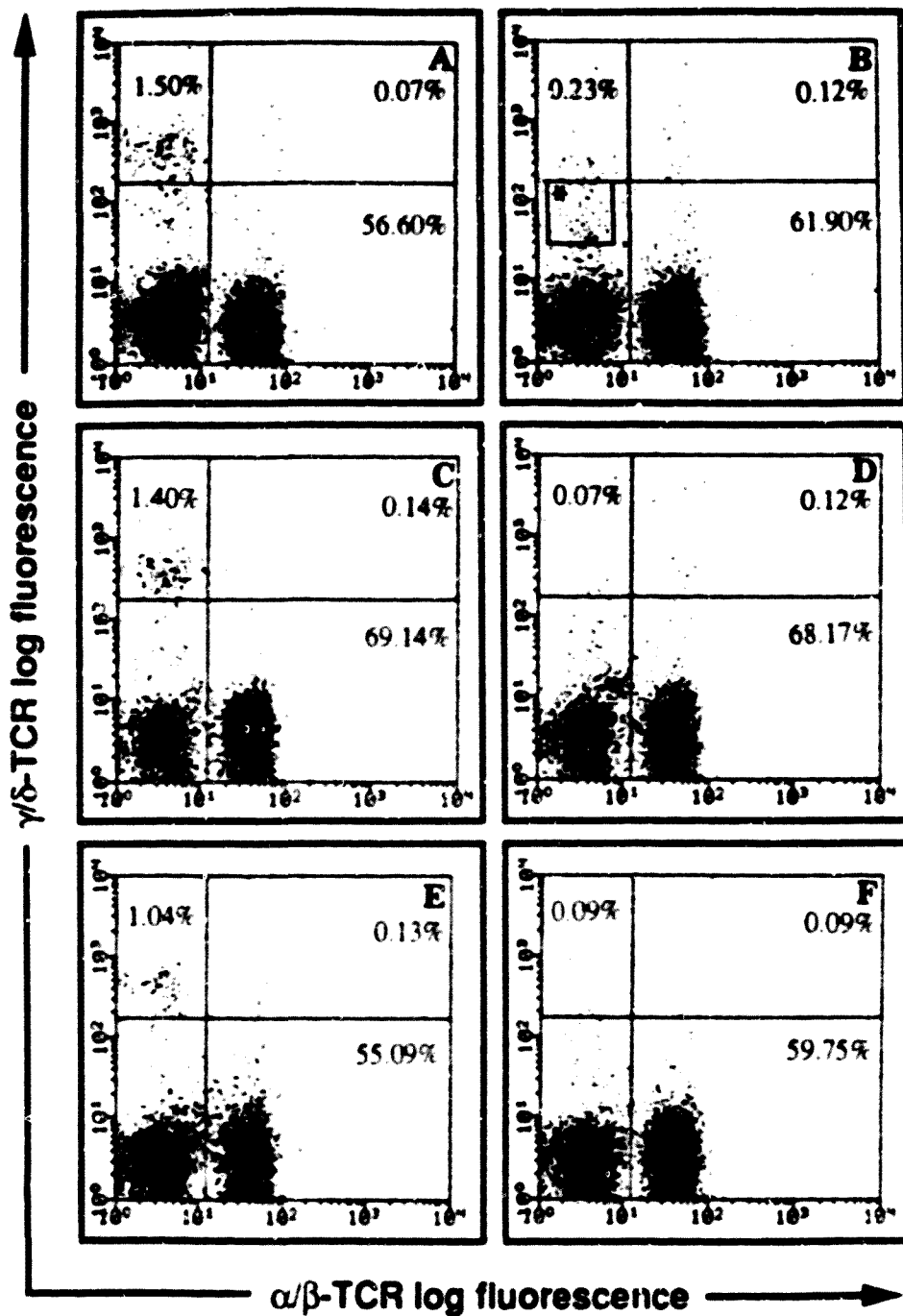


Figure 5: Expression of γ/δ -TCR and α/β -TCR in two-color fluorocytometric analyses of PBMC (A and B), popliteal lymph node (C and D), and mesenteric lymph node cells (E and F) of rats treated according to the pre-induction protocol with vehicle (A, C, and E), or the anti- γ/δ MAb V65 (B, D and F). In the latter group, the γ/δ -TCR^{low} cells were depleted by 83 - 93% in both peripheral blood and lymph nodes. In addition, there appeared a population with decreased MFI for the γ/δ -TCR (* in B).

Treatment with the anti- α/β -TCR MAb R73: As reported earlier (12, 13), treatment directed against the α/β T-cell subpopulation induced a clear improvement of all clinical parameters of arthritis, i.e., arthritic score, paw volume, and body weight, as a result of either 0.07 or 2 mg of antibody, and following therapeutic regimens either before or around the peak of AA (Figure 1, A through F). Upon treatment with 0.07 mg around the peak of AA, the beneficial effects became statistically significant already 2 and 3 days following the first injection (day 17 and 18 of the disease), and lasted throughout the experiment (day 37) for almost all parameters. Upon pre-peak treatment with 2 mg of MAb R73 the beneficial effects also started 2 days following the first injection (day 14 of AA). Suspension of treatment was followed by a marked rebound of all clinical parameters beginning on day 26 (Figure 1, B, D, and F).

The MAb R73 induced a major decrease of the ESR, but the effect was only transient (Figure 2, A and B). The leukocyte count was also marginally affected on day 16 following treatment around the peak of AA (Figure 2 C).

Treatment with 2 mg R73 according to the pre-peak protocol led to depletion of α/β -TCR^{bright} cells in peripheral blood (77%), in popliteal (78%), and in mesenteric lymph nodes (63%). In all compartments, a new population with decreased MFI appeared, indicating modulation of the α/β -TCR (data not shown).

Staining with an anti-CD5 MAb in parallel samples indicated that between 19 and 37% of the α/β -TCR cells were depleted from PBMC or lymph nodes, while a subpopulation of cells seemed to have completely modulated the TCR molecules on their surface (data not shown).

There was no major influence of the anti- α/β MAb treatment on the frequency of γ/δ T-cells or the MFI of γ/δ -TCR expression (data not shown).

Treatment with the isotype-matched control MAb MAX.16H5: Pre-peak administration of 2 mg of the MAb MAX.16H5 (days 12, 15, and 18 of AA) failed to influence clinical (Figure 1, B, D, and F) or hematological parameters of the disease (Figure 2, B and D).

Anti-MT antibodies: The levels of anti-MT antibodies in the serum of arthritic rats were not influenced by any of the treatments, irrespective of the schedule applied (data not shown).

Histological analysis of joint destruction: Arthritic rats treated with vehicle or isotype-control MAb showed marked joint destruction on day 20 of AA, which progressed to erosion of more than 50% of cartilage and bone cross sections on day 29 - 38 (Figure 6; Table 1).

TABLE I

Joint destruction in the hind paws of AA rats following treatment with PBS, the anti- γ/δ -TCR mAb V65, the anti- α/β -TCR mAb R73, or the isotype-matched control mAb MAX.16H5.

