

Mecanismos de acción de fármacos modificadores de la evolución de la artritis reumatoide

Ana M. Ortiz, Isidoro González-Álvaro y Armando Laffón

Servicio de Reumatología. Hospital Universitario de La Princesa. Madrid.

Introducción

El empleo de diversos fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) para el tratamiento de la Artritis Reumatoide (AR), ha demostrado su utilidad mejorando el curso y el pronóstico de ésta¹. En la mayoría de los casos, estos medicamentos se han utilizado de forma intuitiva, sin conocer exactamente su mecanismo de acción².

Durante los últimos 15 años se ha producido un gran avance en el conocimiento de la patogenia de la AR que, a su vez, ha derivado en un mejor conocimiento de los mecanismos de acción por los que los FAME son eficaces. Los datos de los que disponemos proceden tanto de estudios *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, su interpretación no es fácil. En el caso de los estudios *in vivo* es difícil establecer si el hallazgo descrito es una acción directa del fármaco o una consecuencia de otro mecanismo de acción diferente. Un ejemplo evidente es el de los nuevos tratamientos anti-TNF, cuyo mecanismo de acción es el bloqueo directo de esta molécula con la consiguiente disminución de la expresión de moléculas de adhesión y producción de moléculas inflamatorias como citocinas, quimiocinas, COX-2, etc. En cuanto a los estudios *in vitro*, o bien las dosis eficaces con frecuencia son mayores que las alcanzadas en plasma, o la relación tiempo-respuesta difiere de la observada en la práctica clínica. Esto nos impide determinar con exactitud si lo que estamos observando es un efecto terapéutico o tóxico como consecuencia de las altas dosis. Cuando ambos tipos de estudio llegan a la misma conclusión, por ejemplo que disminuya la expresión de moléculas de adhesión, es probable que estemos ante un verdadero mecanismo de acción del fármaco estudiado.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en esta revisión realizamos una puesta al día sobre los mecanismos de acción de los FAME basándonos en la información disponible sobre la patogenia de la artritis reumatoide.

Patogenia de la artritis reumatoide

Es muy probable que, en un huésped genéticamente predispuesto, la interacción entre la célula presentadora de antígeno, que ha estado en contacto con un agente desencadenante desconocido, y su linfocito T específico sea determinante para el inicio de la enfermedad (fig. 1)³. Sin embargo, esta interacción podría preceder en mucho tiempo al inicio de los síntomas.

Conocemos mejor los fenómenos que perpetúan y amplifican la respuesta inflamatoria en la sinovial de pacientes con AR. La escasa producción de factores solubles por los linfocitos (principalmente INF- γ , IL-18 e IL-17)^{4,5} y, sobre todo, la interacción celular entre linfocitos y macrófagos mediante las moléculas co-estimulantes expresadas^{6,7} conducen a la activación de los macrófagos y a la producción de una cascada de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1, IL-6, IL-15 y GM-CSF)⁸ entre las que, es bien conocido, el TNF juega un papel primordial (fig. 1).

Esta producción de citocinas da lugar a la neovascularización⁹, la infiltración por leucocitos de la membrana sinovial y su migración a través de los vasos neoformados que expresan gran cantidad de moléculas de adhesión¹⁰ (fig. 2).

En este ambiente inflamatorio también se induce la proliferación de sinoviocitos que, junto con los neutrófilos llegados a la articulación, producen metaloproteasas, óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos y radicales libres de oxígeno; todos ellos se implican en mayor o menor medida en la destrucción tisular que acompaña a la AR¹¹ (fig. 3).

Un punto común de toda esta maraña de mecanismos patogénicos es que la producción de la mayoría de las moléculas relacionadas con la inflamación, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, ciclooxigenasa-2 (COX-2), etc. esté controlada por factores de transcripción de la familia

Correspondencia: Armando Laffón Roca.
Servicio de Reumatología.
Hospital Universitario de la Princesa.
Diego de León, 62. 28006 Madrid.

Manuscrito recibido el 6-3-2001 y aceptado el 27-11-2001.

