



**Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia**

**TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR DE
LA MIASTENIA GRAVIS CON
TACROLIMUS (FK506)**

Tesis realizada por:
Jamal Azem Abderrazek.

Dirección de la tesis:
Prof. Manuel Armengol Carrasco.
Dr. José María Ponseti Bosch.

Barcelona 2006.

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Medicina

Departament de Cirurgia

TESIS DOCTORAL

**TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR DE
LA MIASTENIA
GRAVIS CON TACROLIMUS (FK506)**

Tesis realizada por Jamal Azem Abderrazek para optar al grado de Doctor de Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dirección de la tesis:
Prof. Manuel Armengol Carrasco.
Dr. José María Ponseti Bosch.

Barcelona, 2006.

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE
BARCELONA**



**FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE CIRURGIA**



Facultat de Medicina

HOSPITAL UNIVERSITARI

VALL D'HEBRON



SERVEI DE CIRURGIA GENERAL

I DE L'APARELL DIGESTIU

BARCELONA, 2006.

A mis hijos, Yasmín, Nur y Nabil por su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Manuel Armengol Carrasco, Catedrático de Patología y Clínica Quirúrgica de la Universidad Autónoma de Barcelona y jefe de Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Mi más sincero y profundo agradecimiento por la orientación, dirección y extraordinaria e incansable colaboración en la elaboración de este trabajo, sin las cuales no hubiera podido llevar acabo y por su magnífica cualidad humana.

Al Dr. José María Ponseti Bosch, Jefe de la Unidad de Miastenia Gravis del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, codirector de esta tesis, pionero en España en el tratamiento de los pacientes miastenicos, y que durante su larga experiencia profesional ha acumulado una de las mayores series de pacientes con miasténia gravis. Me honra haber trabajado a su lado y aprender de su gran experiencia, por sus comentarios, siempre los justos y necesarios a la hora de discutir esta tesis doctoral y por su estrecha amistad.

Al Dr. José Manuel Fort miembro indispensable de la Unidad de Cirugía Endocrina y Cirugía de la Obesidad del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, gran cirujano y mejor amigo, por sus consejos y cariño en mi formación como cirujano y siempre a mi lado en los momentos que más lo he necesitado.

Al Dr. Manuel López Cano, co-ordinador de Patología de la Pared Abdominal del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, por su apoyo constante, sus consejos y su amistad.

Al Dr. Eloy Espín, Jefe Clínico de la Unidad de Coloproctología del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, por su colaboración y su amistad.

Agradecer a los Cirujanos Miembros de la Unidad de Coloproctología del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, por su amistad y apoyo.

Al Dr. Ramón Vilallonga, residente del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, por su gran disponibilidad, ayuda y por demostrar ser un buen amigo.

A las Enfermeras de Consultas Externas del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona, por su colaboración.

A todos, muchas gracias.

INDICE

ÍNDICE

Abreviaturas.

I. Introducción	1
II. Fundamentos	7
2.1- Fisiopatología de la Miastenia Gravis	8
2.1.1- La unión neuromuscular	11
2.1.2- Inmunopatogenia de la Miastenia Gravis.	17
<u>2.1.2.1- Introducción</u>	17
<u>2.1.2.2- Patogénia</u>	18
2.1.2.2.1- Mecanismos patogénicos humorales	18
2.1.2.2.2- Características de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina	20
2.1.2.2.3- Anticuerpos Anti-AChR y severidad de la enfermedad	21
2.1.2.2.4- Miastenia Gravis y “anticuerpos negativos”	21
2.1.2.2.5- Mecanismos patogénicos celulares	22
2.1.2.2.6- Miastenia Gravis experimental autoinmune	25
2.1.2.2.7- Miastenia Gravis experimental autoinmune versus Miastenia Gravis humana.	27
2.1.2.2.8- Desarrollo de la autoinmunidad de la Miastenia Gravis.	28
2.2- Etiología de la Miastenia Gravis	31
2.3- Tratamiento de la Miastenia gravis	33
2.3.1- Tratamiento con anticolinesterásicos	35
2.3.2- Tratamiento quirúrgico	39
2.3.3- Tratamiento inmunosupresor	40
<u>2.3.3.1- Historia de la inmunosupresión</u>	40
<u>2.3.3.2- Inmunosupresores convencionales</u>	42
2.3.3.2.1- <i>Corticosteroides.</i>	42

2.3.3.2.2- Azatioprina.	44
2.3.3.2.3- <i>Ciclofosfamida</i> .	45
2.3.3.2.4- <i>Ciclosporina</i> .	45
2.3.3.3- <u>Nuevos inmunosupresores</u>	47
2.3.3.3.1- <i>Micofenolato mofetilo</i>	47
2.3.3.3.2- <i>Rituximab</i>	50
2.3.3.3.3- <i>Etanercept</i>	50
2.3.3.3.4- <i>Leflunomide</i>	50
2.3.3.3.5- <i>Tacrolimus</i>	51
2.3.4- Tratamiento inmunológico de corta duración	51
2.3.4.1- <u>Plasmaferesis</u>	51
2.3.4.1- <u>Inmunoglobulinas inespecíficas</u>	52
2.4- Tacrolimus (FK-506)	58
2.4.1- Evolución histórica de su descubrimiento y desarrollo	58
2.4.2- Estructura química y propiedades	62
2.4.3- Mecanismos de acción y actividad inmunosupresora	62
2.4.4- Farmacocinética y Farmacodinámica	64
2.4.4.1- <u>Absorción</u>	64
2.4.4.2- <u>Distribución</u>	65
2.4.4.3- <u>Eliminación</u>	66
2.4.4.4- <u>Metabolismo</u>	66
2.4.5- Interacciones farmacológicas	67
2.4.5.1- <u>Interacciones farmacocinéticas</u>	68
2.4.5.2- <u>Interacciones farmacodinámicas</u>	71
2.4.6- Monitorización de niveles	72
2.4.7- Dosis y administración	74
2.4.8- Toxicidad	75
2.4.8.1- <u>Nefrotoxicidad</u>	75
2.4.8.2- <u>Efecto diabetogénico</u>	76
2.4.8.3- <u>Neurotoxicidad</u>	77
2.4.8.4- <u>Hipertensión arterial</u>	78
2.4.8.5- <u>Infecciones</u>	78
2.4.8.6- <u>Enfermedades linfoproliferativas</u>	79

2.5- Tacrolimus y Miastenia Gravis	80
2.5.1- Estudios experimentales	81
2.5.2- Experiencia clínica	81
III. Objetivos de la Tesis	84
IV. Publicaciones	88
4.1- Primera publicación	89
4.2- Segunda publicación	94
V. Discusión	98
VI. Conclusiones	109
VII. Bibliografía	112

Abreviaturas:

- Ach: acetilcolina.
- AchR: receptor de acetilcolina
- AC: anticuerpo
- AC AchR: anticuerpo anti-receptor de acetilcolina.
- EAMG: miastenia gravis animal experimental.
- MG: miastenia gravis.
- MUSK: receptor específico muscular de tirosin-quinasa.
- RYR: receptor-ryanodine.
- MGFA: Federación Americana de Miastenia Gravis.
- QMGS: escala cuantitativa de severidad de miastenia gravis.
- IL: interleuquina.
- PR: remisión farmacológica
- TNF α : factor de necrosis tumoral
- Tacrolimus: FK506
- MEPC: corriente miniatura de la placa terminal
- MEPP: potencial miniatura de la placa terminal
- EPC: corriente de la placa terminal
- EPP: potencial de la placa terminal
- MIR: región inmunogénica principal
- APC: célula presentadora del antígeno
- TCR: receptor para el antígeno de la célula
- MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
- MAC: complejo de ataque de membrana

I. INTRODUCCIÓN

La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune, de causa desconocida, adquirida, crónica, que afecta a la unión neuromuscular, y se caracteriza por una debilidad de la musculatura esquelética y fatiga fácil, que empeora con el ejercicio y se recupera con el reposo.

Su incidencia es de 14,4 por cada 100,000 habitantes¹. En el 85% de los pacientes está mediada por autoanticuerpos contra el receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) a nivel de la membrana postsináptica (MG seropositiva)². En el 10-15% de los pacientes con miastenia gravis generalizada no se detectan anticuerpos anti-AChR, es el grupo de pacientes llamados miastenia gravis seronegativa, con síntomas idénticos a los de la miastenia gravis seropositiva³. Los autoanticuerpos anti-receptor de acetilcolina son negativos en el 50% de la miastenia gravis puramente ocular².

La MG esta definida por el hallazgo de una serie de características clínicas, electrofisiológicas y farmacológicas, y no solo por la presencia de los autoanticuerpos anti-AChR⁴. Clínicamente se caracteriza como una debilidad muscular progresiva con una transitoria mejoría al administrar inhibidores de la acetilcolinesterasa. Electrofisiologicamente se observa tras la estimulación repetitiva la aparición de un aumento del decremento de los potenciales de acción musculares o la aparición de fenómeno de “ jitter “ o de bloqueo (variabilidad o desaparición del intervalo ínter potencial) en la electromiografía de fibra única.

La miastenia gravis se relaciona con otras anomalías del sistema inmune, particularmente a nivel del timo. En el 15% de los pacientes se

asocia a timoma, y el 60% presentan hiperplasia tímica. Además existe un marcado aumento de otros autoanticuerpos y enfermedades autoinmunes asociadas, así como aumento de la incidencia de enfermedades autoinmunes en familiares de pacientes con miastenia gravis⁵.

Característica constante en la evolución de las enfermedades autoinmunes es su carácter oscilante, con periodos de mejoría y de deterioro, presentando remisiones y recaídas en su curso evolutivo^{6, 7}. Las remisiones espontáneas, como en todas las enfermedades autoinmunes, pueden presentarse durante el curso de la enfermedad, en especial durante los primeros años⁸.

La historia natural de la miastenia gravis es similar a las de otras enfermedades autoinmunes, caracterizada por un periodo de exacerbación seguido de un periodo de calma relativa, aunque es difícil de obtener información de la historia natural de esta enfermedad^{9, 10, 11, 12}.

En ocasiones los periodos de agravación se presentan de forma brusca y con afectación de la musculatura respiratoria, son las llamadas crisis miasténicas, que obligan a una rápida intubación con respiración asistida e ingreso en una unidad de cuidados intensivo. Los estímulos desencadenantes de las temidas crisis durante la evolución de la miastenia pueden ser múltiples y en ocasiones banales como la infección, menstruación, estrés, cirugía, o la utilización de medicamentos contraindicados en esta enfermedad.

Tratamiento

Pese a los más de doscientos años de conocimiento de la enfermedad su tratamiento sigue siendo un tema a controversia. Es exclusivamente médico sólo en los casos de afectación ocular simple o en pacientes mayores de 55 años. Aunque no existen ensayos clínicos controlados evaluando su beneficio, el tratamiento quirúrgico (la timectomía) es la recomendación actual en los casos de miastenia gravis generalizada y

aquellos que se acompañan de la presencia de timoma¹³. Se acepta de forma generalizada que aumenta las posibilidades de remisión, estabiliza la enfermedad, disminuye la incidencia de crisis miasténicas y posiblemente reduce la dosis de medicación inmunosupresora necesaria para mantener al paciente asintomático¹⁴.

Tratamiento médico

La primera terapia derivada del conocimiento de la patogenia de la enfermedad fue el tratamiento sintomático no inmune, con inhibidores de la acetilcolinesterasa. Primero la neostigmina, introducida en 1934¹⁵ y posteriormente la piridostigmina.

Partiendo del origen autoinmune de la enfermedad se han propuesto múltiples fármacos inmunosupresores para el tratamiento de la MG. El objetivo de estos es conseguir una remisión de la enfermedad y mantenerla. Pueden tardar desde semanas hasta meses en conseguir la acción.

En la actualidad está totalmente aceptada la indicación de los corticoides en los pacientes afectados de miastenia gravis y específicamente la prednisona. Diferentes estudios han sugerido que la introducción temprana puede prevenir la generalización de la enfermedad^{16, 17, 18}, pero son necesarios estudios prospectivos más amplios para confirmarlo. En cualquier caso su uso no está exento de posibles efectos secundarios que siempre deben ser considerados.

La azatioprina en escasos estudios se ha sugerido su utilización como monoterapia para inducir la remisión de la miastenia gravis. La mayoría de ellos describen su utilización en combinación con los corticosteroides en aquellos pacientes que se pueden beneficiar de una disminución de la dosis de los mismos, en aquellos en los que la dosis de corticoides es insuficiente, y cuando no hay respuesta a la timectomía^{19, 20}.

La ciclofosfamida es de uso muy limitado en la miastenia gravis y se indica en las ocasiones en que han fracasado tanto la timectomía como los otros inmunosupresores. No existen estudios controlados de este fármaco para valorar la remisión en la miastenia gravis²¹.

La ciclosporina demostró su eficacia tanto en el modelo experimental de miastenia animal antes de su utilización clínica²², como en estudios randomizados²³. Pero su utilización puede producir varios efectos adversos entre los cuales esta la nefrotoxicidad, la neurotoxicidad, y la hepatotoxicidad²⁴.

En pacientes que no responden a la inmunoterapia convencional o que no toleran los efectos secundarios, pese a no estar aprobada esta indicación en la miastenia gravis, se han empezado a utilizar nuevos inmunosupresores introducidos recientemente. Entre ellos destacan: el micofenolato mofetilo, el tacrolimus, el rituximab, el etanercept y el leflunomide.

El micofenolato mofetilo utilizado por algunos autores para tratar la miastenia gravis refractaria y prednisona dependiente, aunque aconsejan estudios más amplios y a más largo tiempo para valorar la efectividad de este fármaco en esta enfermedad²⁵. Otro estudio piloto controlado concluye que es una terapia efectiva en la miastenia gravis²⁶. El rituximab²⁷, el etanercept (factor de necrosis tumoral TNF α)²⁸ y el leflunomide²⁹ son fármacos en fase experimental y en escasos casos se ha comunicado su utilidad en la miastenia gravis refractaria.

La inmunosupresión con la plasmaferesis^{30, 31, 32} y las inmunoglobulinas endovenosas^{33, 34} actúan con respuesta rápida pero su efecto es de corta duración.

El tratamiento ideal de la miastenia gravis es aquel que elimina la respuesta autoinmune específica contra los receptores de acetilcolina sin suprimir el sistema inmune y sin producir efectos secundarios¹⁴. Estudios experimentales que tratan de conseguirlo se orientan hacia la inmunotolerancia, el tratamiento dirigido a las células T y la inmunoterapia específica contra el antígeno. El tratamiento médico de estos pacientes sigue siendo muy controvertido. La introducción de los fármacos inmunosupresores ha abierto unas vías muy esperanzadoras en el control de esta enfermedad. El gran dinamismo de este campo de la farmacología, con discreta prevalencia de la miastenia gravis dificulta el establecimiento de pautas terapéuticas acordadas en base a estudios amplios controlables.