Experiment A (around the peak of AA on days 15, 18, 21; each group n = 9)

<u>Treatment</u>	<u>day 38</u>
PBS	3.38 \pm 0.12
V65 (0.5 mg)	3.36 \pm 0.20
V65 (2 mg)	2.81 \pm 0.34
R73	3.09 \pm 0.17

Experiment B (before the peak of AA on days 12, 15, 18; each group n = 6)

<u>Treatment</u>	<u>day 20</u>	<u>day 32</u>
PBS	2.92 \pm 0.15	3.29 \pm 0.15
V65	3.25 \pm 0.16	3.83 \pm 0.08 ^{*s} ⊙
R73	2.50 \pm 0.11 ^{*s} ⊙	2.88 \pm 0.26
MAX.16H5	3.04 \pm 0.20	3.21 \pm 0.20

Experiment C (before induction of AA; PBS n = 6, V65 n = 15)

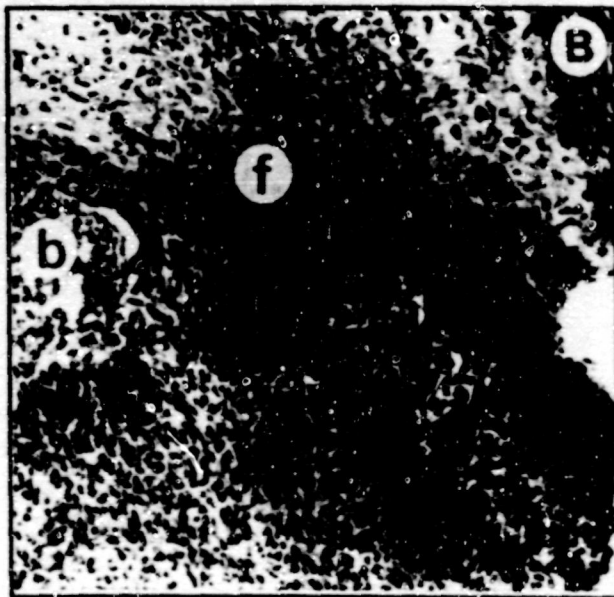
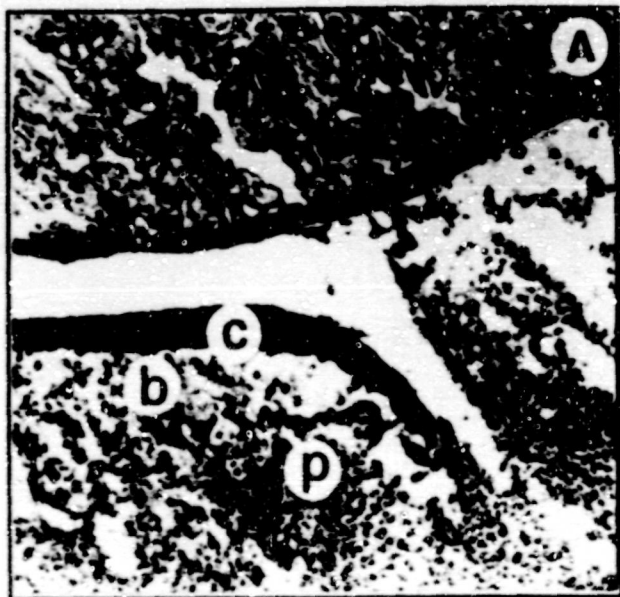
<u>Treatment</u>	<u>day 29</u>
PBS	3.20 \pm 0.25
V65	3.54 \pm 0.12

Joint destruction was assessed by two independent observers according to a semiquantitative severity score from 0 - 4. Values are means \pm SEM of average scores for both sides of individual animals.

* = p < 0.05 in comparison with PBS-treated AA; ^s = p < 0.05 in comparison with V65-treated AA; ^s = p < 0.01 in comparison with R73-treated AA; ⊙ = p < 0.05 in comparison with MAX.16H5-treated AA; Mann Whitney U-test.

day 20

day 32



V65

R73

MAX.16H5

Figure 6: Undecalcified cryostat sections (Giemsa staining) of ankle or metatarsal joints on day 20 (A, C, and E) or day 32 of AA (B, D, and F) from animals treated with either 2 mg of the anti- γ/δ MAb V65 (A and B), 2 mg of the anti- α/β MAb R73 (C and D) or 2 mg of the control MAb MAX.16H5 (E and F), according to the pre-peak protocol (day 12, 15, and 18). Arthritic rats treated with the control MAb showed limited destruction of cartilage and bone on day 20 (arrowhead; E), which progressed to massive erosion on day 32 (arrowheads; F). Anti- α/β -TCR-treated rats showed marginal erosion on day 20 (arrowhead, C), which remained limited on day 32 (arrowhead, D). In contrast, anti- γ/δ -TCR treatment with the MAb V65 induced advanced destruction already on day 20 (A), which progressed to disappearance of any recognizable joint structures on day 32 (B). The remnants of cartilage and bone (h in B) were surrounded by fibrous pannus (f in B). p = pannus tissue; c = cartilage; b = bone; f = fibrous pannus. Original magnification x 93.

Treatment with either dose of the MAb V65 around the peak of AA (days 15, 18, and 21) did not influence the ankle joint destruction, as assessed by histological examination on day 38 of the disease. Similarly, pre-peak treatment with the MAb V65 (days 12, 15, and 18) did not affect ankle joint destruction on day 20 (Figure 6; Table 1), but induced significant aggravation of joint destruction in the late phase of the disease (day 32) in comparison with vehicle-treated arthritic rats (Figure 6; Table 1).

Postnatal treatment before induction of AA with the MAb V65 marginally, but not significantly increased joint destruction on day 29 in comparison with control-treated arthritic rats (Table 1).

In parallel to its beneficial effects on the clinical parameters, pre-peak treatment with the anti- α/β -TCR MAb R73 also significantly ameliorated the joint destruction score on day 20 of AA; on day 32 the destruction score was still reduced, but the difference in comparison with vehicle-treated arthritic rats was not statistically significant anymore (Figure 6; Table 1).

Immunohistological analysis of the frequency of γ/δ T-cells in the AA synovial membrane: The whole time course of untreated AA, until day 42, was characterized by extremely low numbers of V65-positive γ/δ T-cells in the synovial membrane, whereas V65-positive γ/δ T-cells were easily detectable in rat skin sections, used as controls (data not shown); an influence of γ/δ treatment on the numbers of synovial γ/δ T-cells or on the sequestration of antibody-coated γ/δ T-cells was therefore impossible to establish (data not shown).

Activation of γ/δ T-cells by anti- γ/δ -TCR treatment: To verify whether activation of γ/δ T-cells occurred following anti- γ/δ -treatment, the number of IL-2-receptor/ γ/δ -TCR double-positive cells was analyzed by FACS. However, no indications for such activation were observed either in PBMC or in lymph nodes (data not shown).

DISCUSSION

Treatment with the anti- γ/δ -TCR MAb V65 failed to influence clinical or hematological signs of established AA in the rat, or to prevent its development (Figures 1, 2 and 4); this occurred in spite of efficient depletion of γ/δ -TCR^{high} cells in peripheral blood and lymph nodes by all protocols employed (Figures 3 and 5), and the presence of saturating levels of MAb in peripheral blood. γ/δ T-cells, therefore, do not appear to initiate, promote, or perpetuate AA.

Interestingly, however, the pre-peak treatment of AA with anti- γ/δ TCR mAbs significantly aggravated the destruction of cartilage and bone in hindpaw joints in comparison with vehicle-treated arthritic animals, while failing to influence systemic parameters of the disease; this suggests that, at a local level, γ/δ T-cells may physiologically exert a protective role.

γ/δ T-cells bear stage-dependent pathogenetic relevance in a number of experimental inflammatory pathologies in mice, such as influenza (24), listeriosis (25, 26), and CIA (9). In these conditions, γ/δ T-cells dominate the tissue inflammatory infiltrates in late or secondary stages of the disease, in temporal concordance with the resolution of the processes. Furthermore, blockade of γ/δ T-cells in the course of listeriosis results in transformation of spatially and histologically defined granulomatous lesions into abscessi with tissue necrosis and invasion of PMN (25, 26). The significant histological aggravation of AA upon anti- γ/δ treatment, therefore, suggests that γ/δ T-cells contribute to the delimitation of tissue damage at a local level, not only in infectious disorders, but also in autoimmune inflammatory arthritides (9, present results).

The protective characteristics of γ/δ T-cells appear phase-dependent also in AA; in this model the critical time window of γ/δ intervention seems limited to the span between the onset and the clinical peak of synovitis, since only the anti- γ/δ treatment performed in this phase, and not before induction or following the peak of the disease, aggravates the degree of joint destruction.