Rev Esp Reumatol 2001; 28: 420-427

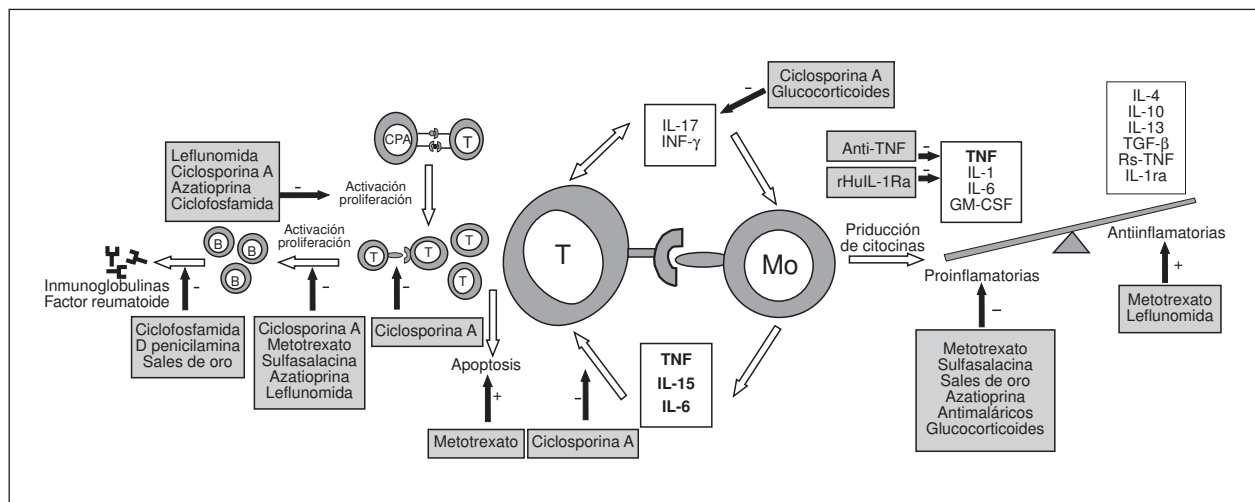


Figura 1. Patogenia de la artritis reumatoide I (ARI). Reconocimiento antigénico, proliferación celular y producción de citocinas. B: linfocito B; T: linfocito T; CPA: célula presentadora de antígeno; Mo: monocito; IL: interleucina; IFN- γ : interferón γ ; TNF: factor de necrosis tumoral; rHuIL-1Ra: receptor de interleucina-1 humano recombinante; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; TGF- β : factor de crecimiento transformador β .

de NF κ B (factor nuclear κ B), aunque otros grupos de factores de transcripción como AP-1 o NFAT (factor nuclear de células T activadas) también están implicados¹². NF κ B está constituido por un dímero de proteínas situado en el citoplasma celular que, en condiciones basales, no activado, se encuentra ligado a su factor inhibidor I κ B, lo que impide su entrada en el núcleo. Ante determinados estímulos, se produce la liberación de I κ B por cinasas específicas; esto permite que NF κ B entre en el núcleo celular activando las regiones promotoras de los genes de las distintas proteínas relacionadas con la inflamación (fig. 4). Así, por ejemplo, TNF e IFN- γ , al actuar sobre sus receptores, activan la quinasas de I κ B y permiten que NF κ B induzca la transcripción y producción de todas las moléculas relacionadas con él.

Metotrexato y Sulfasalacina

El metotrexato es un análogo de los folatos, capaz de inhibir la dihidrofolato reductasa, enzima implicada en la síntesis de novo de purinas y pirimidinas, necesarias para la formación de ADN y ARN que se requieren para la proliferación celular. Inicialmente, este fármaco se empleó pensando en su utilidad como antiproliferativo. Sin embargo, hay datos que no apoyan que éste sea su mecanismo de acción en la AR, como son: su eficacia a dosis más bajas que las empleadas en oncología, la rápida respuesta clínica y analítica tras su administración así como la ausencia de proliferación evidente de linfocitos en la sinovial reumatoide.

Actualmente se sabe que el metotrexato se acumula rápidamente en el interior de las células en forma de poliglutamatos, que tienen una alta afinidad por la 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótida (AICAR) transformilasa¹³. La inhibición de este sistema enzimático conduce a un aumento en la liberación de adenosina a la sangre¹⁴ (fig. 5). La adenosina interacciona con sus receptores específicos en células del sistema inmune, receptores tipo A2 y A3¹⁵, desencadenando una respuesta inhibitoria, cuyas consecuencias son apoptosis de linfocitos activados¹⁶ y disminución de la producción de TNF, IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-12¹⁷, así como aumento de la liberación de IL-6, IL-10 y del antagonista del receptor de IL-1¹⁸ (fig. 1). Otras consecuencias de su acción son la inhibición de la migración de leucocitos (fig. 2), la reducción de la actividad COX-2¹⁹ y la disminución en la producción de metaloproteasas²⁰.

La sulfasalacina comenzó a utilizarse para el tratamiento de la AR tras comprobar su eficacia en la artritis desarrollada por algunos pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, parece que tiene un mecanismo de acción diferente en ambas enfermedades, ya que el 5-aminosalicilato, fragmento de la molécula de la sulfasalacina, es eficaz en la enfermedad inflamatoria intestinal pero no en la AR. En la actualidad sabemos que, al igual que el metotrexato, aumenta los niveles extracelulares de adenosina²¹ y produce así los mismos efectos.

Además, la sulfasalacina ejerce un potente efecto inmunomodulador sobre las células B inhibiendo su proliferación, lo que se traduce en hipogammaglobulinemia²² e inhibe la proliferación de células endoteliales²³.