En la actualidad el tratamiento de la miastenia gravis con tacrolimus es denominado por muchos autores inmunomodulador en sustitución del termino inmunosupresor, dada la reducida dosis del medicamento que se administra en el miastenico en comparación con las dosis más altas empleadas en el transplante de órganos¹⁴. Sin embargo no hay consenso sobre una denominación u otra ya que ambos términos se emplean indistintamente en la literatura. Este fármaco actúa suprimiendo la producción de interleuquina-2 relacionada con la activación de los linfocitos T, inhibiendo la diferenciación y proliferación de las células T citotóxicas³⁵. Konishi³⁶ y Yoshikawa³⁷ han demostrado el beneficio del tratamiento con tacrolimus en pacientes afectos de miastenia gravis. Nagane³⁸ publica la eficacia de dosis bajas de este medicamento en el primer trabajo randomizado a doble ciego con pacientes no tratados con otras medicaciones.

En la Unidad de Miastenia Gravis del Hospital Vall d'Hebron con una amplia experiencia con más de 30 años en el manejo de la enfermedad, hemos desarrollado en los últimos años una línea de trabajo clínico en el tratamiento de los casos resistentes de la enfermedad con tacrolimus. Tras unos buenos resultados preliminares se decidió desarrollar una serie de estudios prospectivos para valorar la utilidad real de este fármaco.

La recopilación de dos artículos publicados en revistas de impacto de la especialidad constituye el núcleo de esta tesis doctoral.

II. FUNDAMENTOS

2.1. Fisiopatología de la MG

Para entender la fisiopatología de la miastenia gravis es fundamental recordar las estructuras básicas y mecanismos funcionales involucrados en la transmisión neuromuscular.

La unión o placa neuromuscular se compone de dos partes principales, el compartimento presináptico formado por la terminal nerviosa motora y el compartimento postsináptico formado por los pliegues y la placa motora. Estos dos compartimentos están separados entre sí por la hendidura sináptica (40-50 nm). Algunas características de esta terminal son la gran cantidad de vesículas sinápticas y mitocondrias existentes así como la ausencia de ribosomas y de retículo endoplasmático rugoso.

Las vesículas sinápticas almacenan acetilcolina (ACh) después de su síntesis a partir de la colina y el acetyl-CoA gracias a la acción de la acetilcolinesterasa. Cada vesícula contiene aproximadamente un quantum de acetilcolina (ACh)³⁹ que corresponde aproximadamente a 10^4 moléculas.

En la membrana presináptica se localizan las llamadas zonas activas, que son zonas con gran cantidad de vesículas que se sitúan en áreas electrodensas y que constituyen los lugares donde es liberado el neurotransmisor. Estas zonas activas consisten en distribuciones paralelas de varias partículas que representan los canales de calcio dependientes de voltaje, muy importantes en el proceso de neurotransmisión.

En la membrana postsináptica se localizan los pliegues, una estructura convoluta que sirve como receptáculo para la terminal nerviosa motora. En dichos pliegues se sitúan unas partículas intramembranas que se han identificado como receptores de acetilcolina (Ach-R) y cuya densidad es de aproximadamente 10,000 por μm^2 .

El receptor de acetilcolina (Ach-R) es una proteína alostérica formada por cinco subunidades ($\alpha_2\beta\gamma\delta$)⁴¹. Esta configuración cambia en la forma adulta, reemplazándose la subunidad γ por la subunidad ϵ , que le confiere propiedades cinéticas más rápidas en relación al canal iónico situado en la parte central del receptor. En la parte inferior de los pliegues se sitúa la anticolinesterasa, en unión con la lámina basal.

La cantidad de acetilcolina almacenada en una vesícula sináptica es de aproximadamente 5,000 a 20,000 moléculas⁴². Esta cantidad de acetilcolina representa un *cuanto* de Ach. En cada ocasión en que se libera un cuanto de acetilcolina en la hendidura sináptica, aproximadamente 1,000 a 2,000 receptores de acetilcolina se abren espontáneamente (dos moléculas de Ach se unen a cada Ach-R⁴³) y esto da como resultado una pequeña corriente llamada corriente miniatura de placa terminal (*miniature end-plate current-MEPC*) que a su vez produce una despolarización en la placa terminal llamada potencial miniatura de placa terminal (*miniature end plate potential MEPP*).

La llegada de un potencial de acción a la placa terminal produce una despolarización momentánea en la placa terminal, lo cual abre los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC). Esta apertura de los canales produce una liberación y concentración de calcio en la terminal nerviosa, que, mediante un mecanismo no entendido hasta la fecha, precipita la liberación de un gran número de vesículas o cuantos de Ach en la hendidura sináptica (aproximadamente 400 cuantos). Así, la corriente generada en la membrana postsináptica por la liberación de estos cuantos de Ach representa la corriente de la placa terminal (*end plate current EPC*). Esta corriente mayor produce una despolarización transitoria en la placa terminal llamada potencial de placa terminal (*end plate potential EPP*) que es lo

suficientemente potente como para producir la activación de los canales de calcio colindantes e iniciar la propagación de un potencial de acción en una fibra muscular⁴⁴. El número de cuantos que produce un potencial de placa terminal constituye el contenido cuántico (*quantal content*).

El contenido cuántico de cada potencial de placa terminal es muy variable y depende de múltiples factores que incluyen la especie, el contenido de calcio extracelular y la madurez de la hendidura sináptica. En uniones neuromusculares inmaduras o en presencia de concentraciones bajas de calcio, el contenido cuántico es bajo y las amplitudes del potencial de placa terminal fluctúan siguiendo la predicción de Poisson, en contraste, en las uniones maduras o en altas concentraciones de calcio este número es alto y las amplitudes de los potenciales de placa terminal siguen predicciones binomiales⁴⁵. Así si la concentración de calcio del líquido extracelular se reduce o si aumenta la concentración de magnesio aumenta esta transmisión de potencial fallara⁴⁶. También existe evidencia de que los canales de calcio son regulados por nucleótidos cíclicos y que algunos agentes como son el fluor, la teofilina, la prostaglandina E y el verapamil pueden inhibir la transmisión neuromuscular⁴⁷.

No todas las vesículas sinápticas de una terminal nerviosa, que pueden llegar a ser miles, están listas para ser liberadas en cada estímulo. Solamente aquellas que están situadas en las zonas activas pueden serlo. Estas vesículas que están preparadas son los cuantos disponibles para la liberación inmediata (n). El número real de cuantos liberados por un potencial de acción o contenido cuántico (m) depende de n y de p o probabilidad de liberación, y así, m puede definirse matemáticamente como $m = n \times p$. Se sabe además que n depende del tamaño de terminal nerviosa y del número de vesículas situadas en las zonas activas y p depende de la concentración de calcio resultante de la llegada de un potencial de acción en la terminal nerviosa. Hay que tener en cuenta que tanto n como p no son valores estáticos y varían acorde con las circunstancias como puede ser la repetición de un estímulo, en el que ambos valores declinan progresivamente, y es este de hecho, el mecanismo fisiológico que se traduce en los hallazgos

electromiográficos en pacientes miasténicos durante pruebas de estimulación nerviosa repetitiva. También se han descrito mecanismos facilitadores que resultan en un incremento transitorio de los potenciales de acción de placa terminal después de la estimulación tetánica, como son la facilitación, aumentación y la potenciación, que son probablemente debidas a un incremento del calcio residual en la placa terminal⁴⁸.

2.1.1- La unión neuromuscular

El mayor avance en el estudio de los mecanismos responsables de la alteración en la transmisión neuromuscular en la miastenia gravis fue dado por la utilización de la ¹²⁵I- α -Bungarotoxina, que es la forma radioactiva de una toxina de serpiente que se une irreversiblemente a la AchR. En los primeros estudios se pudo comprobar que los pacientes afectados de miastenia gravis mostraban una unión de la toxina marcada de solo un 11 a 30 % en comparación con los adultos no afectados de miastenia gravis⁴⁹. El desarrollo de esta toxina marcada permitió también demostrar la presencia de anticuerpos anti-AchR en más del 90 % de los pacientes con miastenia gravis⁵⁰. Estos experimentos demostraron claramente que en la miastenia gravis hay una clara reducción del número de AchR y que esta reducción es producto de un ataque autoinmune.

Posteriormente se evidenciaron los diferentes mecanismos por los que los anticuerpos reducen el número de AchR en los pliegues de unión: 1) incremento en el recambio de los AchR, 2) bloqueo de los canales iónicos y 3) lisis mediada por complemento de los pliegues de unión.

En cuanto a los receptores de Ach, es importante recordar que existen dos tipos de estos, el primero es estable y de vida media larga (10 días) y llamado del subtipo de unión y el segundo es lábil y con una vida media menor de 24 horas y conocido como el subtipo exterior ya que se localiza en la mayoría de cultivos musculares y en músculo denervado. Existen ciertas teorías que mencionan la posibilidad de que el subtipo exterior sea en

realidad un precursor del subtipo de unión bajo los efectos de estabilización del nervio mediado este mecanismo por el AMPc⁵¹.

Estudios experimentales evidencian que la IgG de pacientes con miastenia gravis acelera la degradación de receptores de Ach en cultivos musculares y en las placas neuromotoras. Este efecto resulta de la unión de la inmunoglobulina miasténica con los receptores, ya que los fragmentos Fab de pacientes miasténicos no aceleran por sí mismos el grado de degradación de los receptores⁵². Así, estudios morfológicos han demostrado que el primer evento posterior a la exposición de tejido muscular a IgG de pacientes con miastenia gravis es la agregación de receptores de Ach en cúmulos⁵³. Este suceso es seguido de la internalización de los receptores por endocitosis y completado por la digestión de éstos receptores por el sistema enzimático lisosómico.

A nivel molecular parece que el sitio de unión más probable entre la IgG y el receptor de Ach es la parte extracelular del receptor llamada región inmunogénica principal (*main immunogenic region - MIR*)⁵⁴.

A pesar de un gran número de trabajos que demuestran el efecto bloqueante de los anticuerpos miasténicos sobre una variedad de preparados biológicos, su rol en el mecanismo de patogénesis de la miastenia gravis permanece controvertido, y la mayor razón de que se persevere esta controversia es la gran dificultad, sino imposibilidad, de demostrar que los anticuerpos miasténicos pueden bloquear in vivo la función de los receptores independientemente de la degradación de los receptores o de la destrucción de los receptores mediada por el complemento. A pesar de esto, Gomez y Richman⁵⁵ demostraron en un modelo animal que el efecto bloqueador de los anticuerpos miasténicos puede provocar una forma de miastenia gravis en animal que es clínicamente y electrofisiológicamente indistinguible de la miastenia gravis humana.

Este interesante modelo fue conseguido al inyectar en gallinas diferentes anticuerpos monoclonales de ratas dirigidos contra la región de unión del receptor Ach torpedo con la α -bungarotoxina. En este modelo se descartaron mediante técnicas de inmunohistoquímica la presencia de

reacciones mediadas por complemento, destrucción de la unión neuromuscular o proceso inflamatorio, así se puede decir que el efecto de los anticuerpos inyectados debe ser por bloqueo del sitio agonista de unión del receptor de Ach o por una alteración directa sobre los canales iónicos. Estudios recientes apuntan a la primera de estas hipótesis⁵⁶.

La destrucción mediada por el complemento de la placa terminal es otro importante efecto patogénico de los anticuerpos en la miastenia. De hecho, la disminución del complemento constituyó uno de los primeros descubrimientos que indujeron a la creación de la hipótesis autoinmune de la miastenia gravis⁵⁷. En los pacientes con miastenia gravis se encuentran depósitos de C3 y C9 en las uniones neuromusculares, e incluso aparece C9 en el espacio sináptico de uniones neuromusculares dañadas en concentraciones directamente proporcionales al grado de lesión de éstas. Sin embargo, en un estudio reciente también se ha encontrado depósitos de C3 y C9 en las uniones neuromusculares indemnes de músculos periféricos en pacientes con miastenia gravis puramente ocular, por lo que parece que los depósitos de complemento no implican necesariamente una destrucción de las membranas de placa terminal⁵⁸.

Es ampliamente conocida la quimiotaxis ejercida por el complemento. Como regla general, en los procesos patológicos mediados por reacciones antígeno-anticuerpo, deposición de complemento o de destrucción tisular, se encuentra asociada una infiltración celular inflamatoria. La miastenia gravis no es una excepción a esta regla. Así ha sido demostrado por los trabajos de Pascuzzi⁵⁹ y de Maselli⁶⁰, en los que ambos evidenciaron infiltración por células inflamatorias, principalmente mononucleares, en las placas terminales de pacientes con miastenia gravis. Tanto en los modelos animales como en la miastenia gravis humana, las células inflamatorias son una consecuencia final de la destrucción de las membranas mediadas por complemento.

Así como la infiltración por células inflamatorias no se observa en todos los músculos afectados ni en todos los pacientes con miastenia gravis, si se observa una alteración en la distribución de los tipos de fibras musculares en

forma de predominio de las fibras tipo I y una elongación y fragmentación de las placas terminales a la tinción de colinesterasa similares a los cambios observados en la denervación crónica. Ambos cambios sugieren que en la mayoría de los músculos miasténicos existen procesos de denervación compensados con episodios de reinervación.

A nivel de ultra estructura se encuentra una simplificación de los pliegues y ensanchamiento de las hendiduras, así como un acortamiento del grosor de la membrana postsináptica. Estos cambios geométricos provocan que las moléculas de receptores de Ach no se concentren en los pliegues sinápticos con la correspondiente pérdida de capacidad de generación de los MEPP (potenciales miniatura de placa terminal)⁶¹.

Dentro del estudio de la fisiopatología de la miastenia gravis no se pueden olvidar los numerosos estudios electrofisiológicos en el desarrollo de varias teorías. Partiendo de la premisa evidente de la disminución de la amplitud de los MEPP típicos de la miastenia gravis, los estudios iniciales de electrofisiología in vitro interpretaron los resultados como una alteración de la liberación de acetilcolina de la placa terminal⁶² o como el insuficiente almacenamiento de moléculas de acetilcolina en cuantos individuales en la membrana presináptica⁶³. En 1970 Albuquerque⁴⁰ ya sugirió una alteración de la membrana postsináptica, que fue corroborada por Cull-Candy⁶⁴ al indicar que la disminución de la amplitud de los MEPP y los MEPC son debidas a la disminución en el número de canales iónicos de receptores de Ach aunque el flujo individual de los canales existentes permanece inalterado.

Respecto al contenido cuántico, que es el otro factor determinante de la amplitud del potencial de placa terminal (EPP): (amplitud de EPP: amplitud de MEPP x contenido cuántico) ha existido una gran controversia sobre si esta aumentado⁶⁵, normal o disminuido⁶⁶ en los pacientes con miastenia gravis. Estos hallazgos pueden, en efecto, presentarse sin ser excluyentes entre ellos, ya que depende del tipo de lesión del músculo biopsiado, por ejemplo en el músculo con infiltración inflamatoria encontraremos un aumento del contenido cuántico, y si la biopsia fuera de músculo con signos

de reinervación el contenido estará disminuido. También puede disminuirse el contenido cuántico en las placas terminales afectadas por anticuerpos presentes en la miastenia gravis.