The mechanisms through which γ/δ T-cells exert their protective role in arthritis remain elusive. γ/δ T-cells are the main responders in the reaction against mycobacterial antigens in humans and mice (27), and AA is actually induced by MT, raising the possibility that anti- γ/δ T-cell treatment may influence arthritis through regulation of the response to mycobacterial antigens. Indeed, the 60 kD mycobacterial heat shock protein (hsp-60), or hsp-60-derived peptides, exert a protective role in AA (28). Thus, a preferential handling of mycobacterial hsp-60 by γ/δ T-cells may mediate the protective role of these cells in AA. To date, however, the only T-cell clone capable of transferring anti-arthritis properties in rat AA and specifically responding to a hsp-60 peptide has been shown to be of the α/β -TCR⁺/CD4⁺ phenotype (28).

A major influence of anti- γ/δ T-cell treatment in AA on the overall response to MT seems also unlikely on the basis of the lack of changes in the humoral response to mycobacterial

antigens in the present study (data not shown). Moreover, attempts to activate rat γ/δ T-cells with mycobacterial antigens or heat-shock-treated cells, known to stimulate a subset of γ/δ T-cells in humans and mice (2, 4, 29), have so far remained unsuccessful (P. Kühnlein and T. Hünig, unpublished results). This fact indicates that there are probably substantial differences among species (15). Indeed, while γ/δ T-cells in mice are predominantly CD4⁻/CD8⁺ (30), in the rat they are mainly CD4⁺/CD8⁺ (31).

On the other hand, the protective role of γ/δ T-cells in arthritis may be indirect, through counteraction of the pro-arthritis capacity of α/β T-cells (12, 13, present study). This hypothesis is supported by *in vivo* findings of cross-talk of the 2 subsets in normal mice (14), and by the finding that *in vitro* activation of human γ/δ T-cells simultaneously inhibits the activation of CD4⁺ α/β T-cells to recall antigens such as tetanus toxoid (D. Kabelitz, personal communication). The present study, however, did not provide clear evidence that anti- γ/δ treatment induces significant numerical and/or phenotypic changes in the α/β T-cell subpopulation. The same was also true of the reverse, since anti- α/β treatment did not influence the number or phenotype of γ/δ T-cells in peripheral blood and lymph nodes. It is still possible, however, that systemic reciprocal changes induced by the respective anti-T-cell treatment remain confined to rare subpopulations activated by mycobacterial antigens (numerically too low to be identified). Moreover, it remains to be determined whether γ/δ T-cells suppress arthritis at a local level through recognition of protective self-antigens induced by the inflammatory process.

In sharp contrast to the limited influence of anti- γ/δ treatment in AA, anti- α/β treatment led to suppression of clinical, hematological, and histological signs of established arthritis, as previously reported (12, 13). The massive rebound upon suspension was also confirmed. These findings support the view of a promoting role of α/β T-cells in the initiation and perpetuation of rat AA (12, 13).

A general comparison between the effects of anti- α/β and anti- γ/δ treatments leads to the observation that not only these 2 cell types have opposite functions in AA, but also that their effector roles may be compartmentally defined at given phases. Anti- α/β treatment ameliorates histological signs of AA, but also clearly improves systemic parameters of the disease, such as ESR and number of the inflamed joints *per* animal, reflected by the arthritic score. Anti- γ/δ treatment, in contrast, affects the histological score of AA, leaving the systemic parameters untouched. Such compartmentalization seems to exist also in a murine model of malaria, in which α/β T-cells are necessary for clearance of parasites in blood, whereas γ/δ T-cells are critical in limiting the liver stages of the disease (32). In AA, however, the picture is less defined than in murine influenza or listeriosis, in which confinement of the tissue lesions and resolution of the process coincides with local enrichment of γ/δ T-cells (24, 26). Such enrichment was not observed in the AA synovial membrane until 6 weeks following induction of the disease (data not shown), a phase characterized by spontaneous remission of joint inflammation (12; present study). On the other hand, even very few γ/δ T-cells may be capable of altering immunological reactions;

such powerful properties have already been reported in the case of inhalation-induced IgE isotype-specific tolerance against certain antigens, which can be transferred to naive animals by as few as 1000 γ/δ T-cells (33).

The role of γ/δ T-cells has been recently investigated in a murine model of CIA (9). Depletion of these cells in the established phase of the disease is also accompanied by histological aggravation of synovitis; a preventive protocol, in contrast to the present results, leads instead to partial amelioration of the disease. Also discordant with the present data is the finding that late anti- α/β treatment leads to exacerbation of CIA (34). These differences point to model and species peculiarities that may render difficult extrapolations regarding basic function(s) of γ/δ and α/β T-cells in experimental and human autoimmune arthritis. If the assumption that γ/δ T-cells are protective holds generally valid, the findings of γ/δ T-cell expansion in patients with rheumatoid arthritis (5, 6, 7) may then reflect ongoing compensatory processes.

Depletion of γ/δ T-cells before the clinical peak of AA aggravates the degree of joint destruction without affecting systemic parameters of the disease. The present results contribute to the view that γ/δ T-lymphocytes act as as regulatory cells in arthritis, and that the domain of such regulation may be exquisitely local.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Harzendorf and F. Kübel for expert technical assistance, Dr. E. Palombo-Kinne and Dr. C. Castellote for valuable advice, and Prof. D. Kabelitz for helpful discussion of the data. They are also grateful to Dr. L. Liu, Dr. T. Kerkau, J.-H. Park and S. Kalthenthaler for their help.