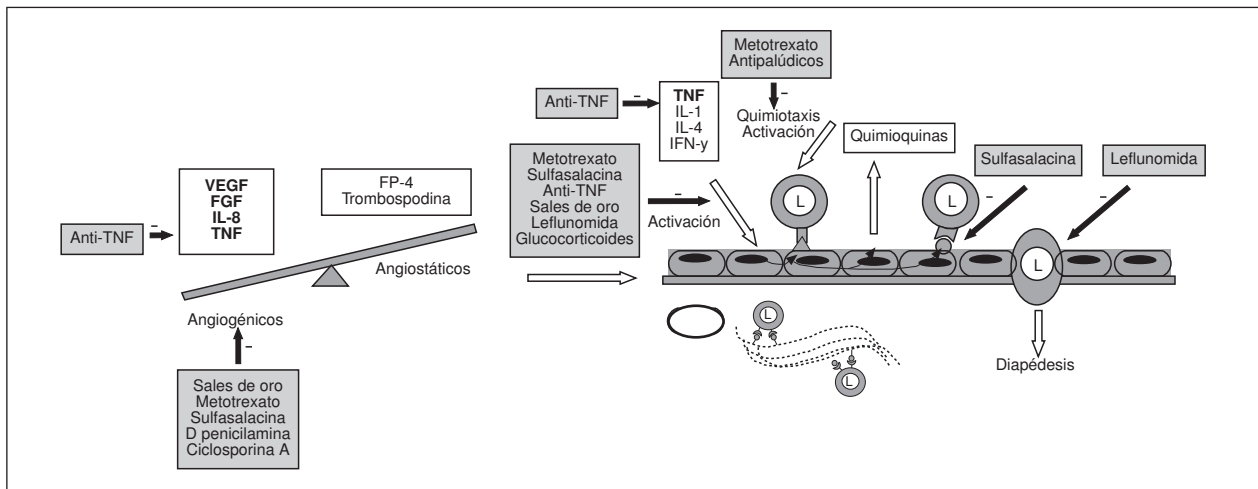


Figura 2. Patología de la artritis reumatoide II (ARII). Angiogénesis, activación del endotelio vascular y migración de leucocitos al foco inflamatorio. L: leucocito; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; FGF: factor de crecimiento fibroblástico; FP-4: factor plaquetario 4; IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN- γ : interferón γ .

Leflunomida

A diferencia del resto de los FAME, el desarrollo de la leflunomida se ha dirigido desde un principio a su empleo en la AR. Es un profármaco que se transforma rápidamente en su metabolito activo, A77-1726, en el aparato gastrointestinal y el plasma. El A77-1726 inhibe la dihidro-orotato deshidrogenasa, limitando la síntesis de pirimidinas necesarias para la proliferación celular de los linfocitos T y B²⁴. La disminución de los niveles de pirimidinas provoca la activación de la proteína p53, que se desplaza al núcleo celular impidiendo el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular²⁵. El hecho de que p53 se encuentre sólo en linfocitos activados explica el efecto selectivo de la leflunomida sobre estas células²⁶ (fig. 1).

Sin embargo, en la sinovial reumatoide hay un número mínimo de linfocitos en proliferación, por eso diferentes autores han propuesto otras dianas terapéuticas para este fármaco. La leflunomida podría disminuir la actividad de las tirosinasas²⁷, suprimir la acción de NF κ B²⁸ y contribuir a la inhibición del contacto intercelular al disminuir la glicosilación de moléculas de membrana²⁹. Todo ello conduciría a la disminución de la producción de citocinas proinflamatorias y aumento de las antiinflamatorias (fig. 1), inhibición del reclutamiento de leucocitos³⁰ (fig. 2) y regulación del balance entre metaloproteasas y sus inhibidores (fig. 3).

Ciclosporina A y FK 506

La ciclosporina A es un potente inmunosupresor cuyo empleo ha supuesto un gran avance en el

manejo de pacientes trasplantados. Debido a sus propiedades inmunomoduladoras, su uso se ha extendido a otras enfermedades en las que se produce una alteración de la inmunorregulación como es el caso de la AR, en la que ha demostrado su eficacia³¹.

La ciclosporina A alcanza, por simple difusión, el citoplasma celular donde se une a las ciclofilinas. El complejo ciclofilina-ciclosporina A inhibe la calcineurina, enzima que defosforila el factor de transcripción NF-AT (fig. 6), presente en la mayoría de las células del sistema inmune. La defosforilación de este factor es esencial para su desplazamiento al núcleo celular donde activa la transcripción del gen de determinadas citoquinas (IL-2, IL-4, IL-8, GM-CSF, IFN- γ , TNF) y de otras moléculas críticas para la respuesta inmune como CD40L³².