En la actualidad se han descubierto otros anticuerpos presentes en el paciente miasténico; los anticuerpos contra el receptor específico muscular de la tirosin-quinasa (anti-MuSK) en la mitad de los pacientes considerados miastenia gravis generalizada seronegativa pero no en la miastenia exclusivamente ocular^{67, 68}, los anticuerpos anti-proteína *titin*^{69, 70}, los anticuerpos “*anti-ryanodine*” (proteína filamentosa gigante esencial para la estructura, función y desarrollo muscular)^{71, 72}, y los anticuerpos “*anti-rapsyn*” (proteínas asociadas a receptores de acetilcolina)⁷³ responsables también como los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina de la fisiopatología de la miastenia autoinmune.

Los receptores de la tirosin-quinasa específica muscular (MuSK) tienen un papel crítico en la organización y mantenimiento de los receptores de la acetilcolina en la placa neuromuscular. Estos receptores se activan gracias a la molécula “*agrin*” (proteoglicano) que es liberada por la motoneurona e induce la organización conglomerada de los receptores de la acetilcolina en la placa neuromuscular. La presencia de anticuerpos anti-MuSK anularía la acción organizadora de estos y produciría una dispersión de los receptores de acetilcolina lejos de la placa neuromuscular y difícilmente alcanzables por la acetilcolina segregada por la terminación nerviosa. De los receptores “*ryanodine*” y los “*titin*” se desconoce su función, pero la presencia de anticuerpos contra ellos en los pacientes afectados de miastenia asociada a timoma nos hace pensar en su relación con la fisiopatología de este grupo de pacientes.

Resumiendo podemos condensar el proceso patogénico de la miastenia gravis en tres fases principales. Durante la fase inicial los auto-anticuerpos se unen a los epitopes localizados en las subunidades de los receptores de acetilcolina y el número de estos receptores disminuye debido al entrecruzamiento y a una alteración del recambio de receptores. Los factores del complemento se unen a la unión neuromuscular sin que ocurra la

destrucción de la placa terminal. A este nivel, se observan cambios electrofisiológicos como son la disminución de la amplitud de los EPP y los MEPP, aunque no existe una alteración significativa de la transmisión neuromuscular y no hay síntomas por el gran factor de seguridad que existe en la placa terminal.

En la segunda fase se produce el daño a la placa terminal mediado por el complemento y la infiltración celular. La amplitud de los EPP y MEPP se reducen de forma significativa así como el contenido cuántico. En esta etapa la transmisión neuromuscular falla y los síntomas de debilidad y fatiga aparecen.

En la fase final desaparece la infiltración celular y la estructura de la placa terminal sufre los cambios de simplificación. Los MEPP se reducen a una mínima expresión, apenas perceptible con técnicas de micro electrodos. Es entonces cuando surgen los cambios de denervación y reinervación y el contenido cuántico es variable (disminuido y/o aumentado según la afección). Esta fase corresponde a la cronicidad de la miastenia gravis.

Todos estos aspectos se resumen en la tabla 1 tal y como proponen Drachman y McIntosh ⁷⁴.

-
- 1.- Pérdida de receptores de acetilcolina (Ach-R) por mecanismo mediado por anticuerpos
 - a) Endocitosis acelerada por receptores de acetil colina.
 - b) Bloqueo de los receptores de acetilcolina(Ach-R)
 - c) Daño de membrana postsináptica
 - 2.- La respuesta de anticuerpos contra los receptores de acetil colina(Ach-R) es dependiente de células T
 - 3.- Los recetores de acetilcolina(Ach-R) constituyen un antígeno altamente inmunogénico
 - 4.- Las repuestas inmunes contra los receptores de acetilcolina (Ach-R) son extraordinariamente heterogéneas.
-

Tabla 1. Mecanismos patogénicos de la miastenia gravis.

2.1.2- Inmunopatogenia de la Miastenia Gravis

2.1.2.1- Introducción

Los avances producidos en el conocimiento de los procesos inmunopatológicos de la miastenia gravis son atribuibles básicamente a dos fenómenos presentes en la naturaleza. El primero es el órgano eléctrico de algunos peces como la anguila eléctrica o la raya torpedo, los cuales son extremadamente ricos en receptores de la acetilcolina (AChR). El segundo son las neurotoxinas derivadas del veneno de las cobras, como la toxina naja y la α -bungarotoxina, los cuales se unen a los AChR con alta afinidad permitiendo la identificación y purificación del antígeno. Esta posibilidad de purificar el AChR ha sido crucial en el establecimiento de la naturaleza autoinmune de la miastenia gravis y en el desarrollo de un modelo animal de la enfermedad, la denominada Miastenia Gravis Experimental Autoinmune, cuyas siglas en inglés son “*EAMG*”.

Todos estos análisis permiten decir que la miastenia gravis es una enfermedad autoinmune dirigida contra los receptores de acetilcolina de la unión neuromuscular. Si bien las células T dirigen la respuesta inmune en la miastenia gravis, el ataque contra los receptores es llevado a cabo únicamente por anticuerpos anti-AChR, secretados por las células B, sin la asistencia de células T efectoras. Sin embargo en la sangre periférica y en el timo de pacientes con miastenia gravis son fácilmente detectadas células T activadas. Los anticuerpos anti receptores de acetilcolina inducen el trastorno en la unión neuromuscular por una serie de mecanismos inmunopatológicos.

La miastenia gravis representa un excelente modelo de enfermedad autoinmune humana. Es ampliamente aceptado que las anomalías de la unión neuromuscular que se producen en esta enfermedad son debidas a procesos mediados por anticuerpos⁷⁵. La miastenia gravis satisface cinco criterios que definen la patogénesis de los trastornos mediados por anticuerpos⁷⁶.

1. Presencia del anticuerpo; al menos 80 a 90% de los pacientes afectados de miastenia gravis tienen anticuerpos séricos contra el receptor de la acetilcolina, que son detectados por ensayos estándar^{77, 78, 79, 80}.
2. Los anticuerpos interactúan con el antígeno diana, el receptor de la acetilcolina. La presencia de IgG en la unión neuromuscular adyacente al receptor de acetilcolina ha sido demostrada en la miastenia gravis⁸¹.
3. La transferencia pasiva de anticuerpos reproduce la enfermedad, inyecciones repetidas de IgG de pacientes enfermos, en el ratón, reproducen la clínica más característica en dichos animales⁸².
4. La inmunización con el antígeno produce un modelo de enfermedad, la inmunización de animales es capaz de reproducir aspectos fisiológicos, clínicos y diagnósticos de la miastenia gravis. El modelo experimental ha sido particularmente útil para probar nuevas estrategias terapéuticas^{83, 84}.
5. La disminución de los niveles de anticuerpo mejora la enfermedad, en la gran mayoría de pacientes la inmunosupresión o la plasmáferesis mejoran la enfermedad^{85, 86}.

2.1.2.2- Patogénia

2.1.2.2.1- Mecanismos patogénicos humorales

Hay un acuerdo general en aceptar que la debilidad y la fatiga de la transmisión neuromuscular en la miastenia gravis son debidas a una pérdida de receptores de acetilcolina (AChR) con alteración en la membrana postsináptica y en la placa motora terminal. Parece bastante claro que los anticuerpos contra el receptor de la acetilcolina (anti-AChR) son importantes en la patogénesis de este bloqueo neuromuscular^{87, 88}.

Por tanto, es poco probable que los anti anti-receptores de acetilcolina hallados en pacientes con miastenia gravis sean un epifenómeno o una respuesta secundaria a la liberación de receptores de acetilcolina de las placas terminales dañadas por otros mecanismos.

Se han postulado varios mecanismos por los cuales el anti-AchR puede llevar a un empeoramiento de la transmisión neuromuscular en pacientes con miastenia gravis⁸⁹ :

- a- Daño de la membrana postsináptica (placa motora terminal), mediado por complemento.
- b- Aumento de la tasa de degradación del receptor de acetilcolina (AchR).
- c- Bloqueo del receptor de acetilcolina (AchR).
- d- Daño de la membrana postsináptica (placa motora terminal), mediado por complemento

Estudios ultramicroscópicos muestran marcados cambios destructivos en la placa motora terminal, particularmente en el lomo de los pliegues de dicha placa (aplanamiento), donde el receptor de acetilcolina esta presente normalmente a gran concentración. Hay simplificación de la membrana postsináptica, con ensanchamiento de las hendiduras, las cuales contienen desechos de membrana^{90, 91}.

A través de métodos inmunocitoquímicos se ha demostrado la presencia del complejo de ataque de membrana del complemento en las uniones neuromusculares de pacientes miasténicos⁹². En el modelo de enfermedad en el ratón el efecto patogénico del anticuerpo parece depender en parte de la presencia de complemento.

a- Aumento de la tasa de degradación de los receptores de acetilcolina.

Normalmente hay una baja tasa de “turnover” del AchR en la placa motora terminal. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el anticuerpo anti-AchR puede incrementar la tasa de degradación del receptor de acetilcolina^{93, 88, 91}.

La capacidad del anticuerpo para acelerar la degradación de los AchR depende de su capacidad de entrecruzar (*cross-link*) dichos receptores⁹⁴, (la degradación acelerada ocurre cuando los receptores de acetilcolina son entrecruzados por anticuerpos divalentes intactos; fragmentos monovalentes –Fab- unidos al receptor de acetil colina no aceleran la degradación, si se

dirige un anticuerpo contra el Fab (anti-Fab) se permite el entrecruzamiento de los receptores de acetilcolina produciéndose entonces una aceleración de la degradación). El entrecruzamiento en la membrana muscular permite la rápida internalización de los receptores mediante endocitosis para entonces ser degradados⁹⁵.

b- Bloqueo del receptor de acetilcolina

Es lógico pensar que una de las formas mediante las cuales actúa el anticuerpo sobre la placa terminal en los pacientes miasténicos sea bloqueando los sitios de unión de la acetilcolina (ACh) con su receptor. Esto se ha observado que es así en el 50 al 88% de los pacientes^{96, 97}. Dado el pequeño tamaño de los sitios de unión de la ACh con su receptor, es probable que el bloqueo se produzca por “estorbo” de la unión normal, más que por una auténtica ocupación del sitio de unión por parte del anticuerpo⁹⁸.

2.1.2.2.2- Características de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina

La compleja estructura y gran tamaño de la molécula del receptor de acetilcolina sugieren que es probable que existan diferentes anticuerpos que se unirán a diferentes epitopes (determinantes antigénicos)⁷⁴. Ahora hay abundantes evidencias de que los pacientes con miastenia gravis presentan una variable gama de autoanticuerpos⁹⁹.

Los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina generalmente reconocen los epitopes por su conformación tridimensional⁷⁴. La mayoría de los anticuerpos anti-receptores de acetilcolina se unen a la subunidad alfa del receptor, posiblemente porque cada molécula de receptor tiene dos subunidades alfa¹⁰⁰. Una proporción relativamente grande de estos anticuerpos se une a una región restringida de la subunidad alfa, la denominada “región principal inmunogénica” (*MIR*)¹⁰¹. Sin embargo, aun los anticuerpos dirigidos contra esta área tan restringida son heterogéneos en cuanto a la especificidad del epítopo concreto al cual se unen. Por otra parte,

muchos anticuerpos se unen en otro lugar de la subunidad alfa así como a las otras subunidades del receptor de acetilcolina¹⁰².

Se puede concluir que hay una extensa heterogeneidad de anticuerpos en la enfermedad y por tanto de células B que los producen, esto es de capital importancia a la hora de diseñar estrategias de inmunoterapia en la miastenia gravis⁷⁴.

2.1.2.2.3- Anticuerpos anti-receptor de la acetilcolina y severidad de la enfermedad

La concentración en suero de los anticuerpos anti-receptores de acetilcolina no se correlaciona con la severidad de la enfermedad⁷². Este hallazgo sugiere que los anticuerpos pueden variar en su capacidad de producir clínica miasténica⁷⁴. Se ha observado que la severidad de la clínica si se relaciona con la capacidad del anticuerpo de bloquear el receptor o acelerar su degradación. Se ha visto que los anticuerpos de algunos pacientes tienen más capacidad de bloqueo que de degradación mientras que otros tienen más capacidad de degradación que de bloqueo, estos particulares efectos funcionales podrían estar en relación con el epitope específico del receptor de acetilcolina al cual se unen. Además de estas actividades funcionales, otras propiedades como la capacidad de fijar el complemento contribuyen a su patogenicidad. Por otra parte, diferencias en las uniones neuromusculares de diferentes pacientes, o más aun, en diferentes músculos de un mismo paciente, pueden influenciar en el grado de debilidad muscular⁷⁴.

2.1.2.2.4- Miastenia gravis “Anticuerpo-negativa”.

Aproximadamente el 10-20% de los pacientes con miastenia gravis generalizada y un 50% de la miastenia ocular no tienen anticuerpos anti-receptores de acetilcolina detectables mediante radioinmunoensayo^{72, 73}. Si bien este grupo suele incluir a pacientes con debilidad leve localizada, hay también un subgrupo de pacientes con anticuerpos negativos que presentan debilidad generalizada, cuya enfermedad se corresponde con la miastenia

gravis convencional (anticuerpos positivos) en lo que respecta a la clínica, diagnóstico y terapéutica^{103, 104, 105} estos pacientes tienen anticuerpos circulantes que no se detectan mediante radioinmunoensayo. Es evidencia de esto el hecho de que también la transferencia pasiva de suero de estos enfermos al ratón provoca una disminución de los receptores de la unión neuromuscular así como una disminución de los potenciales de membrana de la placa motora terminal¹⁰⁶. La aparición de miastenia neonatal transitoria en los hijos de madres miastenicas seronegativas es también otro dato más en apoyo de la existencia de un factor humoral en estos pacientes. El beneficio obtenido con la plasmáferesis en los pacientes seronegativos también avala la existencia de un anticuerpo no detectable con los análisis convencionales. La inmunoglobulina de estos pacientes “sero-negativos” se une a los receptores de acetilcolina de células musculares cultivadas acelerando la degradación de estos receptores¹⁰⁷. Se ha visto también que IgM de pacientes “sero-negativos” interfiere con el canal iónico del receptor de acetilcolina en cultivos celulares humanos¹⁰³. A partir de todas estas afirmaciones se puede concluir que la denominada miastenia gravis “sero-negativa” es un trastorno autoinmune mediado por anticuerpos.

La imposibilidad de detectar anti-receptores de acetilcolina mediante radioinmunoensayo cuando si son ampliamente demostrados en cultivos de células musculares, sugiere que los anticuerpos pueden estar dirigidos contra epitopes no presentes en el extracto soluble del receptor de acetilcolina o pueden tener tan baja afinidad que no sean detectados en los ensayos estándar⁷⁴.

2.1.2.2.5- Mecanismos patogénicos celulares

Si bien los anticuerpos anti-receptores de acetilcolina son el mecanismo inmunológico efector fundamental en la producción de la miastenia gravis, hay una extensa evidencia de que las células T juegan un papel clave en la respuesta autoinmune de esta enfermedad tanto en humanos como en animales^{108, 109}.

La respuesta inmune normal (contra un antígeno extraño) tiene un brazo aferente y un brazo eferente. En el curso de una exposición a un antígeno por primera vez, los mecanismos aferentes dan lugar a la expansión de clonas celulares de linfocitos T específicos para el antígeno. El primer paso consiste en la formación de un complejo trimolecular constituido por: a) el receptor para el antígeno de la célula T (*TCR*), b) el propio antígeno (péptido antigénico) y c) el complejo mayor de histocompatibilidad (*MHC*)^{110, 111}.