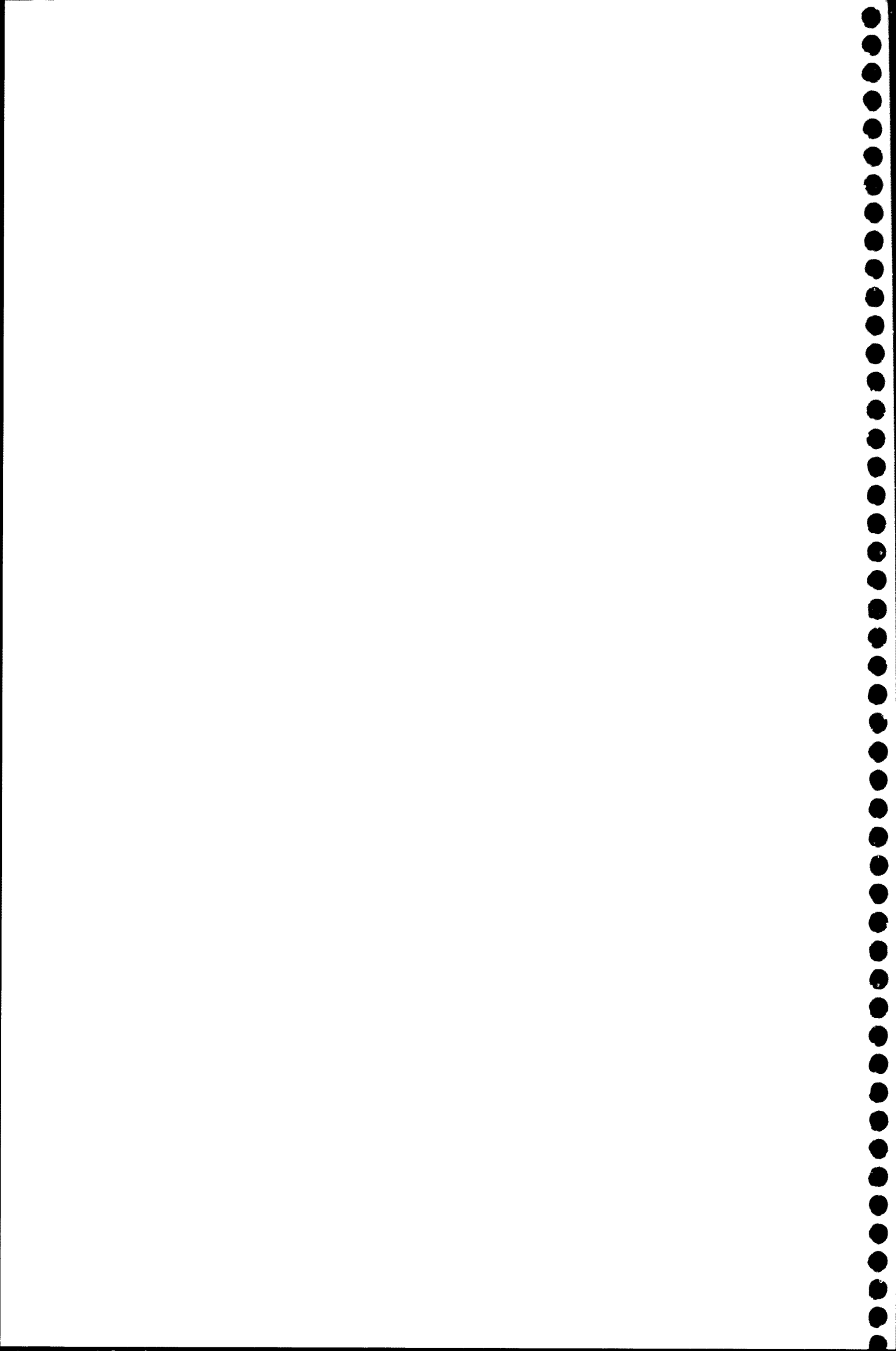
REFERENCES

1. Raulet DA: The structure, function, and molecular genetics of the $\gamma\delta$ T cell receptor. *Ann Rev Immunol* 7:175-207, 1989
2. Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW: Human $\gamma\delta$ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature* 340:309-312, 1989
3. Janis EM, Kaufmann SHE, Schwartz RH, Pardoll DM: Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 244:713-716, 1989
4. O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK: Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 57:667-674, 1989

5. DeMaria A, Malnati M, Moretta A, Pende D, Bottino C, Casorati G, Cottafava F, Mezioli G, Mingari MC, Migone N, Romagnani S, Moretta L: CD3⁺4⁺WT31⁺ (T cell receptor $\gamma\delta$) cells and other unusual phenotypes are frequently detected among spontaneously interleukin 2-responsive T lymphocytes present in the joint fluid in juvenile rheumatoid arthritis. A clonal analysis. *Eur J Immunol* 17:1815-1819, 1987
6. Brennan F, Londei M, Jackson AM, Hercend T, Brenner MB, Maini RN, Feldmann M: T-cell expressing $\gamma\delta$ chain receptors in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 1:319-326, 1988
7. Brennan F, Plieter-Zybeck C, Maini RN, Feldmann M: Coordinate expansion of "fetal type" lymphocytes (TCR $\gamma\delta$ ⁺ T and CD5⁺ B) in rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 77:175-178, 1989
8. Smith MD, Bröker B, Moretta L, Ciccone E, Grossi CE, Edwards JCW, Yükeel F, Colaco B, Worman C, MacKenzie L, Kinne R, Weseloh G, Glücker K, Lydyard PM: T $\gamma\delta$ cells and their subsets in blood and synovial tissue from rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol* 32:585-593, 1990
9. Peterman GM, Spencer C, Sperling AJ, Bluestone JA: Role of $\gamma\delta$ T cells in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 151:6546-6558, 1993
10. Pearson CM: Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 91:95-101, 1956
11. Hünig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G: A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med* 169:73-86, 1989.
12. Yoshino S, Schlipkötter E, Kinne K, Hünig T, Emmrich F: Suppression and prevention of adjuvant arthritis in rats by a monoclonal antibody to the α/β T cell receptor. *Eur J Immunol* 20:2805-2808, 1990
13. Yoshino S, Kinne R, Hünig T, Emmrich F: The suppressive effect of an antibody to the $\alpha\beta$ cell receptor in rat adjuvant arthritis: Studies on optimal treatment protocols. *Autoimmunity* 7:255-266, 1990
14. Kaufmann SHE, Blum C, Yamamoto S: Crosstalk between α/β T cells and $\gamma\delta$ T cells *in vivo*: Activation of α/β T-cell responses after $\gamma\delta$ T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9620-9624, 1993
15. Kühnlein P, Park JH, Herrmann T, Elbe A, Hünig T: Identification and characterization of rat $\gamma\delta$ T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the $\gamma\delta$ T cell receptor. *J Immunol* 153:979-986, 1994
16. Emmrich F, Horneff G, Becker W, Lüke W, Potocnik A, Kanzy U, Kalden JR, Burmester G: An anti-CD4 antibody for treatment of chronic inflammatory arthritis. *Drugs in Inflammation* 32:165-170, 1991
17. Wood FD, Pearson CM, Tanaka A: Capacity of mycobacterial Wax D and its subfractions to induce adjuvant arthritis in rats. *Int Arch Allergy* 35:456-467, 1969
18. Engwall E, Perlman P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-879, 1971

19. Dallman MJ, Thomas ML, Green JR: MRC OX-19, a monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments *in vitro* proliferative responses. *Eur J Immunol* 14: 260-267, 1984
20. Tanaka T, Masuko T, Yagita H, Tamura T, Hashimoto Y: Characterization of a CD3-like rat T cell surface antigen recognized by a monoclonal antibody. *J Immunol* 142:2791-2795, 1989
21. Franch A, Casany S, Castellote C, Castell M: Adjuvant arthritis pretreatment with type II collagen and *Mycobacterium buryicum*. *Immunobiol* 186:351-361, 1992
22. Van Noorden CJ, Vogels IM: Enzyme histochemical reactions in unfixed and decalcified cryostat sections of mouse knee joints with special reference to arthritic lesions. *Histochem* 86:127-133, 1986
23. Buchner E, Bräuer R, Schmidt C, Emmrich F, Kinne RW: Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmunity* 8:61-74, 1995
24. Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC: Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by γ/δ^+ T cells. *J Exp Med* 172:1225-1231, 1990
25. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SHE: Different roles of α/β and γ/δ T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 365:53-56, 1993
26. Fu YX, Roark CE, Kelly K, Drevets D, Campbell P, O'Brien R, Born W: Immune protection and control of inflammatory tissue by γ/δ T cells. *J Immunol* 153:3101-3115, 1994
27. Haas W, Pereira P, Tonegawa S: Gamma/delta cells. *Ann Rev Immunol* 11:637-685, 1993
28. Anderton SM, van der Zee R, Prakken B, Noordzij A, van Eden W: Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J Exp Med* 181:943-952, 1995
29. Rajasekar R, Sim GK, Augustin A: Self heat shock and $\gamma\delta$ T-cell reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1767-1771, 1990
30. Itohara S, Nakanishi N, Kanagawa O, Kubo R, Tonegawa S: Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor $\gamma\delta$: Analysis of $\gamma\delta$ T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5094-5098, 1989
31. Torres-Nagel N, Kreuz E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, Hünig T: Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* 22: 2841-2848, 1992
32. Tsuji M, Mombaerts P, Lefrancois L, Nussenzweig RS, Zavala F, Tonegawa S: γ/δ T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in α/β T-cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:345-349, 1994
33. McMenamin C, McKersey M, Kühnlein P, Hünig T, Holt PG: $\gamma\delta$ T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol* 154:4390-4394, 1995
34. Maeda T, Saikawa I, Hotokebuchi T, Sugioka Y, Eto M, Murakami Y, Nomoto K: Exacerbation of established collagen-induced arthritis in mice treated with an anti-T cell receptor antibody. *Arthritis Rheum* 37:406-413, 1994

Article 3



COMPARISON OF FOUR LYMPHOCYTE ISOLATION METHODS APPLIED TO RODENT T CELL SUBPOPULATIONS AND B CELLS

Journal of Immunological Methods (en premsa)