Aunque la producción local de citocinas de origen linfocitario como IL-2, IL-4 e IFN- γ es controvertida, Ziolkowska et al han descrito que la ciclosporina A inhibe la producción de IL-17 mediada por IL-15 en linfocitos T del infiltrado sinovial³³ (fig. 1). Además, otro mecanismo que explicaría la eficacia de este fármaco en la AR es su capacidad para inhibir la transcripción de genes de citocinas no linfocitarias o de moléculas linfocitarias coestimulantes. En este sentido, nuestro grupo ha estudiado su capacidad para inhibir la expresión de CD69 inducida por IL-15 en linfocitos³⁴ (fig. 1).

El tacrolimus (FK506), fármaco con el que se han descrito casos aislados de eficacia en la AR, actúa de forma muy parecida a la CsA inhibiendo la actividad de la calcineurina, tras unirse a la proteína FKBP (fig. 6) de la familia de las inmunofilinas³⁵.

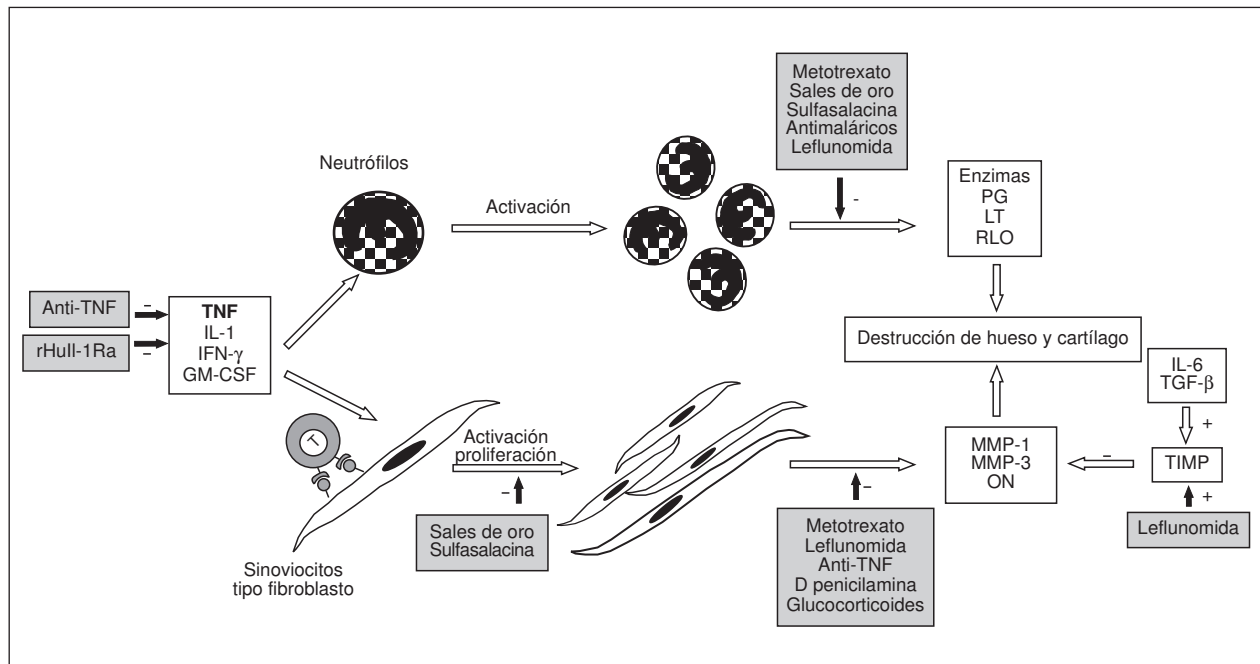


Figura 3. Patogenia de la artritis reumatoide III (ARIII). Mecanismos efectorios. IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN- γ : interferón γ ; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; RLO: radicales libres de oxígeno; MMP: metaloproteasa de matriz; ON: óxido nítrico; TGF- β : factor de crecimiento transformador β ; TIMP: inhibidor tisular de metaloproteasas.