El *TCR* proporciona la especificidad antigénica de la respuesta y el *MCH* requiere que el antígeno sea procesado intracelularmente por una célula presentadora de antígeno (*APC*). La mayoría de las *APC* son miembros de la serie monocito-macrófago, el cual fagocita material antigénico de forma no específica. Células B antígeno-específicas pueden funcionar como *APC*. En ambos tipos de células el material extraño es fagocitado y las proteínas son hidrolizadas en fragmentos péptidicos de 10 a 14 aminoácidos de longitud¹¹². Las moléculas de *MHC*, las cuales son glicoproteínas de la membrana celular, son sintetizadas en el retículo endoplasmático. Estas moléculas se unen a los fragmentos péptidicos del antígeno y el complejo formado por *MHC* más los fragmentos antigénicos es expresado en la superficie celular. Moléculas individuales de *MHC* son capaces de unir péptidos de degradación de diferentes antígenos, en consecuencia, la especificidad impartida hacia el complejo trimolecular por las *APC* es solo de grado moderado.

Para células T que expresan el marcador de superficie *CD4*, el complejo trimolecular está formado por moléculas *MHC* de la clase II¹¹¹. La interacción entre el linfocito T *CD4+* y el péptido antigénico que reconoce, requiere contacto físico directo entre la célula T y la *APC*.

El reconocimiento por el *TCR* del péptido antigénico (unido al *MHC-II*) es altamente específico con escasa reactividad cruzada para otros péptidos antigénicos. El *CD4* debe recibir además una segunda señal coestimuladora que proviene de la *APC* (Interleuquina -*IL-*) para iniciar la activación y

proliferación de células T¹¹³. Si la señal coestimuladora está ausente, la célula T es inactivada¹¹⁴.

Para células T que expresan el marcador de superficie CD8, la interacción trimolecular requiere MHC de la clase I. Un papel inmunorregulador-supresor ha sido postulado para estas células T.

Una vez que las células T han sido activadas, proliferan y comienzan a secretar linfocinas que llevan a cabo el papel efector, por ejemplo: ayuda para las células B antígeno-específicas, ayuda para las células T efectoras y posiblemente función de supresión.

Las células T de pacientes con miastenia responden a la estimulación con AchR^{115, 116} y favorecen el aumento de anticuerpos anti-AchR *in Vitro*¹¹⁶.

En contraste con su papel en la producción de anticuerpos anti-AchR, las células T probablemente no actúan como células efectoras en la miastenia gravis. No han sido identificadas células T en la unión neuromuscular de estos pacientes¹¹⁷.

Muchos trabajos se han realizado para intentar determinar los patrones de respuesta antigénica de las células T, en general el patrón de respuesta es el mencionado más arriba. Análisis de células T de pacientes (y animales) con miastenia gravis han revelado una sorprendente heterogeneidad en sus patrones de respuesta⁷⁴. Cada célula del paciente responde a múltiples epitopes pero también hay sustanciales diferencias en los epitopes a los cuales la célula responde^{118, 119, 120, 121}.

Sí bien la mayoría de los sitios de reconocimiento de la célula T están situados en la subunidad alfa del receptor nicotínico de la acetilcolina, las células T también reconocen epitopes en otras subunidades del receptor. Ciertamente las células T de pacientes con miastenia han mostrado responder a más de 30 péptidos diferentes derivados del receptor de la acetilcolina¹²¹. Esfuerzos para analizar el repertorio de receptores de la célula T que reconocen al AchR están todavía en estudio^{122, 123}.

2.1.2.2.6- *Miastenia gravis experimental autoinmune*

La investigación y el conocimiento de los mecanismos patogénicos en la MG han sido potenciados por el desarrollo de la denominada miastenia gravis experimental autoinmune (*EAMG*)⁸⁸.

La “*EAMG*” puede ser inducida en diferentes especies de animales de experimentación con AchR purificados de órgano eléctrico (Torpedo de California) junto con varios adyuvantes inmunológicos¹²⁴. El modelo de enfermedad puede también ser producido por transferencia pasiva de anticuerpos policlonales isogénicos o también por inyección de anticuerpos monoclonales anti-AchR (mAbs). La transferencia pasiva de grandes cantidades de IgG humana de sujetos afectados de miastenia gravis en el ratón, produce evidencia fisiológica de disfunción de la unión neuromuscular sin debilidad o anormalidad histológica¹²⁵.

En la “*EAMG*” la respuesta del anticuerpo anti-AchR se detecta en la primera semana, aumentando progresivamente con el tiempo, observándose así el desarrollo de dos fases en la enfermedad. La debilidad ocurre transitoriamente en la primera semana –fase aguda- seguida por un segundo episodio progresivo, que frecuentemente conduce a la muerte del animal - fase crónica-^{89,117}.

Fase aguda: se produce necrosis de la membrana postsináptica de la placa motora terminal, con extensa invasión por macrófagos de la fibra muscular¹²⁶. Anticuerpos, componentes del complemento y el complejo de ataque de membrana (MAC) son localizados en la membrana postsináptica^{127, 92}.

Fase crónica: en esta fase se producen hallazgos clínicos y patológicos semejantes a la miastenia gravis humana, incluyendo depósito de inmunoglobulinas y complemento en la membrana postsináptica y disminución del número de AchR^{81,89,92}.

La mayoría de anticuerpos en la “*EAMG*” están dirigidos contra la porción extracelular de la subunidad alfa del receptor de la Ach, la cual contiene el sitio específico de unión de la Ach. Muchos de ellos, sin embargo, se dirigen contra una porción de la subunidad alfa alejada del sitio

de unión de la acetilcolina, la denominada región principal inmunogena (*MIR*)¹⁰¹. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta región inducen una forma de “*EAMG*”¹²⁸.

Usando estos anticuerpos monoclonales se han conseguido diferenciar al menos tres mecanismos por los cuales los anticuerpos inducen la reducción de la transmisión neuromuscular, ya mencionados más arriba en la patogénia de la enfermedad miasténica^{74, 89}.

Como se ha mencionado previamente, en la fase crónica de la “*EAMG*” se produce depósito de inmunoglobulinas y complemento en la membrana postsináptica y disminución del número de AchR^{81, 89, 92}. Esta reducción parece ser el resultado de dos procesos¹⁰⁰. El primero afecta a la llamada modulación antigénica, en la cual el entrecruzamiento (*cross-linking*) de las moléculas de AchR adyacentes por anticuerpos bivalentes, resulta en un aumento del “turnover” de los AchR. El segundo mecanismo consiste en la destrucción por fijación del complemento e infiltración de células inflamatorias con posterior remodelación de la totalidad del contenido de AchR en la placa motora terminal.

En adición a estos procesos que reducen la cantidad de AchR en la placa motora terminal, una proporción de anticuerpos bloqueará la función de los restantes AchR, bien compitiendo con la Ach por su sitio de unión en el AchR o bien bloqueando los mecanismos intramoleculares que desencadenan la apertura del canal iónico del receptor de la Ach^{96, 97, 126}. Como ya se ha mencionado en los mecanismos celulares de la patogénia de la enfermedad, el papel efector de las células T parece estar ausente en la MG, pero también parece faltar en la “*EAMG*”. Las células T no han sido identificadas en la unión neuromuscular de ninguno de los dos procesos¹¹⁷. Por otra parte, sí se han identificado células T anti-AchR^{129, 80}. Parece ser que son linfocitos T CD4+ y tienen una función facilitadora para la respuesta de las células B. En la mayoría de los casos la respuesta de las células T esta dirigida contra la subunidad alfa del AchR^{130, 74}.

Shigemoto¹³¹ en el año 2006 ha introducido un modelo de miastenia gravis experimental por inmunización con antígeno del receptor específico

muscular de la tirosin-quinasa (MUSK), reproduciendo en el ratón miastenia gravis idéntica a la humana y demostrando que en los pacientes seronegativos para los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina que los anticuerpos anti-receptor específico muscular de la tirosin-quinasa (anti-MUSK) son responsables del desarrollo de la enfermedad.

2.1.2.2.7- Miastenia gravis experimental autoinmune versus miastenia gravis humana.

Es evidente, tal como se ha mencionado más arriba que los avances en el conocimiento de la respuesta inmune que se produce en la MG son debidos al estudio y desarrollo de la EAMG. Sin embargo, si bien la respuesta inmune de la MG es casi idéntica a la de la EAMG, hay algunas diferencias¹¹⁷:

- Por encima del 90% de pacientes miastenicos tienen anticuerpos en suero que pueden ser detectados por análisis estándar^{72, 73, 74}. En un 10 a un 20% de pacientes no se detectan anticuerpos, son las pacientes denominados seronegativos, probablemente porque son anticuerpos no detectables por análisis estándar^{73, 74}.

- Los anticuerpos dirigidos contra el AchR humano no tienen reactividad cruzada con los AchR extraídos del órgano eléctrico, ni con los AchR de músculo de otras especies de mamífero¹¹⁷.

- La fase aguda del modelo experimental no ha sido identificada en la MG humana. Sin embargo, en un estudio reciente, parece que se demuestra que si pudiese haber estos cambios inflamatorios agudos en el músculo humano⁶⁰.

A pesar de estas sutiles diferencias parece ser que los cuatro mecanismos patogénicos identificados en la “EAMG” (modulación antigénica, fijación del complemento, infiltración por células inflamatorias y bloqueo de la función del AchR) juegan papeles similares en la miastenia gravis humana¹¹⁷.

Por otra parte, los estudios del síndrome de *MG-like* hallado en algunos humanos tratados con penicilamina deben aumentar nuestro conocimiento

de cómo agentes exógenos pueden desencadenar una respuesta autoinmune¹³².

1.2.2.8- Desarrollo de la autoinmunidad en la miastenia gravis.

Sí bien el determinante serológico de la MG es la presencia de anticuerpos anti-AchR, se han encontrado especificidades para otros anticuerpos en esta enfermedad¹³³:

Anti-AchR.....	70-90%
Antimúsculo estriado.....	20-50%
Antinuclear.....	20-40%
Antimitocondrial.....	4-6%
Antimúsculo liso.....	5-10%
Antitiroideos.....	15-40%
Anticélulas parietales gástricas.....	10-20%
Factor reumatoide.....	10-40%
Test de Coombs.....	10%
Anticuerpos heterófilos.....	10%
Serología falsamente positiva.....	0.5-1%
Antiplaquetas.....	5-50%
LES.....	1-2%
Antilinfocito.....	40-90%
Epitelio escamoso.....	8%

Investigando la etiología de la MG se han considerado factores que pueden determinar la aparición no solo de anticuerpos anti-AchR sino también dar lugar a la expresión de un estado autoinmune más generalizado. En la MG los investigadores se han dirigido básicamente a las siguientes áreas: inmunorregulación, perturbaciones en la red idiotípica y mimetismo molecular.

a) Mecanismos de inmunorregulación:

Muchos investigadores se han concentrado en el fenotipo y propiedades funcionales de las células T ya que ellas tienen un papel prominente entre

los elementos celulares que constituyen la red inmunorreguladora. En el análisis fenotípico no se ha encontrado ningún hallazgo claro. Así los porcentajes de los linfocitos T CD8+ (supresores-citotóxicos) se han encontrado disminuidos¹³⁴, normales^{135, 136} o aumentados¹³⁷. Asimismo el número de linfocitos T CD4+ se han encontrado disminuidos¹³⁶, normales¹³⁷ o aumentados¹³⁵ en la sangre de pacientes con MG.

El AchR nicotínico también ha sido estudiado como un posible marcador sobre las células T inmunorreguladoras. Tanto las células tímicas como las células mononucleares de la sangre parecen expresar AchR^{138, 139}, y perturbación de estos receptores en las células mononucleares de sangre periférica aumenta la actividad supresora¹⁴⁰.

Pacientes con miastenia gravis aparecida en la infancia tienen reducido el número y la actividad funcional de la subpoblación de células T supresores¹⁴¹.

Este defecto fue asociado con un anticuerpo sérico, el cual se unía al AchR y a las células mononucleares de sangre periférica normales causando una reducción de la actividad de la célula supresora. Estas observaciones perfilan la posibilidad de que el anticuerpo anti-AchR pueda reaccionar no solo con el AchR en la unión neuromuscular sino también con el receptor en la superficie de la célula T supresora y de ese modo contribuir a la producción de autoanticuerpo.

La actividad funcional inmunorreguladora de las células T ha sido también estudiada en la MG humana. La supresión no específica mediada por las células T de la síntesis estimulada de inmunoglobulinas o proliferación inducida por mitógeno, se ha visto empeorada en muchos estudios^{142, 143}. La actividad reducida de las células T supresoras se ha asociado con el HLA-B8¹⁴⁴, este haplotipo de HLA tiene aumentada su frecuencia en esta y otras enfermedades autoinmunes.

Desgraciadamente se conoce poco acerca de la regulación de la producción de anticuerpos anti-AchR. En un estudio se observó que los timocitos de pacientes miasténicos aumentaban la respuesta de las células

mononucleares de sangre periférica aun cuando estas últimas eran insensibles a mitógenos *in Vitro*¹⁴⁵.

Esta observación sugiere que el timo de los miastenicos juega un papel fundamental en la patogénia de la MG. Este es hoy en día uno de los más intrigantes aspectos de la MG desde un punto de vista inmunológico y se discutirá en un capítulo aparte.

b) Interacciones idiotipo/antiidiotipo y mimetismo molecular.

Dada la importancia de las interacciones de la red idiotipo/antiidiotipo en la regulación de la respuesta inmune, evidencia de una red anti-AchR/anti-antiAchR ha sido buscada. Hay evidencia de parte de especificidades idiotípicas en anti-AchR humanos¹⁴⁶. Por otra parte anti-anti AchR han sido observados en pacientes con MG, así como en miembros enfermos de la familia^{147, 148}. La identificación de estas moléculas como antiidiotipos fue basada en la demostración de que: 1) no inhibían interacciones irrelevantes de antígeno-anticuerpo, 2) reaccionaban con la fracción (Fab')₂ del anti-AchR y 3) su reactividad no fue inhibida por un gran número de inmunoglobulinas policlonales normales. Tal antiidiotipo puede ser protector, regulando la producción de anticuerpos anti-AchR o compitiendo con la acción del anti-AchR a nivel del receptor. Alternativamente, si tales antiidiotipos fueran una variedad interna, como parece ser el caso de algunos sujetos, podrían ser perjudiciales para el huésped. También los antiidiotipos podrían tener un posible papel en la modulación de la "EAMG"⁸⁹.

El fenómeno del mimetismo molecular implica que epitopes fueran expresados en antígenos extraños o que los anticuerpos contra tales antígenos extraños logaran tener una reactividad cruzada con epitopes propios del individuo. Por ejemplo, la subunidad alfa del AchR del órgano eléctrico de la raya torpedo tiene una parte de sus epitopes similares a los constituyentes de la membrana de muchas bacterias Gram. (-)¹⁴⁹. Sin embargo, estudios en pacientes miastenicos no han mostrado un aumento en la frecuencia o en los títulos de tales anticuerpos antibacterianos.