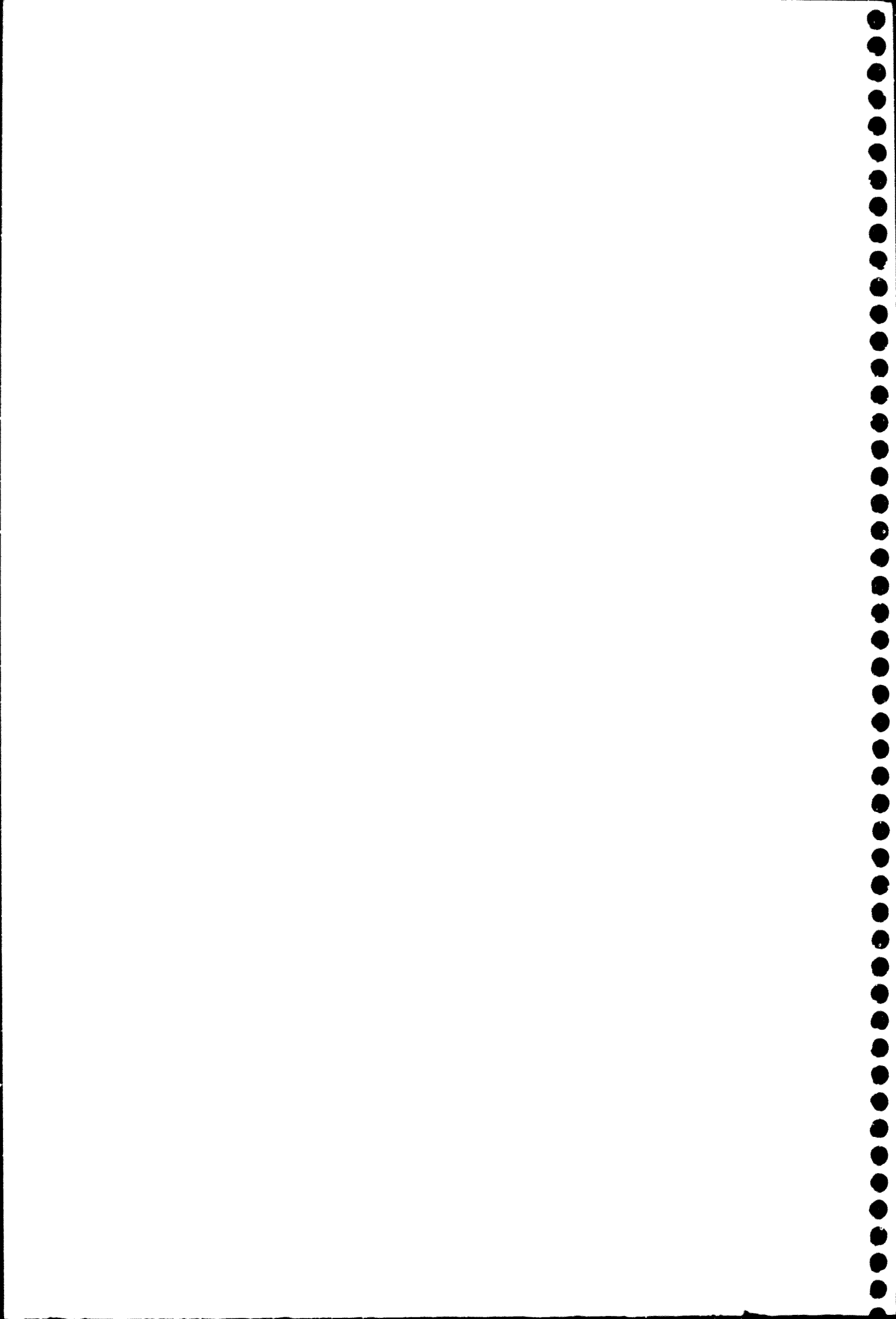
RESUM

Objectiu: Determinar la validesa de diferents mètodes d'aïllament de limfòcits per a la caracterització fenotípica de subpoblacions limfocítiques procedents de sang de rata.

Material i mètodes: Es van comparar tres mètodes de lisi d'eritròcits: lisi amb clorur amònic, lisi amb el reactiu de Becton & Dickinson i lisi mitjançant el sistema Coulter Q-prep, amb el gradient de sedimentació Ficoll-Isopaque adaptat a rata. Les poblacions limfocítiques obtingudes es van marcar amb els següents AcMo: OX19 (anti-CD5), W3/25 (anti-CD4), OX8 (anti-CD8), OX6 (anti-Ia), OX33 (anti-CD45RABC o anti-LCA), OX39 (anti-CD25). L'anàlisi de les diferents subpoblacions limfocítiques es va realitzar per citometria de flux.

Resultats: En una primera anàlisi estadística, en que es van considerar els percentatges de totes les poblacions conjuntament, no es van detectar diferències significatives entre els quatre mètodes estudiats. En canvi, en una segona anàlisi, en que es van considerar els resultats obtinguts per cada AcMo per separat, sí que es van observar algunes diferències significatives. El gradient Ficoll-Isopaque és el mètode que va proporcionar uns percentatges més baixos de limfòcits CD5⁺, CD4⁺ i CD25⁺. Per altra banda, els percentatges més baixos de limfòcits B van correspondre al mètode de lisi amb clorur amònic. En els dos mètodes comercials, els percentatges corresponents a la majoria les poblacions estudiades van presentar valors intermitjos.

Conclusions: Tots els mètodes estudiats són potencialment vàlids i aplicables a sang de rata. Les variacions descrites en aquest estudi per a cada mètode en concret serveixen de base per a la selecció d'un o altre mètode en funció de la població objecte d'anàlisi i de les necessitats específiques.





Comparison of four lymphocyte isolation methods applied to rodent T cell subpopulations and B cells

Carme Pelegrí ^{a,*}, Marta Rodríguez-Palmero ^a, María Paz Morante ^a, Jaime Comas ^b,
Marganda Castell ^a, Àngels Franch ^a

^a Unitat de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Serveis Científic-Tècnics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 16 May 1995; revised 26 June 1995; accepted 21 July 1995

Abstract

The aim of this study was to establish the validity of four lymphocyte isolation methods. The effects of three different erythrocyte lysing methods commonly used in the analysis of human cells, namely, lysis by ammonium chloride (AC), Becton Dickinson lysis (BDL) and the Coulter Q-Prep (CQP) preparation system were established by flow cytometry on rat lymphocyte subsets. The results were compared with those obtained with a Ficoll-Isopaque (FI) density gradient procedure adapted for use with rat cells. Lymphocyte isolation by AC or FI gradient was performed before labelling the lymphocyte subpopulations, whereas the BDL and CQP methods were performed after staining the cells in whole blood. The FI gradient yielded the lowest CD5⁺, CD4⁺ and CD25⁺ cell percentages. On the other hand AC lysis produced higher percentages of T cells and lower percentages of B cells than the other methods studied. The percentages obtained after BDL or CQP methods for T lymphocyte subsets and B cells were found to be reproducible. The commercial methods (BDL and CQP) are faster but rather expensive, whereas AC lysis and FI gradient separations are cheap and particularly useful when there is a requirement to culture the cells.

Keywords: Lymphocyte subset; Flow cytometry; Erythrocyte lysis; Density gradient separation; Monoclonal antibody; (Rat)

1. Introduction

Experimental models are widely used in research to elucidate disease mechanisms and to assess potential forms of therapy. Rats are one of the animal species most commonly used for such studies. The

determination of lymphocyte subsets in human and animals provides valuable data for the assessment of immune status, to study disease mechanisms and to test the effect of some therapies. As flow cytometry is frequently used in the analysis of lymphocyte subsets, it is important to determine how the various steps affect the results. One essential step is lymphocyte isolation and several possibilities have been developed for human blood (Ajuti et al., 1974; Böyum, 1974; Terstappen et al., 1989; Mansour et al., 1990).