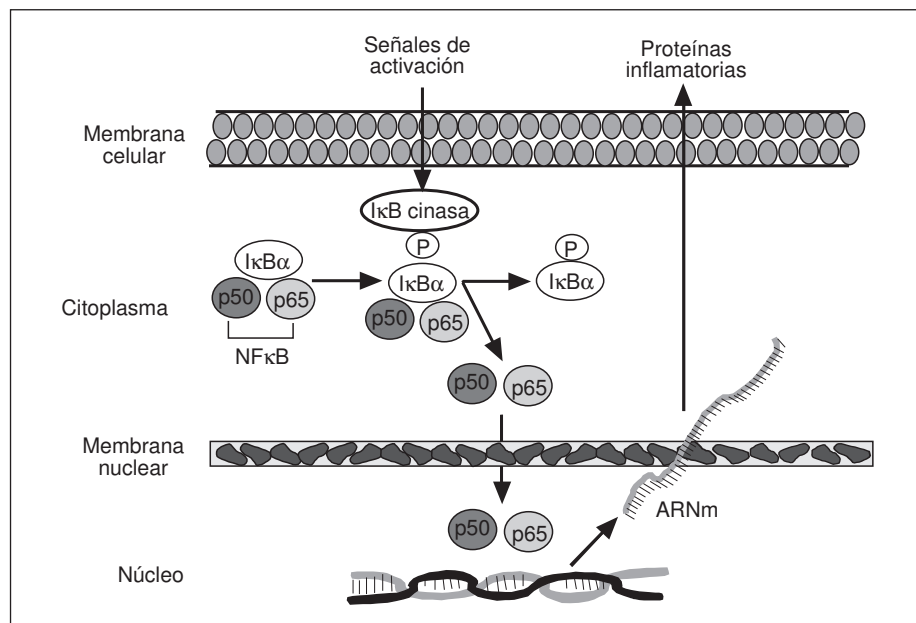


Figura 4. Factores de transcripción. NFκB: factor nuclear κB; IκB: factor inhibidor κB; P: fosfato.

Otros fármacos modificadores de la evolución de la AR

Sales de oro

El efecto terapéutico fundamental de las sales de oro parece ejercerse sobre los neutrófilos³⁶ y mono-

citos³⁷, en los que se produce una acumulación selectiva del fármaco. La disminución de la producción de IL-1, IL-6, TNF e IFN- γ es la consecuencia de su efecto sobre los monocitos² (fig. 1). También se ha descrito que inhibe la proliferación de sinoviocitos y células endoteliales³⁸ (fig. 2 y 3). En estas últimas se ha demostrado que inhiben la expresión de selectina E tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que

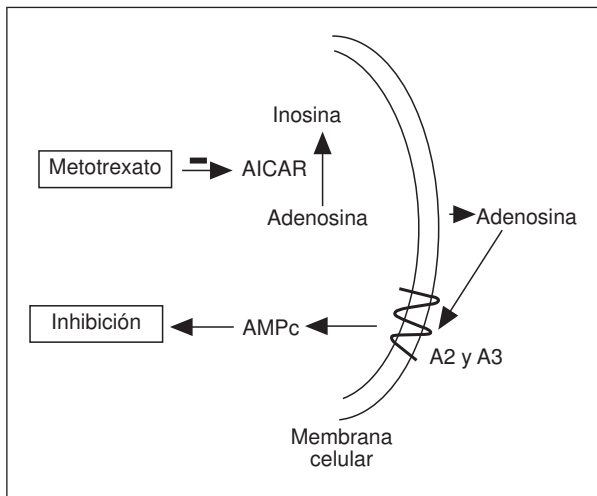


Figura 5. Mecanismo de acción del metotrexato. AICAR: 5-aminimidazol-4-carboxiamina ribonucleótido transformilasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

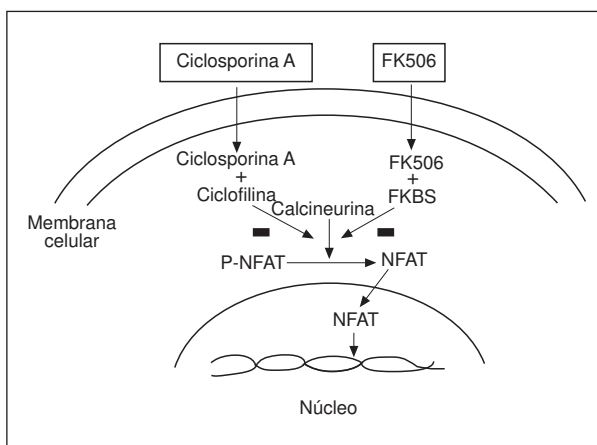


Figura 6. Mecanismo de acción de la ciclosporina A. NFAT: factor nuclear de células T activadas; P: fosfato.

disminuye la migración leucocitaria hacia los focos de inflamación^{39,40} (fig. 2).

Por otra parte, parece que las sales de oro pueden inhibir directamente la unión del ADN a los factores de transcripción, como NFκB⁴¹, y disminuir la proliferación de sinoviocitos.

Antipalúdicos

El mecanismo de acción de los antipalúdicos sigue siendo desconocido. Se acumulan en las organelas celulares con un Ph ácido (lisosomas y aparato de Golgi) y, al afectar al Ph, pueden inhibir la acción de ciertas enzimas (proteasas, catepsinas y fosfolipasas). Esto provoca distintos efectos en los diferentes tipos celulares implicados en la inflamación: en los polinucleares inhibe la quimiotaxis y la fago-

citosis⁴² (fig. 2); en los monocitos interfiere con el procesamiento y presentación del antígeno⁴³ y en linfocitos inhibe la proliferación⁴⁴.