Una posibilidad es que perturbaciones de las respuestas idiotipo/antiidiotipo generadas por antígenos extraños puedan iniciar la producción de autoanticuerpos. En este sentido ha sido observado que ciertos antiidiotipos generados en el ratón en respuesta a anticuerpos antidextrano pueden funcionar como anti-AchR¹⁵⁰. Ya que el dextrano está presente en la pared celular de numerosas bacterias, es posible que la respuesta inmune a ciertas bacterias pueda iniciarse como una reacción en cadena llevando a la producción de anticuerpos anti-AchR.

Otro tipo de mimetismo molecular viene determinado por el hallazgo de que la respuesta inmune a una Ach-like obtenga no solo anticuerpos contra la Ach-like sino también anticuerpos autoantiidiotipo los cuales mimetizan la acción anti-AchR¹⁵¹. Algunos de estos anticuerpos antiidiotipo fueron capaces de inducir MG-like en modelos de experimentación animales.

2.2. Etiología de la Miastenia Gravis

Al igual que en otras enfermedades autoinmunes humanas, la etiología de la miastenia gravis (MG) y por tanto el origen de la respuesta autoinmune, continua siendo desconocido.

El timo se ha implicado como posible lugar donde se origine esa respuesta autoinmune, ya que aproximadamente el 80% de los pacientes con MG presentan anormalidades tímicas¹⁵² (hiperplasia, timoma). Por otra parte, la timectomía produce mejoría de la enfermedad en muchos pacientes¹⁵³. Las células B y las células T del timo son las más reactivas frente al receptor de la acetilcolina (AchR) que las células T ó B de la sangre periférica¹⁵⁴. Además de linfocitos el timo miastenico y el normal contienen células mioides (similares a los miotubos estriados)^{155, 156}, que llevan en su superficie receptores de acetilcolina. Las células mioides son probablemente el origen del AchR y mRNA de la subunidad α de los receptores que han sido hallados en los extractos tímicos¹⁵⁷. Dada su localización estratégica dentro del timo, rodeado por células presentadoras

de antígeno y linfocitos T helper, los receptores unidos a las células mioides pueden ser particularmente vulnerables a un ataque inmune. Alteraciones en las células mioides o en los linfocitos, o bien rotura de la regulación inmunológica, pueden interferir en la tolerancia, y dar lugar a una respuesta inmune.

La posibilidad de una infección vírica pueda desencadenar este proceso, ha sido sugerida. Sin embargo hasta ahora todos los estudios realizados han fracasado en demostrar la evidencia de una infección viral¹⁵⁸.

La hipótesis de que la MG pueda ser desencadenada por un mimetismo molecular (respuesta inmune a un agente infeccioso que presenta similitud al AchR) también adquirió alguna relevancia. Anticuerpos obtenidos de 6 a 40 pacientes MG se ligaban a una secuencia péptidica del virus herpes simple que es homóloga a la secuencia de subunidad α del AchR¹⁵⁹. Reactividad cruzada entre bacterias y el AchR también ha sido comunicada¹⁶⁰.

Factores genéticos y anormalidades de la regulación inmune pueden aumentar las probabilidades de desarrollar MG. Existe una moderada asociación entre MG y HLA-B8 y DRw3. Fuerte asociación con HLA-DQw2 es todavía controvertida¹⁶¹. Una amplia variedad de enfermedades autoinmunes asociadas han sido comunicadas apareciendo en pacientes con MG, invocándose como posible causa de un defecto en la inmunorregulación y sugiriendo que la predisposición pueda ser hereditaria¹⁶².

ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA MIASTENIA GRAVIS.

-Trastornos del timo: Timoma, hiperplasia folicular linfoide.

-Trastornos autoinmunes: Tiroiditis, Enfermedad de Graves, artritis reumatoide, lupus eritematoso, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, alopecia autoinmune, trastornos de la piel. No es infrecuente dada su predisposición genética hereditaria, la presencia de historia familiar de trastornos autoinmunes.

-Trastornos o circunstancias que pueden exacerbar la MG: hipertiroidismo, infección oculta, tratamiento médico con fármacos contraindicados en la miastenia (aminoglucósidos quinina, antiarrítmicos, etc...).

-Trastornos que pueden interferir con el tratamiento: tuberculosis, diabetes, úlcera péptica, antecedentes de hemorragia gastrointestinal, enfermedad renal, hipertensión, asma, osteoporosis.

2.3. Tratamiento de la Miastenia Gravis

El tratamiento ideal frente a la miastenia gravis sería aquel que careciendo de toxicidad consiga la inhibición específica de la respuesta autoinmune contra el receptor de la acetilcolina sin interferir con otros aspectos del sistema inmune y cuyos resultados tuvieran efecto prolongado y persistente¹⁴.

En la miastenia gravis existen varias pautas terapéuticas actuales (tabla 2) y varias en fase de investigación que hoy por hoy algunas son utópicas pero que podrían tratarse de soluciones curativas en un futuro (tabla 3).

-
- 1.- Acción sobre la unión neuromuscular (tratamiento sintomático)
 - a)-Anticolinesterasicos
 - 2.- Acción inmunológica (tratamiento patogénico)
 - a)-Tratamiento inmunológico de larga duración:
 - Convencionales (Corticoides, Azatioprina, Ciclofosfamida, Ciclosporina).
 - Nuevos (Micofenolato Mofetilo, Tacrolimus).
 - b)-Tratamiento inmunológico de corta duración:
 - Plasmaferesis
 - Inmunoglobulinas
-

Tabla 2: Opciones Terapéuticas en la Miastenia Gravis¹⁶³.

-
- 1).- "*Pristine immune system*"
 - a) Ciclofosfamida con irradiación total y rescate de médula ósea.
 - 2).- Depleción de células B específicas Ach-R ("Hot antigen suicide).
 - 3).- Depleción de células T helper (anticuerpos anti CD4, toxina IL-2)
 - 4).- Antígenos diana específicos contra células T.
 - a) Vacunas de células T
 - b) Inmunizaciones con péptidos TCR
 - c) APC utilizados como diana de células T específicas de Ach-R
 - 5).- Supresión específica
 - 6).- Células presentadoras de antígenos
 - 7).- Mecanismos antiidiotipo
 - 8).- Inducción de tolerancia
 - a) Antígenos desagregado
 - b) Anti CD4 con antígenos
 - c) Fragmentos tolerogénicos
-

Tabla 3: Inmunoterapia en desarrollo para la miastenia gravis¹⁶⁴.

2.3.1- Tratamiento con anticolinesterásicos

Los anticolinesterásicos forman parte del tratamiento sintomático y continúan siendo el tratamiento de primera línea para muchos pacientes miasténicos. Mejoran la fuerza motora pero no alteran la historia natural de la enfermedad, la cual a menudo progresa si no es tratada con otros tratamientos. Este tratamiento ha contribuido a reducir la morbilidad de los pacientes miasténicos dirigido a manejar las consecuencias del ataque de los anticuerpos sin interferir en este ataque¹⁶⁵.

Los inhibidores de la colinesterasa, especialmente la neostigmina (Prostigmina®) introducida en 1934 por la Dra. Mary Walker que representa la primera terapia para entender la patogenia de la enfermedad¹⁵, posteriormente fueron introducidas la piridostigmina (Mestinón®)¹⁶⁶, ambenomiun(Mytelase)¹⁶⁷, y edrofonio (Tensilón®, Anticude®)¹⁶⁸. En general se utiliza más la piridostigmina por la mayor duración de su efecto terapéutico y su menor incidencia de efectos secundarios y reservando el edrofonio como agente diagnóstico. El ambenomiun creado para mejorar el efecto terapéutico en la miastenia ocular, efecto no siempre logrado.

El mecanismo de acción de los anticolinesterásicos es la inhibición reversible de la enzima acetilcolinesterasa. De esta manera se retrasa la hidrólisis de la acetilcolina y se aumenta la difusión horizontal de los cuantos de acetilcolina en la membrana postsináptica. Además actúan también sobre las terminaciones presinápticas y como agonistas del receptor de acetilcolina¹⁶⁹. Otros agentes anticolinesterásicos, como los organofosforados actúan como inhibidores irreversibles, sin que tengan ninguna aplicación clínica¹⁷⁰. Este tratamiento es eficaz en las fases iniciales y casos leves de la enfermedad presumiblemente debido a la presencia de un número adecuado de receptores de acetilcolina (AChR). Los efectos secundarios de esta medicación son leves y están relacionados con una elevada concentración de acetilcolina a nivel de la sinapsis nicotínica y muscarínica³⁵.

No existe una dosis estándar para estos medicamentos, ya que varían de paciente en paciente e incluso en el mismo paciente en temporadas. Por esto mismo hay que explicar al paciente que las dosis deben variarse para encontrar en cada fase y cada paciente la dosis mínima con la que se consiga la mayor respuesta. El bromuro de piridostigmina (Mestinón®) esta disponible en tabletas de 10 y 60 mg y ampollas de 2 mg. También se encuentra en solución (60 mg/5 ml) y comprimidos de 180 mg de acción retardada (Mestinón Retard®). Sus efectos empiezan a los 30 minutos y la máxima concentración plasmática, que coincide con su mayor efecto, se consigue a las 2 horas. El aclaramiento se hace en su mayor parte en el riñón. La timectomia no influye en la farmacocinética, pero se cuestiona si los corticoides disminuyen su absorción¹⁷¹.

La dosis se debe ajustar a cada paciente, pero generalmente se inicia con dosis de 30-60 mg cada 6 horas, sin ser necesaria su administración durante el sueño, salvo en casos excepcionales, en los que la última dosis puede con la medicación “retard” para evitar la excesiva debilidad matutina, pese a que esta forma de presentación “retard” es de absorción y efectos muy variables y hay centros especializados en los que no se recomienda su utilización. Las dosis no se deben modificar en más de 15 mg. por toma sin consultarlo al facultativo responsable. Una vez establecida una dosis personal esta debe ser revalorada periódicamente con el fin de conseguir situar en la menor dosis posible. De todas maneras, la mayoría de los pacientes aunque mejoran en sus síntomas, lo hacen de manera incompleta, encontrando en la mayoría de pacientes grupos musculares convenientemente tratados, junto con grupos musculares infratratados y otros grupos sobre dosificado. El bromuro de piridostigmina (Mestinón®) esta disponible en tabletas de 10 y 60 mg y ampollas de 1 mg. También se encuentra en solución (60 mg/5 ml) y comprimidos de 180 mg de acción retardada (Mestinón Retard®). Sus efectos empiezan a los 30 minutos y la máxima concentración plasmática, que coincide con su mayor efecto, se consigue a las 2 horas. El aclaramiento se hace en su mayor parte en el riñón. La timectomia no influye en la

farmacocinética, pero se cuestiona si los corticoides disminuyen su absorción¹⁷¹.

Los efectos secundarios por sobredosis que nos indicarían de forma importante que debemos disminuir la dosis son: Síntomas digestivos (hipermotilidad intestinal, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea), sudoración, lagrimeo, visión borrosa, broncorrea y bradicardia¹⁷². Todos estos son síntomas que pueden ser previos a la aparición de la complicación más importante que es la crisis por sobredosis. En caso de que un paciente presente de forma brusca síntomas de crisis, el médico deberá diferenciar entre los dos tipos: la crisis miasténica y la crisis por sobredosis con muscarínicos y nicotínicos, es decir por falta o por exceso de medicación. Para este diagnóstico diferencial es imperativo el evaluar minuciosamente los síntomas¹⁷³ y realizar una prueba de edrofonio por vía endovenosa, que en caso de tratarse de una crisis miasténica mejorara espectacularmente los síntomas, y por el contrario en caso de tratarse de una crisis por sobredosis no mejorará o incluso podría empeorarlos. Se han descrito casos de bromismo por sobredosis de medicación anticolinérgica, presentando síntomas de reacción psicótica aguda¹⁷⁴.

Diagnóstico diferencial de la crisis miasténica y colinérgica.

<u>Crisis miasténica</u>	<u>Crisis muscarínica</u>	<u>Crisis nicotínica</u>
Diplopia	Sudoración	Fatiga muscular
Ptosis	Lagrimeo	Fasciculaciones
Disartria	Salivación	Trismus
Disfagia	Anorexia	Calambres
Ansiedad	Nauseas y vómitos	Contracciones
Tos débil	Pirosis	Disartria
Disnea	Cólico abdominal	Disfagia
Apnea		
Debilidad general		
Facies miasténica	Diarrea	Facies miopática
	Poliuria	Irritabilidad
	Miosis, visión borrosa	Vértigo
	Broncorrea	Ansiedad
	Diseña	Coma
	Edema pulmonar	

Tabla 4.- Síntomas de crisis miasténica y colinérgica (muscarínica y nicotínica)

En caso de presentarse los síntomas de sobredosis muscarínicos puede administrarse sulfato de atropina (0,4-0,6mg), aunque si los efectos indeseables son predominantemente intestinales es preferible el uso de derivados morfínicos como el difenoxilato (Lomotil®), loperamida o el

glicopirrato). Como regla general, si la dosis necesaria para mantener una vida normal respecto a la miastenia gravis produce efectos secundarios, debe de añadirse e incluso considerarse otra forma de tratamiento. La prostigmina tiene una mayor incidencia de efectos muscarínicos por lo que su empleo se reduce a la administración parenteral en pacientes con imposibilidad de tragar o en anestesia para revertir los agentes no despolarizantes. El edrofonio se utiliza como prueba diagnóstica (prueba de Tensilon® o Anticlude®).

Existen dos drogas más para el tratamiento sintomático de la miastenia gravis la efedrina¹⁷⁵ y la 3,4-diaminopiridina¹⁷⁶ pero basados en datos limitados estos fármacos no son inocuos ni más eficaces que la piridostigmina.

2.3.2- Tratamiento quirúrgico

El resultado de la timectomía suele observarse entre el primer y el quinto año después de la cirugía^{177,153}. Al parecer este tratamiento aumenta las posibilidades de remisión de la enfermedad y con ello reduce la necesidad de drogas inmunosupresivas a largo plazo. La relación coste-beneficio de este tratamiento se reduce con el tiempo. Después de más de ochenta años practicando la extirpación quirúrgica del timo todavía existen controversias tales como: la indicación de la timectomía, la técnica quirúrgica más apropiada, la amplitud de la extirpación y los efectos de la timectomía en los pacientes de edad avanzada¹⁷⁸. En un estudio de DeFilippi¹⁷⁹, los pacientes presentan mejor resultado, en cuanto a la mejoría o remisión, cuando la timectomía es realizada durante los primeros 2 años de aparición de los síntomas de miastenia gravis mientras que muchos otros autores no encuentran diferencias en los pacientes intervenidos con más tiempo de evolución de la enfermedad. Masaoka¹⁸⁰ defiende la extirpación del timo y la grasa peritimica mientras que Jaretzki¹⁸¹ defiende una extirpación radical del timo y grasa peritimica mediastínica y cervical, con extirpación de ambas pleuras y pericardio para evitar el abandono de focos de timo

ectópico en el territorio de descenso embriológico del timo. La edad, la amplitud, la vía e incluso la propia indicación quirúrgica continúan siendo motivo de controversia, al no existir trabajos prospectivos, randomizados a doble ciego que demuestren la validez de la técnica. Existe también controversia respecto a la eficacia de la timectomía si la enfermedad aparece después de los 50 años. Un meta-análisis de numerosos estudios demostró un 25% menos de remisión en el grupo de pacientes cuando la enfermedad aparece después de los 50 años de edad comparada con el grupo de más jóvenes¹⁷⁸.