In this study we have compared the lymphocyte

Abbreviations: AC, ammonium chloride; BDL, Becton Dickinson lysis; CQP, Coulter Q-Prep; FI, Ficoll-Isopaque; FSC, forward scatter; MoAb, monoclonal antibody; PBS, phosphate buffered saline; SSC, side scatter.

* Corresponding author. Tel. 343-4024505; Fax 343-4021896.

percentages obtained after a density gradient procedure adapted to the rat (Franch et al., 1993) with three erythrocyte lysing methods, which are commonly used for human blood. Two of these methods, Becton Dickinson lysis (BDL) or Coulter Q-Prep (CQP) preparation system, permit lymphocyte labelling of whole blood, followed by erythrocyte lysis. Otherwise, lysis with an ammonium chloride (AC) solution requires that lysis is performed before the lymphocyte subsets are stained. This and other differences between lymphocyte isolation methods, such as cost, time required or the necessity for lymphocyte culture after isolation, must be taken into consideration when choosing a suitable method. In addition, certain cells may be lost selectively depending on the method chosen. It is therefore necessary to determine how lysis procedures affect rat lymphocyte subsets before applying a particular method for a specific purpose.

We have tested on rat peripheral blood the validity of using three erythrocyte lysing methods, commonly used and primarily developed for human samples. Lymphocyte subset percentages have been compared with each other and with those obtained by staining the populations after using the density gradient isolation procedure developed for rat cells.

2. Materials and methods

2.1. Blood samples

Female Wistar rats weighing 200-225 g were obtained from Charles River, France. Approximately 6 ml of blood were collected from ether anaesthetized rats by cardiac puncture into EDTA K₂-coated sterile Venoject vacuum tubes.

2.2. Cell counts

The total number of leukocytes was determined using a counting chamber (Kova, ICL Scientific) after diluting blood 1/10 with Turk solution. Differential leukocyte analysis was performed on blood smears after staining with the Diff-Quick system (Dade, Baxter).

2.3. Antibodies

OX19 (anti-CD5, Dallman et al., 1984), OX8 (anti-CD8 α chain, Brideau et al., 1980), W3/25 (anti-CD4, White et al., 1978), OX39 (anti-CD25, Paterson et al., 1987), OX33 (against the highest molecular weight form of CD45R - CD45RABC - specific for B cells, Woollet et al., 1985) and OX6 (anti-MHC class II (I-A), McMaster and Williams, 1979) mouse anti-rat monoclonal antibodies (MoAb) were kindly provided by the late Dr A. Williams, Oxford, UK. FITC-conjugated goat F(ab')₂ anti-mouse IgG antibody (Sigma Immunochemicals) was used as the second antibody. Moreover, FITC-conjugated rabbit anti-rat immunoglobulins (anti-Ig-FITC, Dako) were used to label B lymphocytes directly. For each animal and lymphocyte isolation procedure, a negative control sample was included comprising an isotype-matched MoAb that did not react with rat cell determinants (IgG1, mouse anti-human CD7) plus the second antibody.

2.4. Cell preparation and labelling

2.4.1. Ficoll/Isopaque (FI) gradient

2 ml of rat blood were diluted in 5 ml of PBS-FCS 2% Na₂N₂, 0.1%. Diluted blood was then carefully overlaid on 3 ml of FI, adapted to rat cells ($d = 1.09 \times 10^3 \text{ kg m}^{-3}$) (Franch et al., 1993). After centrifugation, cells were washed three times and resuspended in 4 ml of PBS-FCS-Na₂N₂.

Before staining, the viability of each lymphoid cell suspension was assessed using acridine orange-ethidium bromide staining. Mononuclear cells (1×10^6) were incubated in 50 μl of MoAb (1/800) for 20 min at 4°C. Cells were washed in PBS-FCS-Na₂N₂ and 50 μl of an appropriate dilution, as determined by titration, of the second antibody was then added. After 20 min at 4°C, the cells were washed with PBS, resuspended in 150 μl of PBS and immediately analyzed by flow cytometry.

2.4.2. AC lysis

A stock solution ($10^{-1} \text{ M Na}_2\text{EDTA}$, 10^{-2} M KHCO_3 , 1.7 M NH₄Cl in H₂O, pH = 7.3) was diluted 1/10 in distilled water to obtain the lysing solution. 14 ml of the lysing solution were added to 1 ml of blood and gently mixed for exactly 3 min. Cells were centrifuged at $300 \times g$ for 7 min. The pellet was resuspended in 10 ml of PBS-Na₂N₂, 0.1%.

and centrifuged again using the same conditions. Finally, cells were resuspended in 1600 μ l of the staining buffer. The viability of each cell suspension was determined and labelling was performed as described for the cells obtained by the FI gradient.

2.4.3. BDL

100 μ l of blood were centrifuged at $12000 \times g$ for 6-8 s and, after extracting the plasma, 50 μ l of MoAb at dilution 1/400 were added before incubating the mixture for 20 min at 4°C. Cells were then washed in PBS-FCS- NaN_3 and 100 μ l of an appropriate dilution of the second antibody were added. After 20 min at 4°C, the cells were washed once in PBS and resuspended in 100 μ l of PBS. After transferring the stained cells to a 5 ml tube, 2 ml of a 1/10 diluted BD FACS lysing solution (Becton Dickinson, San Jose, CA) were added; the tube was immediately shaken and incubated at room temperature for 10 min in the dark. After washing with PBS- NaN_3 , the cells were resuspended in PBS and analyzed as described below.

2.4.4. CQP lysis

100 μ l of blood were stained as described for BDL. After resuspending the cells in 80 μ l of PBS, they were carefully transferred to a 5 ml tube and processed with the use of the whole-blood lysis system Q-prep with its specific work station (Coulter Epics Immunoprep Leukocyte Preparation System, Coulter Immunology, Hialeah, FL, USA). During this procedure it is important not to allow any blood to adhere to the sides of the tube, otherwise red blood cells lysis may not be complete. A 35 s cycle was applied to each tube. Briefly, this method adds reagent A (1.2 ml/l formic acid and stabilizer) to lyse erythrocytes, reagent B (6 g/l sodium carbonate, 14.5 g/l sodium chloride, 31.3 g/l sodium sulfate and stabilizer), a leukocyte stabilizer, and reagent C (10 g/l paraformaldehyde in buffers), a cell membrane fixative. The lysed, fixed samples were then ready for flow cytometric analysis.

2.5. Flow cytometry analysis

Cells were analyzed for cell surface antigen expression using an Epics Elite flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA). Forward scatter

(FSC), side scatter (SSC) and green fluorescence (525 band pass filter) were used as acquisition parameters. Gates were set on FSC/SSC cytograms to include all viable lymphocytes by staining T and B lymphocytes together. 3×10^3 lymphocytes were analyzed in each sample. Data analysis was performed using the Epics Elite flow cytometry workstation program version 3.25 (Coulter) and the results were displayed as histograms.

2.6. Statistical analysis

The ANOVA analysis was applied to the flow cytometry data in order to test for significant differences in cell percentages due either to the method or to the antibody used. If significant differences ($p < 0.05$) due to the method used were found, a non-parametric paired test (Friedman) was then applied to determine which methods differed for each MoAb used. Differences between methods were considered significant at $p < 0.05$.

To test which of the antibodies used to stain blood B cells was most successful, the ANOVA analysis was applied only to those data obtained after staining with anti-CD45R-ABC, anti-I-A or anti-Ig-FITC antibodies.