D-penicilamina

Se han propuesto dos mecanismos de acción para la D-penicilamina. Por una parte, su molécula contiene un grupo tiol que podría alterar los receptores de la superficie celular mediante la reducción de grupos sulfidrilos⁴⁵. Por otra, la oxidación de la D-penicilamina puede originar grupos peróxidos que afectarían a las distintas funciones celulares (linfocitos T, células endoteliales y fibroblastos)².

Azatioprina

Es un análogo de purinas que interfiere con la síntesis de adenosina y guanina. Es un antimetabolito, tóxico para las células en fase S, que actúa inhibiendo la proliferación de las células T (46), B (47) y NK (48) (fig. 1). La azatioprina disminuye los niveles séricos de IL-6 aunque esto parece más consecuencia de la mejoría de la enfermedad que de una acción directa del fármaco⁴⁹.

Ciclofosfamida y clorambucil

Ambos son potentes inmunosupresores que inhiben la proliferación celular en su fase premitótica (G2) además de distintas vías metabólicas. Alquilan el ADN, lo que se traduce en roturas, uniones cruzadas y disminución en su síntesis⁵⁰. Su principal diana en la AR son los linfocitos B⁵¹ (fig. 1) aunque, a dosis altas, puede disminuir también la proliferación de linfocitos T, sobre todo CD8+⁵².

Glucocorticoides

Los glucocorticoides se unen, en el citoplasma celular, a receptores citoplasmáticos específicos que se expresan en distintos tipos celulares, incluyendo linfocitos, monocitos y neutrófilos. Son capaces de inhibir la actividad de NFκB aumentando la transcripción de su inhibidor IκB⁵³. También regulan aspectos postranscripcionales como la traducción del ARN y la síntesis y secreción de proteínas.

Al aumentar los niveles de IκB, los corticoides impiden la internalización de NFκB en el núcleo celular inhibiendo la transcripción de los genes de COX-2, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IFN-γ y GM-CSF⁵⁴, moléculas de adhesión, etc. (fig. 1). La consecuencia de ello es un bloqueo rápido y generalizado de las funciones del sistema inmune.

Agentes biológicos

El mayor conocimiento de la patogenia de la AR junto con el avance experimentado por la biotec-

nología han permitido el uso de diferentes agentes biológicos dirigidos selectivamente contra algunos componentes de la respuesta inflamatoria sin causar inmunosupresión generalizada. Se han desarrollado agentes frente a moléculas de adhesión, quimiocinas, componentes del complemento, moléculas de activación y coestimulantes en la superficie de los linfocitos T, etc. Pero, sin duda, las que han experimentado un mayor avance han sido las dirigidas contra citocinas proinflamatorias, fundamentalmente IL-1 y TNF que, como hemos visto, modulan la mayor parte de los procesos que provocan inflamación y destrucción articular.

Antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra)

El IL-1Ra es una citocina antiinflamatoria secretada por macrófagos que se une al receptor de la IL-1 pero sin transmitir ninguna señal activadora, de forma que, al interferir la unión de IL-1 con su receptor, impide su función⁵⁵. Aunque se han detectado niveles valorables de IL-1Ra en el líquido sinovial de pacientes con AR, para producir la inhibición completa de IL-1 se requerirían niveles de IL-1Ra 10-100 veces superiores a los de ésta⁵⁶. La producción de IL-1Ra humano recombinante (rHuIL-1Ra) ha permitido su uso clínico para bloquear los receptores de IL-1. La consecuencia de la administración de rHuIL-1Ra es la inhibición de la producción de prostaglandina E2 y colagenasa por los condrocitos evitando además la inhibición de la síntesis de glicoproteínas y la inducción de la degradación de proteoglicanos que produce la IL-1⁵⁷. Por estas razones, el tratamiento con rHuIL-1Ra en pacientes con AR ha demostrado que reduce el daño estructural⁵⁸.

Anti-TNF

El TNF es quizá la citocina más relevante de las implicadas en la patogenia de la AR. El bloqueo de su actividad provoca la reducción de los niveles séricos de otros mediadores inflamatorios (IL-1 e IL-6)^{59,60}, de la expresión de quimioquinas (IL-8 y MCP-1)⁶¹, de la migración linfocitaria⁶² y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)⁶³. Además, reduce los niveles séricos de metaloproteasas⁶⁴ y óxido nítrico⁶⁵ (figs. 1-3).

En la actualidad disponemos de 2 agentes biológicos anti-TNF: el *infliximab*, un anticuerpo monoclonal quimérico que se une al TNF soluble y al unido a la membrana celular; *etanercept*, una molécula diseñada por ingeniería genética que consta de 2 porciones extracelulares del receptor p75 del TNF unidas a la fracción Fc de IgG humana, para conferirle mejores propiedades farmacocinéticas. Los excelentes resultados clínicos obtenidos con estos fármacos han hecho que, hoy día, varios fármacos anti-TNF estén en distintas fases de desarrollo.