2.3.3- Tratamiento inmunosupresor

2.3.3.1- Historia de la inmunosupresión

La inhibición selectiva del sistema inmunitario, sin dañar las funciones vitales del organismo y sin favorecer las vulnerabilidades del organismo a las infecciones y al cáncer, es desde hace tiempo el objetivo de médicos e inmunólogos involucrados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el trasplante de órganos.

A partir de 1960 cuando Nastuk y Simpson sospecharon en que la miastenia gravis era una enfermedad autoinmune, poco después iniciaron el tratamiento inmunosupresor, y el pronóstico del paciente miastenico mejoro de manera espectacular. Actualmente existen varios fármacos de primera línea terapéutica en el tratamiento de la enfermedad, entre estas están las drogas inmunosupresoras convencionales como la prednisona, la azatioprina, la ciclosporina, la ciclofosfamida y los nuevos inmunosupresores como el micofenolato mofetilo y el tacrolimus. El objetivo de todos estos fármacos es conseguir una remisión de la enfermedad y mantenerla. Estos tratamientos son de muy larga duración y no exentos de efectos secundarios por lo que deben ser controlados estrictamente, y además tienen un periodo de latencia entre la administración del medicamento y su efecto terapéutico.

Fármaco	Dosis usual	T aparición de efecto	T de máximo efecto	Monitorización
Prednisona 1950	15-20 mg/día (se incrementa gradualmente la dosis)	6 semanas	3-6 meses	Peso Pr. arterial Glucosa, electrolitos Densidad ósea Calcio urinario
Azatioprina (Imurel®) 1960	2-3 mg/Kg/día (100-250 mg/día)	3-12 meses	1-2 años	Leucocitos Formula leucocitos Vol Corp Medio Plaquetas Función hepática
Ciclosporina (Sandimmun®) 1980	5 mg/Kg /día en 2 dosis (125-200 mg 2 veces al día)	2-12 semanas	3-6 meses	Presión arterial Creatinina Urea Ciclosporinemia
Micofenolato mofetilo (cellCept®) 1990	1000mg/día(1ª semana) 2000mg/día (2semana)	10 semanas	27 semanas	Presión arterial hemograma electrolitos f.hepatica y renal colesterol y trigliceridos
Tacrolimus (FK506) (Prograf®) 1990	0.1mg/kg/día	5 días	15 días	Peso , pr.arterial hemograma electrolitos f.hepatica, h.tiroideas, colest.y triglicéridos plaquetas

Tabla 5. Evolución histórica de la aparición de los medicamentos inmunosupresores utilizados en el tratamiento de la miastenia gravis.

2.3.3.2- Inmunosupresores convencionales

2.3.3.2.1- Corticosteroides.

Son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la miastenia gravis y específicamente la prednisona. La eficacia de este medicamento en esta enfermedad no se ha demostrado en estudios adecuados de doble ciego y control-placebo¹⁴. Los corticoides son muy efectivos en cuanto al aumento de la fuerza muscular, pero su abanico de efectos secundarios es también muy amplio, razón por la cual disminuye, tanto para el médico como para el paciente, su aceptación terapéutica. Su mayor efecto es antiinflamatorio mediante la reducción de la expresión de las citoquinas inflamatorias¹⁴ y también puede inducir apoptosis en las células inmunes^{182, 183}. Su mecanismo de acción es desconocido en algunos aspectos aunque parece ser que éstos ejercen varios efectos: inducción de linfopenia, reducción de la diferenciación y proliferación de los linfocitos, sobre todo los linfocitos T, reducción de la producción de linfocinas como la IL-1, IL-2, TNF y FIM (factor inhibidor de la migración), alteración de la función de los macrófagos y del procesamiento y muestra de antígenos¹⁸⁴. Además se han descrito la reducción de los niveles de anticuerpo anti Ach-R así como la disminución de la reactividad de los linfocitos circulantes ante el receptor de acetilcolina^{185, 186}. Incluso se ha descrito que la prednisona puede tener acción directa neuromuscular, como es el aumento de la síntesis de receptores de acetilcolina en el músculo, aunque no se ha podido determinar cual es el efecto clínico real de estos hallazgos^{187, 188}. En general produce una gran respuesta cuando se da la dosis apropiada inmunosupresora, citándose en algunos estudios tasas de remisión farmacológica (*PR*) entre un 75% y 80% de los casos^{23,189} ha descrito un deterioro inicial de la fuerza muscular (crisis miasténica corticoidea) al iniciar el tratamiento con dosis altas de prednisona. Esta crisis de disminución de la fuerza muscular ocurre entre los 7 y 14 días del inicio del tratamiento, desapareciendo en menos de una semana. Algunos autores proponen para evitarla el aumento gradual de la dosis de esteroides durante 1 y 2 meses para reducir el riesgo de presentar deterioro de la enfermedad¹⁹⁰. La mejoría clínica de los pacientes

tratados con corticoides se inicia a las 6 semanas, con un máximo efecto terapéutico a partir de los 3 meses. No existen contraindicación absoluta para su administración, y son relativas la diabetes, la hipertensión incontrolable, la enfermedad ulcero-péptica, la osteoporosis, las cataratas, la depresión o las infecciones, y todas ellas pueden paliarse con medidas médicas¹⁹¹. Debe evitarse la lactancia materna en las pacientes con corticoides ya que se ha demostrado el paso de estos medicamentos a través de la leche materna.

A pesar de que el tratamiento con los corticosteroides es efectivo y la remisión farmacológica ocurre entre 75% y 80% de los pacientes, aparecen efectos secundarios mayores y conviene valorar el coste y beneficio para algunos pacientes¹⁹², estos efectos son varios y entre ellos cabe destacar la obesidad, hipertensión arterial, diabetes, psicosis esteroidea (ansiedad, depresión, insomnio), glaucoma, osteoporosis (aplastamiento vertebral), cataratas, ulcus gastroduodenal, perforaciones, miopatía esteroidea, infecciones oportunistas (micosis, víricas, tuberculosis), distribución anormal de la grasa, alcalosis hipocalémica, retención de sodio y agua, insuficiencia suprarrenal, alteraciones menstruales, necrosis ósea de la cabeza del fémur, litiasis renal, retraso en la cicatrización, acné, hirsutismo. Sin embargo y pese a su alta yatrogenia la prednisona es un tratamiento altamente beneficioso y muy utilizado por los especialistas en esta enfermedad¹⁴. Recientemente se ha sugerido que la terapia prolongada con prednisona produce una hiperfunción de la glicoproteína-P con el resultado de resistencia a diferentes drogas¹⁹³.

La estrategia del tratamiento se basa en conseguir la remisión para posteriormente empezar la reducción de la terapia inmunosupresora mientras se mantiene dicha remisión. Existen distintas pautas de tratamiento para la prednisona: Iniciar con dosis alta diaria de 1mg/kg/día repartido en 3 tomas, y si aparece deterioro de la enfermedad durante las 2 semanas de tratamiento, se recomienda pasar a la otra modalidad que consiste en un inicio de una dosis diaria de 15 a 20 mg de prednisona e incrementar la dosis en 5 mg cada tres días hasta conseguir la respuesta clínica óptima o

hasta un máximo de 60-90 mg en el margen de 4 a 6 semanas. La mejoría se inicia a las 6 semanas, con el máximo beneficio a partir de 3 a meses. A los tres meses debe modificarse gradualmente la dosis para así mantener al paciente con una dosis a días alternos con el mínimo de dosis para la máxima mejoría. La tercera modalidad de tratamiento es iniciar la pauta de días alternos con 120mg/días alternos²³. La única droga utilizada en la miastenia que se potencia con la administración de corticoides es la ciclosporina. Cuando los corticoides se administran junto con los anticolinésterasicos provocan la aparición de molestias gástricas.

2.3.3.2.2- Azatioprina.

Es un fármaco cuya utilización se inició en 1975 por Matell¹⁹⁴ que es un inhibidor de la síntesis de purinas y su acción pasa por su metabolización a 6-mercaptopurina y actúa predominantemente en las células T¹⁹⁵, en el procesamiento y presentación del antígeno, así como en la proliferación y diferenciación de las células inmunocompetentes¹⁹⁶. Escasos estudios han sugerido su utilización como monoterapia para inducir la remisión de la miastenia gravis. La mayoría de ellos describen su utilización en combinación con los corticosteroides en aquellos pacientes que se pueden beneficiar de una disminución de la dosis de los mismos, para aquellos en los que están contraindicados éstos, en aquellos en los que la dosis de corticoides es insuficiente, y cuando no hay respuesta a la timectomía^{197, 198, 199}. Es un medicamento que tiene dos inconvenientes. En el 10% de los pacientes produce fiebre, anorexia, náuseas, vómitos y dolor abdominal, y en segundo lugar su acción es lenta, tardando entre 3 y 12 meses en aparecer las primeras señales de mejoría y alcanzando su pico de acción entre 1 y 2 años después de su inicio²⁰⁰. Los principales efectos secundarios tóxicos son hematológicos (leucopenia, trombocitopenia) que son reversibles a la disminución o supresión de la droga, hepáticos (aumento de transaminasas), infecciosas, gastrointestinales (náuseas, vómitos y anorexia)^{201, 202}. En pacientes con errores congénitos del metabolismo, como la deficiencia de la tiopurine metiltransferasa puede producir

supresión de la medula ósea a dosis mas bajas^{203, 204}. La dosis de azatioprina debe reducirse en un 75% cuando se utiliza con alopurinol (Zyloric®) ya que este interfiere con la degradación enzimática de la azatioprina.

Su absorción oral es buena, y la dosis inicial es de 50 mg/día durante una semana con posteriores aumentos a razón de 50 mg a la semana hasta conseguir la dosis ideal que es de 2 a 3 mg/Kg/día¹⁴. Hay que recordar que es importante la estricta monitorización de los pacientes. La azatioprina dada su escasa potencia y retraso en el inicio de su efecto terapéutico, es cada vez menos utilizada para el tratamiento de la miastenia y nuevas drogas han ocupado su lugar.

2.3.3.2.3-Ciclofosfamida.

Es una mostaza nitrogenada que actúa sobre el DNA inhibiendo la proliferación celular. Su efecto es mayor sobre los linfocitos B que los T, siendo un agente excelente para enfermedades mediadas por anticuerpos²⁰⁵. Este fármaco es de uso muy limitado en la miastenia gravis y se indica en las ocasiones en que han fracasado tanto la timectomía como los otros inmunosupresores²⁰⁶. No existen estudios controlados de este fármaco para valorar la remisión en miastenia gravis²⁰⁷. La dosis es de 1,5 a 5 mg/kg./día. El riesgo de efectos adversos de este fármaco es superior a los corticoides. Sus efectos secundarios incluyen la supresión de la medula ósea con el riesgo de infecciones oportunistas, toxicidad a nivel de vejiga, alopecia, riesgo de producir neoplasias en función de la dosis, náusea, vómitos, anorexia, y decoloración de la piel y las uñas¹⁴.

2.3.3.2.4- Ciclosporina.

La ciclosporina A (Sandimmun®) es un polipéptido cíclico, aislado a partir del hongo *Hypocladium Inflatum* Gams. Es una sustancia neutra, muy lipofílica, e insoluble en agua. Fue ampliamente utilizado en el tratamiento del rechazo de órganos y su actividad inmunosupresora comunicada por Borel²⁰⁸ en 1976.

La ciclosporina inhibe la respuesta inmune dependiente de los linfocitos T. Es un inmunosupresor potente que demostró su eficacia en la miastenia gravis en un inicio en un modelo experimental animal²² y posteriormente en estudios clínicos controlados²³. Su modo de acción es la inhibición de forma potente de la activación de los linfocitos T y la producción de mediadores celulares, en especial las interleuquinas (IL-2 y la IL-4)²⁰⁹ por inducción de los linfocitos T helper (CD4). El efecto principal es causado por la interferencia con los T helper, que son necesarios para la activación de los linfocitos B y la consecuente producción de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina²¹⁰. En la superficie del linfocito la ciclosporina se une a un receptor distinto al del reconocimiento antigénico y penetra en la célula probablemente mediante disolución en la capa lipídica de la membrana. Posteriormente es transportada al citoplasma, donde se une a un receptor de alta afinidad, una inmunofilina denominada ciclofilina, especialmente la ciclofilina A que es la más abundante en las células T²¹¹. La acción final de este complejo inmunofilina-ciclosporina es la de alterar la transcripción del ARN mensajero codificado para linfocinas.

Esta acción ampliamente selectiva en comparación con los otros inmunosupresores como son los corticoides, la azatioprina y la ciclofosfamida, y su no interferencia con la producción mieloide disminuye el grave riesgo de infecciones oportunistas. Su eficacia es similar a la azatioprina pero de acción más rápida, ya que la ciclosporina empieza a actuar en uno o dos meses y su efecto es máximo a los 3 a 6 meses²¹². Para minimizar los efectos secundarios se administra en dos dosis diarias para un total de 5 mg/kg./día. Esta dosis debe estar regularmente controlada, en principio cada mes mediante los efectos clínicos, ciclosporinemias y creatinina en suero. Una vez que se han alcanzado las dosis satisfactorias, este medicamento debe ser disminuido hasta obtener la mínima dosis con la máxima eficacia clínica. El alto precio de éste fármaco también limita su uso clínico. Ciclosporina se puede administrar por vía oral o por vía endovenosa y se absorbe en el intestino delgado oscilando su biodisponibilidad entre el 20% y el 50%(media de 34%). Su absorción

disminuye en pacientes con diarrea, enfermedad intestinal, insuficiencia hepática, o drenaje biliar externo.

La biodisponibilidad aumenta con el paso del tiempo lo que explica la variabilidad en la concentración sanguínea alcanzada tras la administración de una dosis fija y que la dosis oral deba disminuirse con el paso del tiempo para mantener una concentración determinada en sangre. La concentración plasmática máxima se alcanza a las 3-4 horas de la administración oral. Su vida media oscila entre 12 y 17 horas. El 50-70% de la ciclosporina en el comportamiento vascular va unida a células sanguíneas, fundamentalmente hematíes, y en menor proporción a polimorfo nucleares y linfocitos. El 30-50% restante de ciclosporina no unida a células es la fracción plasmática, de la cuál un 85-90% va unida a proteínas plasmáticas, fundamentalmente lipoproteínas. Por su naturaleza lipofílica, la ciclosporina tiene gran afinidad tisular, distribuyéndose ampliamente por todo el organismo, pero alcanzado mayores concentraciones en tejido graso, músculo, páncreas, glándulas suprarrenales, corazón, pulmón e hígado.