3. Results

3.1. Identification of leukocyte subsets by light scattering characteristics

The major leukocyte populations in peripheral blood, obtained by the different isolation methods and distinguished by differing forward and side light scattering properties, are shown in Fig. 1. Following the FI gradient, a well-defined lymphocyte region and some monocytes can be seen, whereas there is a selective loss of granulocytes (Fig. 1A). The viability of cell suspensions obtained after use of the density gradient procedure was always higher than 97%. Following AC treatment, the three populations could be distinguished (Fig. 1B). After applying this lysing method, the viability of the cell suspensions was always higher than 95%. Both BDL and CQP methods gave three well-defined leukocyte populations, as shown in Fig. 1C and Fig. 1D. However, there

were markedly different locations of the granulocyte populations using these two methods.

3.2. Determination of T cell subpopulations

The lymphocyte counts in the rats studied were between 3800-7600 lymphocytes/ μ l (5096.9 ± 500.9 , mean \pm SEM) Table 1 summarizes the different lymphocyte subsets in absolute numbers. Fig 2

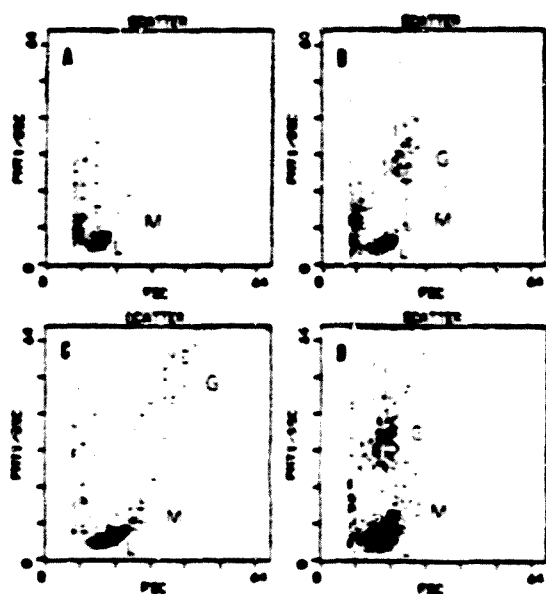


Fig. 1. Comparison of typical forward and side light scattering of isolated rat peripheral blood leukocyte subsets following the FI gradient (A), AC lysis (B), BDL (C) and CQP lysis (D). Light scatter regions typical of lymphocytes (L), monocytes (M) and granulocytes (G) are indicated.

shows the percentage of each lymphocyte subset for each method used.

The first statistical analysis applied to the isolation method and the antibody used, showed no significant differences due to the method applied in a general sense, but gave significant differences between methods for certain particular antibodies (interaction effect $p < 0.01$).

Further statistical analyses were performed using a non-parametric test and the results were the following. Using the anti-CD5 MoAb, no significant differences were found between the methods studied (Fig. 2A). The mean percentages of CD5⁺ cells with respect to the total number of lymphocytes ranged from 56.2% (FI gradient) to 63.4% (AC lysis). A non-significant but borderline p value ($p < 0.059$) was obtained when comparing results from FI gradient and AC lysis.

CD8⁺ lymphocytes were present in similar percentages using all the methods studied, the values ranging from 15.4% to 17.4% (Fig. 2B).

On the other hand, when measuring CD4⁺ lymphocytes, the percentages obtained from the BDL and AC lysing methods differed significantly, the values from AC lysis being higher than those obtained following BDL (Fig. 2C). None of the other pairwise combinations between methods showed any significant difference, although use of the FI gradient generated lower values than the other three methods (Table 1), achieving borderline p values with AC and CQP ($p < 0.059$).

Activated T cells were measured by means of the anti-CD25 MoAb. The mean values of CD25⁺ cells

Table 1

Absolute counts of T cell subsets and B cells obtained by the four lymphocyte isolation methods

MoAb	FI	AC	BDL	CQP
Anti-CD5	2856.1 \pm 283.1	3203.6 \pm 264.4	3021.5 \pm 218.6	3279.1 \pm 280.9
Anti-CD6	832.0 \pm 67.8	848.8 \pm 69.3	764.6 \pm 58.9	872.3 \pm 75.9
Anti-CD4	2389.3 \pm 247.2	2630.6 \pm 242.4	2427.2 \pm 180.6	2596.9 \pm 237.0
Anti-CD25	64.0 \pm 12.9	75.8 \pm 13.6	91.9 \pm 16.6	86.9 \pm 15.6
Anti-I-A	1518.2 \pm 204.6	394.6 \pm 206.1	1720.1 \pm 256.5	1530.5 \pm 220.2
Anti-CD45RABC	1326.8 \pm 128.4	1006.0 \pm 164.6	1159.8 \pm 151.0	1481.9 \pm 231.7
Anti-Ig-FITC	1441.5 \pm 205.4	1281.4 \pm 214.7	-	-

Results are expressed as means (number of leukocytes/ μ l) \pm SEM for at least seven samples.

obtained from each lymphocyte isolation method ranged from 1.2% (FI gradient) to 1.6% (BDL and CQP lysing methods) (Fig. 2D). Although these values were very low in all the methods studied, CD25⁺ lymphocytes isolated by the FI gradient were lower in percentage terms than the recoveries obtained with the BDL method ($p < 0.014$), or from the AC and CQP lysis methods (borderline p values: $p < 0.059$) (Fig. 2D). This reduction in CD25⁺ cells after use of the FI gradient is even more significant if we consider that some monocytes are lost and therefore lymphocytes are relative enriched.

3.3 B cells determinations

B cells were quantified in this study using different MoAb, namely, anti-CD45RABC, anti-I-A and anti-Ig-FITC. Recoveries of CD45RABC⁺ cells ranged from 19.6% (AC method) to 27.4% (CQP method) (Fig. 2E). When staining with the anti-I-A MoAb, the mean values for each of the four methods assayed ranged from 26.8% (AC method) to 33% (BDL method) (Fig. 2F). Differences between the percentages of I-A⁺ and CD45RABC⁺ cells may have been due to activated T cells or monocytes, which bear I-A molecules.

When B cells were identified with the anti-CD45RABC MoAb, the AC lysis method isolated significantly lower percentages of positive cells than

did the FI gradient ($p < 0.008$) or the CQP procedures ($p < 0.014$; Fig. 2E).

Data obtained following staining with the anti-I-A MoAb showed that use of the AC lysis method resulted in fewer I-A⁺ cells than did the BDL method ($p < 0.008$) or use of the FI gradient and CQP methods (borderline p values: $p < 0.059$) (Fig. 2F).

Obviously, anti-Ig-FITC was not used when labelling was performed on whole blood. No significant difference was found between the Ig⁺ cell percentages obtained by the FI density gradient procedure (28.1%) and those obtained following AC lysis (24.4%), although the values obtained following use of the AC lysis method were lower than those obtained after use of the FI gradient, achieving a borderline p value ($p < 0.058$).

Comparing the data generated with the three antibodies used to stain B lymphocytes after application of the FI gradient and AC lysis procedures, the latter method gave significantly lower percentages of positively stained cells than those obtained from the gradient ($p < 0.05$).