Conclusiones

En los últimos años, el conocimiento de la patogenia de la AR y los mecanismos de acción de los fármacos modificadores de su evolución han avanzado paralelamente. Estamos convencidos de que un conocimiento más profundo de cómo actúan los FAME en el complejo entramado de la AR nos permitirá hacer un uso más juicioso de estos fármacos y sus combinaciones.

Bibliografía

1. Fries JF. Current treatment paradigms in rheumatoid arthritis. *Rheumatology Oxford* 2000; 39 (Supl 1): 30-35.
2. Choy E, Panayi G. Mechanisms of action of second-line agents and choice of drugs in combination therapy. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17 (Supl 18): 20-28.
3. Fox DA. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 598-609.
4. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid Arthritis. *Cell* 1996; 85: 307-310.
5. Firestein GS, Álvaro-Gracia JM, Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990; 144: 3347-3353.
6. Panayi GS. T-cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1997; 9: 236-240.
7. Li JM, Isler P, Dayer JM, Burger D. Contact-dependent stimulation of monocytic cells and neutrophils by stimulated human T-cells clones. *Immunology* 1995; 4: 571-576.
8. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 397-440.
9. Koch AE. Angiogenesis. Implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 951-962.
10. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990; 62: 3-6.
11. Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis. *J Rheum* 1999; 26: 717-719.
12. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 1: 7-11.
13. Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA. Inhibition of phosphoribosyl-aminimidazole-carboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4881-4885.
14. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 1993; 92: 2675-2682.
15. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 739-755.
16. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest* 1998; 15: 322-328.
17. Bouma MG, Stad RK, van der Wildenberg FAJM, Buurman WA. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J Immunol* 1994; 153: 4159-4168.
18. Cutolo M, Bisso A, Sulli A, Felli L, Briata M, Pizzorni C et al. Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 2000; 27: 2551-2557.
19. Mello SBV, Barros DM, Silva ASF, Laurindo IMM, Novages GS. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000; 39: 533-536.