El 99% de la ciclosporina plasmática se metaboliza en el hígado biotransformándose a través del sistema enzimático microsomal del citocromo, mediante N-demetilación y mono o dihidroxilación. Ello explica que la biodisponibilidad varía con la función hepática y con la administración simultánea de fármacos que inhiben (p.e. eritromicina, andrógenos, metilprednisolona, antagonistas de calcio) o estimulan (p.e. rifampicina, fenobarbital, fenitoína, carbamacepina, ácido valplórico) el sistema del citocromo P450²¹³. La ciclosporina y sus metabolitos se excretan fundamentalmente por bilis²¹⁴, existiendo circulación enterohepática. Se han identificado 15 metabolitos de ciclosporina, alguno de los cuales mantiene actividad inmunosupresora²¹⁵. Menos del 10% de la ciclosporina administrada por vía oral se elimina por el riñón, y solo el 0,1% de la dosis se elimina por riñón en forma metabólicamente activa. Por ello, la insuficiencia renal no afecta de manera importante los niveles de la ciclosporina. La metabolización en los pacientes de edad pediátrica esta aproximadamente aumentada en un 40% comparada con los adultos, debido

a una mayor inducción del sistema enzimático citocromo P450, por lo que es preciso administrar dosis superiores que en los adultos para alcanzar concentraciones sanguíneas similares. Por el contrario, los pacientes de edad avanzada la metabolizan más lentamente²¹⁶.

Sus efectos adversos más importantes son la nefrotoxicidad, la neurotoxicidad, y la hepatotoxicidad²⁴. Otras complicaciones frecuentes son la producción de hipertensión arterial, acidosis metabólica, hiperclorémica, hipercolesterolemia, hiperuricemia, hiperglicemia, hipertricosis, así como la obesidad, y la hiperplasia gingival, que restan valor a este inmunosupresor en el tratamiento de una enfermedad con alta incidencia de presentación en mujeres jóvenes²⁴. La mayoría de estos efectos son leves y reversibles o prevenibles disminuyendo la dosis (fenómenos dosis-dependiente). Ciclosporina induce la síntesis de TGF- β en Vitro y en vivo, que diferentes estudios han sugerido la relación de la TGF- β con la progresión de las enfermedades renales²¹⁷, además parece que TGF- β producida por la administración de este fármaco está directamente relacionada con la progresión del cáncer²¹⁸. Otros efectos son impredecibles y no prevenibles, debido a la diferente susceptibilidad personal.

Esta contraindicado en los casos de hipersensibilidad al fármaco o al aceite de maíz en el que va disuelto y si el paciente padece una hipertensión arterial mal controlada o nefropatía. No se debe usar en embarazadas por el riesgo de teratogenicidad. Debido a sus efectos nefrotóxicos, la ciclosporina no puede usarse en ningún caso con antiinflamatorios no esteroideos o con anfotericina B. Así mismo está contraindicado también con la lovastatina por el peligro de causar mioglobinuria y con la azatioprina por la posibilidad de aumentar considerablemente el riesgo de aparecer linfomas. Tiene contraindicación relativa con los aminoglucósidos, ketoconazol, cefalosporina, melfalan, trimetropin y sulfametoxazol.

En la miastenia su indicación es la misma que la de los otros inmunosupresores, es decir, la edad avanzada que contraindique la intervención quirúrgica o bien el fracaso terapéutico ante la cirugía o el resto de la medicación convencional.

2.3.3.3- Nuevos inmunosupresores

Nuevas terapias alternativas con inmunosupresores de reciente introducción, pueden ser de utilidad en pacientes que no responden a la terapia inmunosupresora convencional o que no toleran los efectos secundarios.

Estos fármacos son: el micofenolato mofetilo, el rituximab, el etanercept, el leflunomide y el tacrolimus.

2.3.3.3.1-Micofenolato mofetilo

Este fármaco de reciente aparición y potente acción inmunosupresora, actúa bloqueando la síntesis de las purinas en los linfocitos T y B activados y selectivamente inhibe su proliferación dejando intactas el resto de la línea celular²¹⁹. Se ha comprobado su eficacia en prevenir el rechazo en pacientes con trasplante renal cuando es utilizado en combinación con los corticosteroides y la ciclosporina²²⁰.

El micofenolato mofetilo es el resultado del desarrollo de un fármaco anterior, el ácido micofenólico. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de purinas de los linfocitos T y B mediante el bloqueo del enzima inosin- monofosfato-deshidrogenasa^{221 , 222 , 223 224}. Esta inhibición doble de la proliferación celular, es decir, tanto de los linfocitos B (inmunidad humoral) como, de los linfocitos T (inmunidad celular), podría jugar un papel importante en el control del rechazo crónico. Este fármaco presenta un perfil seguro, no produce mayor toxicidad orgánica ni efectos mutagénicos^{225, 226}.

Hauser²²⁷ ha comunicado la buena respuesta al fármaco en un paciente con miastenia gravis severa y refractaria. Ciafaloni²⁵ en un estudio prospectivo de 12 pacientes timentomizados con MG refractaria y con dependencia de la prednisona observa que esta droga es efectiva en estos casos, pero aconseja más investigación para valorar la eficacia y la seguridad de este fármaco como monoterapia inmunosupresora en la miastenia gravis.

En un estudio retrospectivo más amplio²²⁸, la mejoría clínica aparece a las 10 semanas del inicio del tratamiento con este fármaco (rango de 4-40 semanas), y con máxima mejoría a las 27 semanas (rango de 8-104 semanas).

La dosis Standard es de 2000-3000mg/día dividida en dos tomas. Los pacientes inician con 500mg dos veces al día, y después de una semana aumentar la dosis a 1000mg dos veces al día. Los principales efectos secundarios son gastrointestinales como diarrea, dolor epigástrico, náuseas, vómitos y íleo. Se han descrito también trastornos metabólicos como hiperpotasemia, hiperglucemia, hipofosfatemia, hipercolesterolemia y edemas²²⁸. En el estudio multicentrico que analiza de forma retrospectiva 85 pacientes miastenicos tratados con micofenolato mofetilo, presenta un 73% de mejorías, 27% de efectos secundarios y por esta razón un 6% de abandono terapéutico²²⁸.

2.3.3.3.2-Rituximab

El rituximab, es una fosfoproteína no glicosilada, con escasos casos que comunican el beneficio en la miastenia gravis refractaria. Zaja²⁷ ha comunicado una mejoría de un paciente afecto de esta enfermedad con este fármaco.

2.3.3.3.3-Etanercept

El etanercept, factor de necrosis tumoral (TNF) α , es una citoquina implicada de diferentes enfermedades autoinmunes, incluida la miastenia gravis²²⁹, recientemente Rowin²⁸ en un ensayo clínico sobre 11 pacientes con dosis de 25 mg. dos veces a la semana, solo seis han presentado mejoría a los seis meses de tratamiento y en tres fue suspendido por empeoramiento.

2.3.3.3.4- Leflunomide

Es un derivado isoxazólico, que se convierte en un metabolito activo después de su absorción enteral, tiene acción antiinflamatorio y inhibe la síntesis de la pirimidina. Vidic-Dunkovic²⁹ ha demostrado que este fármaco

suprime el desarrollo de miastenia gravis experimental en ratas inmunizadas con proteínas receptores de acetilcolina (AchR).

2.3.3.3.5- Tacrolimus

Es un inmunosupresor de reciente introducción que Konishi³⁶ y Yoshikawa³⁷ han demostrado el beneficio de los pacientes afectados de miastenia gravis refractaria a los inmunosupresores convencionales con este fármaco. Actúa suprimiendo la producción de Interleuquina-2 relacionada con la activación de los linfocitos T, inhibiendo la diferenciación y proliferación de las células T citotóxicas.

2.3.4- Tratamiento inmunológico de corta duración

2.3.4.1- Plasmaferesis

Recibe este nombre la separación del plasma sérico por filtración o centrifugación y su sustitución por albúmina. Con este método se separan del plasma tanto los agentes responsables directamente de la miastenia gravis como son los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina, como otras sustancias implicadas en la historia natural de esta enfermedad, como son el complemento y los complejos inmunes.

Su uso en la miastenia gravis se inició en 1976³⁰ y desde entonces se han publicado numerosos trabajos sobre su utilización^{31, 230, 231} que ha terminado restringida a dos indicaciones máximas : estabilizar a los pacientes en crisis miasténicas y como mecanismo de preparación de los pacientes para la timectomía evitando la utilización de agentes inmunosupresores que conllevan un no despreciable riesgo de infecciones oportunistas y un retraso en la cicatrización, en especial de la esternotomía, resultando en una pseudoartrosis esternal. Indicaciones menos frecuentes son la miastenia gravis neonatal con títulos altos de anticuerpos²³², y la miastenia adquirida seronegativa²³³.

El mecanismo de acción de la plasmaferesis en la miastenia gravis se basa en la disminución de los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina circulantes mediante la filtración plasmática. Y aunque los títulos de

anticuerpos no se relacionan proporcionalmente con la gravedad de la enfermedad²³⁴ e incluso su medición tiene más relación con el diagnóstico que con el pronóstico, si hay una mejoría tanto clínica como electrofisiológica en los pacientes tratados con esta modalidad. A pesar de esto, también se observa el llamado efecto rebote y la tolerancia, es decir, el paciente muestra un descenso en la magnitud de su mejoría tras varias sesiones de plasmaferesis y además puede presentar los síntomas más graves una vez que el efecto de la plasmaferesis caduca, que es en la mayoría de los pacientes de unas pocas semanas e incluso días. También es importante remarcar que en pacientes seronegativos también puede ser útil, por lo que quizás la técnica de detección de estos anticuerpos no es útil en todos los casos o bien es debido a la presencia de diferentes tipos de anticuerpos.

La pauta clásica consiste en cinco sesiones de intercambio de 3 a 4 litros en cada sesión durante dos semanas. En algunos centros se asocia una nueva sesión al mes y en otros se le asocia alguna otra terapia inmunosupresora coadyuvante.

Las complicaciones que puede presentar la plasmaferesis son relacionadas con la vía de acceso, la infección del catéter, hipotensión, tromboembolismo pulmonar, crisis miasténica por filtración de inhibidores de la colinesterasa circulantes y endocarditis. La mortalidad asociada con esta técnica es del 0,2% y casi siempre es relacionada con la enfermedad de base. Además es un procedimiento costoso.

2.3.4.1- Inmunoglobulinas inespecíficas

Desde hace décadas las inmunoglobulinas inespecíficas endovenosas se han utilizado en diferentes enfermedades autoinmunes como la polineuropatía inflamatoria demielinizante y las miopatías inflamatorias. Su papel en la miastenia gravis es actualmente estudiado en varios centros en comparación con otros medicamentos, especialmente en el tratamiento de las crisis miasténicas y en la preparación preoperatoria de los miasténicos tanto para la timectomía como para otras intervenciones.

Las inmunoglobulinas inespecíficas se componen de cuatro cadenas polipeptídicas unidas por puentes bisulfuro (dos ligeras y dos pesadas). Cada cadena posee una región constante (Fc) y una región variable (Fab).

- a) Cadenas pesadas: alfa (IgA), gamma (IgG), delta (IgD), epsilon (IgE), mu (IgM). Las inmunoglobulinas de membrana tienen una porción más de aminoácidos en el extremo carboxiterminal de las cadenas pesadas que las inmunoglobulinas secretadas (para poder anclarse en la membrana).
- b) Cadenas ligeras: kappa o lambda. Todas las inmunoglobulinas tienen una u otra.
- c) Escisión con papaina: se originan dos fragmentos Fab (se unen al antígeno) y una Fc (da la mayor parte de las propiedades a la inmunoglobulina).
- d) Dominios: regiones globulares con funciones específicas.

Las regiones variables tienen idiotipo (cada uno de los determinantes antigénicos) e idiotipo (todos los determinantes antigénicos de la región variable), así como regiones hipervariables que son segmentos polipeptídicos de la región variable que muestran mayor grado de variabilidad, participan directamente en los sitios de unión al antígeno y se localizan en las cadenas ligeras (tres) y en las cadenas pesadas (cuatro).

La IgG es la principal inmunoglobulina del suero (70-80%). Se distribuye de forma uniforme por el espacio extracelular y difunde muy bien por las membranas (atraviesa la barrera placentaria) y constituye la principal Ig de las secreciones internas (líquido amniótico, cefalorraquídeo, humor acuoso, líquido peritoneal).

Las propiedades de su Fc son fijar el complemento por la vía clásica (no la IgG4), atravesar la barrera placentaria, unirse a la proteína A estafilocócica, a los monocito-macrófago, a los neutrofilos, eosinófilos, plaquetas, linfocitos grandes granulares, linfocitos B y algún linfocito T. La IgG presenta diferentes subtipos: IgG1 (la más frecuente), IgG2 (la que peor pasa la barrera placentaria), IgG3 (la más pesada, la de menor vida media y

no se une a la proteína A estafilocócica), IgG4 (única que no estimula el complemento por la vía clásica y sí por la vía alternativa, no se une a monocito-macrófago pero sí a mastocitos y basófilos).

Desde hace varias décadas se han utilizado las inmunoglobulinas para el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes como la polineuropatía inflamatoria desmielinizante, miopatías inflamatorias, neutropenia autoinmune²³⁵, autoanticuerpos contra el factor VIII²³⁶, enfermedad de Kawasaki²³⁷ y púrpura trombocitopénica idiopática²³⁸. Basados en estos hechos se utilizó la fracción S7 de la inmunoglobulina IgG en casos de miastenia gravis por grupos como el de Genkins²³⁹ en 1976 o el de Gajdos²⁴⁰ en 1984 los cuales trataron pacientes con miastenia gravis tipo III de Osserman observando una buena respuesta al tratamiento y recomendándolo como tratamiento de corta duración en pacientes de alto riesgo.

En la Universidad de Munich, el grupo dirigido por Fateh²⁴¹ comparó el uso de la fracción s7 de la IgG con la 5S en cuatro pacientes con miastenia gravis. Se estudiaron su respuesta clínica, concentraciones de anticuerpo anti-Ach-R, complemento, IgA, IgG e IgM, y concluyeron que la fracción S7 de la IgG, y no la fracción 5S, es útil en los casos de miastenia gravis rebelde a otros tratamientos y que el anticuerpo anti-Ach-R depende de la fracción Fc (fracción constante) de la inmunoglobulina.

El primer autor en describir los posibles mecanismos de acción de la inmunoglobulina en la miastenia gravis fue Devathassan²⁴² al comentar un estudio de Ippoliti²⁴³ sobre siete pacientes en el que demostraba un aumento de los linfocitos T supresores después del tratamiento con inmunoglobulinas. Devathassan propuso que la inmunoglobulina produce un bloqueo competitivo con los anticuerpos circulantes y alternativamente, que la masiva infusión de inmunoglobulinas exógenas podría provocar un efecto de retroalimentación negativo sobre las células plasmáticas responsables de la producción de anticuerpos. Arsurá²⁴⁴ proponía también que la inmunoglobulina puede proteger los receptores de acetilcolina de los anticuerpos al competir con los anticuerpos y desplazarlos de sus sitios de

unión. La inmunoglobulina dentro del tratamiento de la miastenia gravis empezó a usarse en España en 1986²⁴⁵ en casos de crisis miasténicas y como preparación preoperatoria para la timectomía²⁴⁶. Recomendaban entonces este tratamiento a los pacientes con miastenia gravis tipo III para su preparación operatoria y a los pacientes con sintomatología miasténica no controlable con los corticoides y los inmunosupresores.