4. Discussion

In the present study we have established and compared the relative percentages of rat peripheral blood lymphocytes isolated by four different meth-

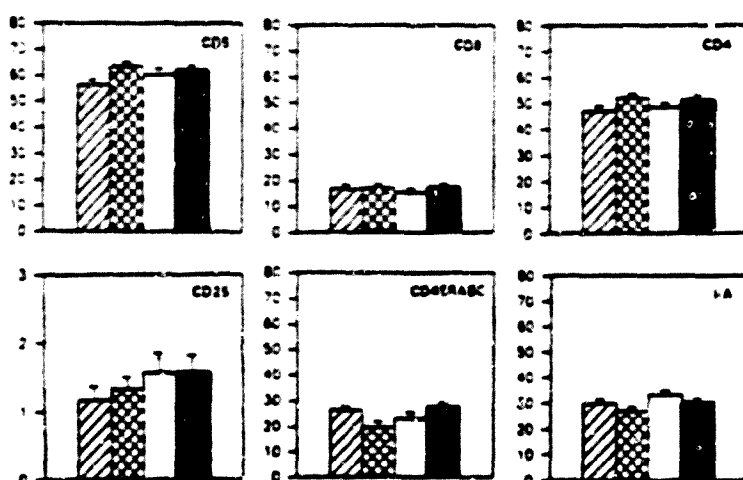


Fig. 2. Relative percentages obtained by flow cytometry after labelling with each MoAb used. CD5⁺ (A), CD8⁺ (B), CD4⁺ (C), CD25⁺ (D), CD45RABC⁺ (E) and I-A⁺ (F) cells are represented for each lymphocyte isolation method: FI (hatched bars), AC (cross-hatched bars), BDL (open bars) and CQP (closed bars). Results are expressed as means \pm SEM for at least seven samples.

ods, including some designed specifically for human blood. A preliminary analysis of all the results showed no significant differences between the four methods but a second statistical analysis of our results considering each monoclonal antibody separately, revealed some differences between the lymphocyte isolation methods studied.

The FI gradient procedure adapted to the rat led to the lowest T percentages when staining by anti-CD5, anti-CD4 and anti-CD25 MoAb. This finding suggests that after use of the density gradient a selective loss of some T cells occurred. These lost cells, however, did not produce a significant increase in T CD8⁺ or B cell percentages. In any case, it is useful to be aware of this effect of FI gradients, which may be important when studying CD4⁺ cells in diseases mediated by this T cell subset. On the other hand, the FI gradient is the only method of the four studied here that can be used to separate lymphocytes from granulocytes, or to isolate cells for later culture.

Erythrocyte lysis by means of AC provides a clear resolution of rat lymphocytes, monocytes and granulocytes, as has also been described in human blood (Terstappen et al., 1989). However, the AC lysing method produced some significant alterations in the lymphocyte subset percentages relative to the other methods studied. One effect of AC lysis which we found was an increase in the relative percentage of T cells and a decrease in that of B cells. Relative percentages of B cells obtained after AC lysis were lower than those from the other methods whether we stained with anti-I-A, anti-CD45RA⁺ or anti-Ig. Therefore our results suggest that the conditions used in this method are too extreme for B cells, some of which are lysed. This suggestion agrees with a study in human cells performed by Terstappen et al. (1989), who described a selective loss of CD19⁺ cell subpopulations after use of the AC procedure compared to the BDL and hypotonic-shock lysing methods. On the other hand, our results do not agree with those of Webster and Pockley (1993), who reported that the AC method did not affect I-A⁺ cells but produced a loss of low affinity CD25 in rat lymphocytes. In spite of the effect of AC upon B cells, the AC lysing method represents a low-cost method with easy applicability. The only consideration to take into account is the duration of lysis, which has to be established carefully and applied exactly, not allow-

ing the lysing solution to be in contact with the cells in excess. This last requirement means that lysis can be performed with only a few samples at a time.

The great advantage of the other two lysis methods studied, using the commercial Coulter Q-Prep and Becton Dickinson lysing solution, is that they are both very rapid. When using the CQP system, the volume in which the cells are resuspended before lysing is crucial. A slight excess of cell suspension or the adhesion of blood on the tube walls can render the sample useless. Moreover, we have demonstrated that the results obtained with this method on rat lymphocytes are as reliable as have been described for human blood (Kotlyo et al., 1991). In our case, the different rat leukocyte populations were well resolved in both 'lysis after labelling' methods, although it has been claimed that BDL does not effectively separate the populations in human blood (Terstappen et al., 1989). However, in that study, the authors used a higher proportion of the lysing solution. Both BDL and CQP methods involve higher costs than either the FI gradient or AC lysis procedures. Moreover, CQP lysis requires not only specific reagents but also a specific work station.

Many authors describe how lysis, labelling, fixation and storage conditions affect blood samples for flow cytometry (Ashmore et al., 1989; Edwards and Shopp, 1989; Caldwell, 1994; McCarthy et al., 1994). In this study we have compared the application of four methods to rat peripheral lymphocytes, and we have established B and T cell subpopulations. After ascertaining the variations associated with each method and the cell percentages recovered, the most suitable method should be selected on the basis of specific needs. The two commercial methods are very reliable for the quantification of T lymphocyte subsets, whereas the AC lysis and FI gradient procedures are cheaper and more useful if some of the cells have to be cultured thereafter.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the FIS (ref. 92/0707). C. Pelegrí is a holder of a fellowship from the *Ministerio de Educación y Ciencia*. The authors are very grateful to Dr. Jordi Vilaplana for expert advice and help in the statistical analysis of

the data and to Rosario González for technical assistance.

References

- Aust, F., Cerottini, J.C., Coombs, R.A., Cooper, M., Dickler, H.B., Froland, S.S., Fudenberg, H.H., Greaves, M.F., Grey, H.M., Kunkel, H.G., Narvig, J.B., Preud'homme, J.L., Rabbellino, E., Rits, R.E., Rowe, D.S., Seligmann, M., Siegal, F.P., Stjernswärd, J., Terry, W.D. and Wybran, J. (1974) Identification, enumeration, and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand J Immunol* 3, 521.
- Ashmore, L.M., Shopp, G.M. and Edwards, B.S. (1989) Lymphocyte subsets analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods* 118, 209.
- Boyum, A. (1974) Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 4, 269.
- Brideau, R.J., Carter, P.B., McMaster, W.R., Mason, D.W. and Williams, A.F. (1982) Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 10, 609.
- Caldwell, C.W. (1994) Preservation of B-cell-associated surface antigens by chemical fixation. *Cytometry* 16, 743.
- Dallman, M.J., Thomas, M.L. and Green, J.R. (1984) MRC OX-19: A monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments in vitro proliferative responses. *Eur J Immunol* 14, 260.
- Edwards, B.S. and Shopp, G.M. (1989) Efficient use of monoclonal antibodies for immunofluorescence. *Cytometry* 10, 94.
- Franch, A., Castellote, C., Pelegri, C., Tolosa, E. and Castell, M. (1993) Blood B²²⁰ CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in female Wistar rats. *Ann Hematol* 67, 115.
- Korylo, P.K., Sample, R.B., Redmond, N.L. and Hibner, G.C. (1991) Reference ranges for lymphocyte subsets: A comparison of standard vs rapid whole-blood lysis techniques. *Arch Pathol Lab Med* 115, 181.
- Mansour, I., Bourn, P., Rouger, P. and Dornei, C. (1990) A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of lymphocyte subsets using flow cytometry. *J Immunol Methods* 127, 61.
- McMaster, W.R. and Williams, A.F. (1979) Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur J Immunol* 9, 426.
- McCarthy, D.A., Macey, M.G., Cahill, M.R. and Newland, A.C. (1994) Effect of fixation on quantification of the expression of leucocyte function-associated surface antigens. *Cytometry* 17, 39.
- Paterson, D.J., Jeffenes, W.A., Green, J.R., Brandon, M.R., Corthey, P., Puklavec, M. and Williams, A.F. (1987) Antigen of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive blasts. *Mol Immunol* 24, 1281.
- Terstappen, L.W.M.M., Meiners, H. and Loken, M.R. (1989) A rapid sample preparation technique for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations. *J Immunol Methods* 123, 103.
- Webster, G.A. and Pockley, A.G. (1993) Effect of red cell lysis protocols on the expression of rat peripheral blood lymphocyte subset and activation antigens. *J Immunol Methods* 163, 115.
- White, R.A.H., Mason, D.W., Williams, A.F., Galfre, G. and Milstein, C. (1978) T-lymphocyte heterogeneity in the rat: separation of functional subpopulations using a monoclonal antibody. *J Exp Med* 148, 664.
- Woollet, G.R., Barclay, A.N., Puklavec, M. and Williams, A.F. (1984) Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 15, 168.