20. Kraan MC, Koster BM, Elferink JGR, Post WJ, Breedveld FC, Tak PP. Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1488-1495.
21. Gadangi P, Longaker M, Naime D, Levin RI, Recht PA, Montesinos MC et al. The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J Immunol* 1996; 156: 1937-1941.
22. Imai F, Suzuki T, Ishibashi T, Dohi Y. Effect of sulfasalazine on B cells. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 259-264.
23. Madhok R, Wijelath E, Smith J, Watson J, Sturrock RD, Capell HA. Is the beneficial effect of sulfasalazine due to inhibition of synovial neovascularization? *J Rheumatol* 1991; 18: 199-202.
24. Fox RI, Herrmann ML, Frangou CG, Wahl GM, Morris RE, Strand V et al. Mechanism of action for Leflunomide in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 1999; 3: 198-208.
25. Breedveld FC, Dayer JM. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 11: 841-849.
26. Fox RI. Mechanism of action of leflunomide in rheumatoid arthritis. *J Rheum* 1998; 25 (Supl 53): 20-26.
27. Xu XL, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A, Chong AS. Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J Biol Chem* 1995; 270: 12398-12403.
28. Manna SK, Aggarwal BB. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor- κ B activation and gene expression. *J Immunol* 1999; 162: 2095-2102.
29. Dimitrijevic M, Barlett RR. Leflunomide, a novel immunomodulating drug, inhibits homotypic adhesion of mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *Transplant Proc* 1996; 28: 3086-3087.
30. Grisar J, Eselbock D, Koller MD, Aringer M, Stummvoll GH, Pietschmann P et al. Leflunomide reduces transendothelial migration. *Arthritis Rheum* 2001; 9: S297.
31. Tugwell P, Bombardier C, Gent M, Bennet KJ, Bensen WG, Carrette S et al. Low dose cyclosporin versus placebo in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; 335: 1051-1055.
32. Rao A, Luo Ch, Hogan PG. Transcription factors on the NFAT family, regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 707-747.
33. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* 2000; 164: 2832-2838.
34. Ortiz AM, García-Vicuña R, Sancho D, Laffon A, Sánchez-Madrid F, González-Álvarez I. Cyclosporin A inhibits CD69 expression induced on lymphocytes by IL-15. *J Rheumatol* 2000; 27: 2329-2338.
35. Brazelton TR, Morris RE. Molecular mechanism of action of neo xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin), mycophenolate mofetil and leflunomide. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 710-720.
36. Rudkowski R, Ziegler JB, Graham GG, Joulanos G. Gold complexes and activation of human polymorphonuclear leukocytes. Dissociation of changes in membrane potential and oxidative burst. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1091-1098.
37. Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 870-875.
38. Kawakami A, Eguchi K, Migita K, Nakao H, Otsubo T, Ueki Y et al. Inhibitory effects of gold sodium thiomalate on the proliferation and interferon-gamma induced HLA-DR expression in human endothelial cells. *J Rheumatol* 1990; 17: 430-435.
39. Newman PM, To SS, Robinson BG, Hyland VJ, Schrieber L. Effect of gold sodium thiomalate and its thiomalate component on the in vitro expression of endothelial cell adhesion molecules. *J Clin Invest* 1994; 5: 1864-1871.
40. Corkill MM, Kirkham BW, Haskard DO, Barbatis C, Gibson T, Panayi GS. Gold treatment of rheumatoid arthritis decreases synovial expression of the endothelial leukocyte adhesion receptor ELAM-1. *J Rheumatol* 1991; 10: 1453-1460.
41. Handel ML, Sivertsen S, Watts CK, Day RO, Sutherland RL. Comparative effects of gold on the interactions of transcription factors with DNA. *Agents Actions* 1993; 44 (Supl): 219-223.
42. Rhodes JM, McLaughlin JE, Brown DJ, Nuttall LA, Jewell DP. Inhibition of leukocyte motility and prevention of immune-complex experimental colitis by hydroxychloroquine. *Gut* 1982; 23: 181-187.
43. Salmeron G, Lipsky PE. Immunosuppressive potential of antimalarials. *Am J Med* 1983; 75: 19-24.
44. Panayi GS, Neill WA, Duthie JJR, McCormick JN. Action of chloroquine phosphate in Rheumatoid Arthritis. I Immunosuppressive effect. *Ann Rheum Dis* 1973; 32: 316-318.
45. Bacon PA, Salmon M. Modes of action of second-line agents. *Scand J Rheumatol* 1987; 64 (Supl): 17-24.
46. Al-Safi SA, Maddocks JL. Effects of azathioprine on the human mixed lymphocyte reaction (MLR). *Br J Clin Pharmacol* 1983; 15: 203-209.
47. Abdou MI, Zweiman B, Casella SR. Effects of azathioprine therapy on bone marrow-dependent and thymus-dependent cells in man. *Clin Exp Immunol* 1973; 13: 55-64.
48. Cseuz R, Panayi GS. The inhibition of NK cell function by azathioprine during the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1990; 29: 358-362.
49. Barrera P, Boerbooms AM, Janssen EM, Saverwein RW, Gallati H, Mulder J et al. Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor- α , and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis. Longitudinal evaluation during methotrexate and azathioprine therapy. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1070-1079.
50. Moore MJ. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* 1991; 20: 194-208.
51. Scott DG, Bacon PA, Allen C, Elson CJ, Wallington T. IgG rheumatoid factor, complement and immune complexes in rheumatoid synovitis and vasculitis: Comparative and serial studies during cytotoxic therapy. *Clin Exp Immunol* 1981; 43: 54-63.
52. Bast RC, Bast BS. Clinical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with nonspecific immunostimulants. *Ann NY Acad Sci* 1976; 277: 60-93.
53. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 1995; 267: 286-290.
54. Guyre PM, Girard MT, Morganelli PM, Manganiello PD. Glucocorticoid effects of the production and actions of immune cytokines. *J Steroid Biochem* 1988; 30: 89-93.
55. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54: 167-227.
56. Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ et al. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 644-652.
57. Smith RJ, Chin JE, Sam LM, Justen JN. Biologic effects of an interleukin-1 receptor antagonist protein of interleukin-1 stimulated cartilage erosion and chondrocyte responsiveness. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 78-83.
58. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 1998; 12: 2196-2204.
59. Lorenz HM, Antoni C, Valerius T, Repp R, Grunke M, Schwerdtner N, et al. In vivo blockade of TNF- α by intravenous infusion of a chimeric monoclonal TNF- α antibody in patients with rheumatoid arthritis: Short term cellular and molecular effects. *J Immunol* 1996; 156: 1646-1653.
60. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF- α antibodies on synovial cell Interleukin-1 production in Rheumatoid Arthritis. *Lancet* 1989; 244-247.

61. Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R et al. Reduction of chemokine levels and leucocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 38-47.
62. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Ishida H et al. Long-term follow-up of the changes in circulating cytokines, soluble cytokine receptors and white blood cell subset counts in patients with rheumatoid arthritis (RA) after monoclonal anti-TNF-alpha antibody therapy. *J Clin Immunol* 1999; 19: 305-313.
63. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1258-1265.
64. Brennan FM, Browne KA, Green PA, Jaspar JM, Maini RN, Feldmann M. Reduction of serum matrix metalloproteinase I and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumor necrosis factor alpha (cA2) therapy. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 643-650.
65. Perkins DJ, St Clair EW, Misukonis MA, Weiberg JB. Reduction of NOS2 overexpression in rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody (cA2). *Arthritis Rheum* 1998; 41: 2205-2210.