La primera gran revisión de la experiencia mundial del tratamiento de la miastenia gravis con la inmunoglobulina fue realizada por Edan²⁴⁷ en 1994. En esta revisión de seis publicaciones para un total de 76 pacientes se observó una respuesta positiva del 70 al 100 % de los pacientes, con un promedio total de las series de 79 %, aunque algunos de ellos recibían otra medicación concomitante. Los efectos secundarios que se observaron fueron mínimos y solo ocurrieron en menos del 10% de los enfermos.

Edan remarcaba como ventajas en el uso de inmunoglobulinas el alto porcentaje de éxitos en el tratamiento, la rapidez de aparición de la mejoría, la poca toxicidad tanto a corto como a largo plazo y la posibilidad de reducción de la dosis de corticoides en los pacientes sometidos a este tratamiento. Como características negativas subrayaba el alto coste del tratamiento, el carácter temporal de sus efectos y la posibilidad de transmisión de enfermedades al tratarse de productos derivados de la sangre.

Los efectos adversos descritos de la inmunoglobulina se pueden dividir en tres grupos:

- Reacciones no anafiláticas: Son las más frecuentes, y se presentan hasta en un 4% de los pacientes²⁴⁸. Al iniciar la infusión aparecen generalmente la cefalea, dolor de espalda, náuseas, vómitos y malestar general. Al finalizar la infusión pueden aparecer la fiebre, cefalea, taquicardia, hiper o hipotensión. Otros efectos secundarios que se han descrito en casos aislados son los cuadros tromboembólicos^{249,250}, cuadros meníngeos²⁵¹, neutropenias²⁵², necrosis retiniana²⁵³, nefropatías tubulares²⁵⁴ y alopecias²⁵⁵.

- Reacciones anafiláticas: Son poco frecuentes y se relacionan con la presencia de agregados de inmunoglobulinas que activan el complemento.

Estas complicaciones son raras con los preparados actuales y de presentarse lo hacen en pacientes con déficit de IgA²⁵⁶.

- Transmisión de agentes infecciosos: Con los preparados actuales con el proceso de fraccionamiento de Cohn que reduce la viabilidad de los virus (HAV, HBV, HCV y VIH) es rara la transmisión de enfermedades infecciosas con estos medicamentos.

No existen contraindicaciones absolutas para la administración de inmunoglobulinas, aunque se refiere que en pacientes con déficit de IgA existe un mayor riesgo de reacciones anafilácticas al presentar anticuerpos anti IgA en el 30 % de estos pacientes. Actualmente existen preparados comerciales con poca o nula presencia de esta IgA.

Las inmunoglobulinas actúan como inmunorreguladoras, aunque los mecanismos de acción son todavía desconocidos. Existen varias teorías sobre su forma de actuar y muchas de ellas se basan en los anticuerpos anti-idiotipos (frente al marcador antigénico de la región variable de las Ig). Estos anticuerpos anti-idiotipos son presentes en los preparados comerciales de inmunoglobulinas y como se sabe actúan de tres maneras: neutralizando los anticuerpos, aumentando la producción de linfocinas y disminuyendo la producción de anticuerpos²⁵⁷. Los pacientes miasténicos tratados con inmunoglobulinas presentan mejoría entre 70 y 90 % de los casos, sin embargo solo se demuestra una disminución del título de anticuerpos en un 50 % de los pacientes y su eficacia no se relaciona con el nivel de éstos²⁵⁸. De hecho los niveles de anticuerpos descienden tardíamente con respecto a la mejoría sintomática. Para explicar la respuesta precoz se ha comprobado que existen otros efectos con las inmunoglobulinas endovenosas, como una disminución de la afinidad de los anticuerpos anti Ach-R también mediada por anticuerpos anti-idiotipos²⁵⁹. Los efectos a largo plazo también se han relacionado con la aparición de subpoblaciones de linfocitos específicos tanto agresores naturales (*natural killer*) como cooperadores (*helper*).

Blaczyk²⁶⁰ observó diferencias entre los resultados clínicos según las diferentes marcas comerciales, lo que hizo suponer que podía existir otra

causa de la mejoría de los pacientes con miastenia. Ante estas observaciones analizó el contenido de CD4, CD8, HLA-I y HLA-II solubles en las distintas preparaciones y concluyó que cuanto mayor era el contenido de estos factores moduladores, mayor era el efecto terapéutico. Lam también llega a las mismas conclusiones en su estudio²⁶¹. Sobre estos estudios se han realizado estudios para valorar la eficacia con anticuerpos monoclonales CD4.

Al tercer o cuarto día después de iniciar el tratamiento se observa una mejoría de los síntomas, que es máxima a partir de la semana y que dura varios meses (entre cinco y nueve). Las ventajas que se han observado con su uso son varias : la aparición de la mejoría es más rápida que con los corticoides, por lo que permite su reducción así como la de los inmunosupresores, su duración es similar a la de otras formas de tratamiento, su facilidad de administración (tras dilución del material liofilizado en suero fisiológico y por una vía periférica) puede combinarse con otros tratamientos y además carece de efectos secundarios importantes a las dosis que se utiliza (400 mg./Kg./día durante cinco días) tanto para el tratamiento de las crisis como para la preparación preoperatorio.

**- Inmunoterapia en desarrollo para tratamiento de la miastenia gravis:
(Globulinas anti-linfocitos y anti-timocitos).**

Actualmente se están estudiando un gran número de tratamientos dirigidos contra los linfocitos tanto B como T, en busca de alterar la miastenia gravis desde sus bases inmunopatogénicas. El grupo de Pirofsky²⁶² ya describe mejoría de un grupo de diez pacientes con miastenia gravis severa (IIb, III y IV) después de la administración de globulina anti-linfocítica (ALG) tanto endovenosa como intramuscular, con un efecto de duración entre 36 y 71 meses. Leovey también muestra esta mejoría con la administración de ATG y de globulina anti-linfocítica (ALG) en un grupo de diez pacientes²⁶³. En ambos trabajos se postuló que el mecanismo de acción de estas globulinas podría ser la inhibición de los linfocitos T helper o la estimulación de los T supresores, con lo cual resultaría una supresión de

la síntesis de anticuerpos por los linfocitos B o una disfunción directa de éstos.

También se ha tratado de utilizar la administración de antígeno de receptor de acetilcolina oral en modelos experimentales animales para inducir la tolerancia inmune ²⁶⁴ consiguiendo buenos resultados y concluyendo que su utilización en la miastenia gravis experimental es efectiva y que podría ser eficaz en la miastenia gravis. Otra línea de tratamiento es la administración de anticuerpo monoclonal anti CD4 (cMT412)²⁶⁵.

Otras técnicas como el antígeno unido a toxinas o a I¹²⁵, utilizadas tanto in Vitro como en modelos experimentales, han formado compuestos letales con moléculas inmunotóxicas que pueden precipitar también en los pulmones, hígado o riñones, con el riesgo gravísimo de efectos tóxicos secundarios importantes.

2.4- Tacrolimus (FK-506)

2.4.1- Evolución Histórica de su descubrimiento y desarrollo

El interés de la industria farmacéutica por los efectos de los metabolitos microbianos sobre el sistema inmunológico no se despertó de una forma activa hasta la década de los 80, el inicio fue el descubrimiento de la ciclosporina, antibiótico antifúngico con potente capacidad inmunosupresora que revolucionó muy positivamente los resultados clínicos en trasplantes de órganos.

Actualmente se conocen más de cien sustancias inmunomoduladores de origen microbiano entre ellas destaca el tacrolimus, que fue el resultado de un largo proceso de búsqueda sobre muchas sustancias de origen natural.

El tacrolimus está producido por el *Streptomyces Tsukubaensis*, un hongo aislado del suelo de la región Tsukuba (Japón) y ha demostrado ser un inmunosupresor muy potente²⁶⁶.

En abril de 1983 la compañía farmacéutica Fujisawa (Astellas Pharma) amplió su área de investigación de forma sustancial instalando en la población de Tsukuba, conocida como la ciudad de la ciencia del Japón unos laboratorios de investigación nuevos y excelentemente equipados, la actividad llevada a cabo en este centro permitió a Fujisawa explorar por primera vez el campo de los inmunosupresores y descubrir en marzo de 1984 un potente inmunosupresor (producido por un caldo de cultivo, una cepa de un actinomiceto concretamente el número 9993 y se designó según el código FK-506^{266, 267, 268} y más recientemente, en 1992, con el nombre de tacrolimus. Las primeras publicaciones en la literatura sobre tacrolimus es en 1987^{266, 268, 269}, como un potente inmunosupresor que actúa in Vitro inhibiendo la producción de la interleukina-2(IL-2) y la respuesta del cultivo linfocitario mixto (CLM) con concentraciones de 32 a 100 veces inferiores a las de la ciclosporina²⁶⁸.

Los amplios ensayos clínicos empezaron en 1989 en el trasplante hepático destinados en principio para tratar pacientes con rechazo hepático crónico o con severos efectos adversos de la ciclosporina. Evaluaciones más amplias del tacrolimus en diferentes trasplantes de órganos fueron llevados a cabo en estudios o ensayos controlados prospectivos y multicentricos en Europa y en Norte América^{270, 271, 272, 273}.

Posteriormente estudios comparando tacrolimus con la ciclosporina en pacientes tanto pediátricos como adultos transplantados (hígado, riñón, corazón), describen que en el grupo de tacrolimus hay menos episodios de rechazo tanto agudo como crónico, consiguiendo reducir de manera importante la dosis de corticoides^{273, 274}. Este último dato es particularmente importante en trasplantes pediátricos²⁷².

La mayoría de los efectos adversos del tacrolimus está relacionada con su concentración^{272, 273} que incluye neurotoxicidad, deterioro del metabolismo de glucosa, hipertensión, alteraciones gastrointestinales,

hipercaliemia, infecciones y enfermedades linfoproliferativas (particularmente observado en pacientes pediátricos^{272, 275} atribuido a una elevada inmunosupresión).

Debido a la incidencia de estos efectos adversos es justificado el uso monitorizado de dicha droga. El tratamiento con tacrolimus produce menos hirsutismo, hiperplasia gingival, disfunción neurológica y hiperlipidemia que la ciclosporina^{272, 273, 274}.

Ambos, ciclosporina y tacrolimus comparten un importante modo de acción, inhibir la interleuquina-2(IL-2) bloqueando la activación de los linfocitos-T^{276, 277}.

En la tabla siguiente, se detalla la evolución histórica de la producción del Tacrolimus (FK 506).^{278, 279}

1983 - Búsqueda de un inmunosupresor específico a partir de un caldo de cultivo del hongo streptomyces.

1984 - Descubrimiento del inmunosupresor FR 900506 (FK 506) en Tsukuba, (Japón).

1985 - Primeras experiencias con FK 506 " in Vitro" y en trasplante experimental (piel, corazón y riñón).

1986 - Primera comunicación científica en "11th" International Congress of the Transplantation Society "en Helsinki".

1987 - Primer simposium sobre el efecto inmunosupresor del FK (506) en Gotemburgo (Suecia). Congreso de la Sociedad Europea de Trasplantes.

1989 - Primeros ensayos clínicos en la universidad Pittsburg bajo la dirección del Prof. Thomas Starzl en el mes de marzo²⁸⁰.

1989 - Congreso de la Sociedad Europea del Trasplante de Órganos, en Barcelona en el mes de Octubre, presentación primeros resultados de tratamientos con FK (506). Prof. Starzl²⁸¹.

1991 - Primer Simposio Internacional sobre FK 506 de Pittsburg, presentación de los resultados de los primeros estudios^{282, 283}.

1992 - FK-506 recibe un nuevo nombre "**TACROLIMUS**". Aprobación para uso clínico en Japón (1993), USA y Reino Unido (1994) y Alemania (1995).

Tabla 6: Evolución histórica de la producción del Tacrolimus (FK 506).

2.4.2- Estructura química y propiedades

El tacrolimus es un macrólido constituido por un anillo lactónico de 23 átomos de carbono. Su peso molecular es de 822,05 daltons y su fórmula molecular es $C_{44}H_{69}NO_{12}H_2O$. Su punto de fusión es de 127-129°C.

Es soluble en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo y dietil éter y es insoluble en agua y hexano^{266, 284, 285}. Debido a ello, para su absorción oral se ha desarrollado una fórmula de dispersión sólida en hidroxipropil-metil-celulosa, que es un polímero hidrosoluble. Es estable a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo como polvo cristalino blanco siendo menos estable en solución. La concentración de FK506 en sangre o plasma mantenida a temperatura ambiente tiende a disminuir de un 10- 30% después de una semana²⁸⁶.

2.4.3- Mecanismo de acción y actividad inmunosupresora

Las propiedades inmunosupresoras de tacrolimus son notablemente similares a la de la ciclosporina, a pesar de que las estructuras moleculares de ambos fármacos son notablemente diferentes (FK506 es un macrólido y la ciclosporina es un polipéptido cíclico).

Los resultados obtenidos por los estudios realizados por Kino^{266, 267} y Thomson²⁸⁷ indicaban que tacrolimus, al administrarse al inicio del cultivo de células, podría suprimir la reactividad linfocitaria mixta y la generación de células T citotóxicas a concentraciones cien veces inferiores a las requeridas en el caso de la ciclosporina. La inhibición de la respuesta proliferativa de las células T es muy potente (de treinta a cien veces superior a la de la ciclosporina)^{266, 288}.

Ambos inmunosupresores actúan al inicio del proceso de activación de las células T y producen un bloqueo de la síntesis de diversas citoquinas, entre ellas la interleuquina-2 (IL-2), linfocina que desempeña un papel importante en la respuesta inmune, ya que interviene en el crecimiento y proliferación de los linfocitos. Debido a que estos fármacos actúan en la

primera etapa del proceso de transcripción de los genes para las linfocinas, su efecto antiproliferativo es sólo patente cuando son administrados durante las primeras horas en las que se produce la activación de las células T²⁸⁹.

Se ha demostrado un efecto inhibitorio dosis-dependiente de FK506 sobre la síntesis de diversas linfocinas (IL-2, IL3, IL4 e interferón gamma), y la expresión de los receptores para la IL-2 en las células T activadas.

Este fármaco inhibe la expresión de los receptores para la IL-2 en los linfocitos colaboradores (CD4+) y, más marcadamente en los linfocitos T citotóxicos (CD8+). El tacrolimus no inhibe la proliferación secundaria de las células T activadas en respuesta a la IL-2.

Tanto el tacrolimus como la ciclosporina solamente pueden actuar cuando están unidos a unos receptores intracelulares citoplasmáticos, o en proteínas ligantes conocidas como inmunofilinas, a las que se unen con gran afinidad²⁹⁰. El complejo fármaco-inmunofilina es la parte activa que interacciona con las moléculas intracelulares implicadas en la señal de transducción.

El objetivo de este complejo fármaco-inmunofilina es pues, la proteína calcineurina, que recibe este nombre por su abundancia en el tejido nervioso²⁹¹, proteína con actividad fosfatasa calcio y calmodulina dependiente, y que es mediadora de la acción inmunosupresora de ambos fármacos.

Así pues, en el caso de la ciclosporina, ésta se une a una proteína (inmunofilina) citoplasmática denominada ciclofilina mientras que tacrolimus se une a una inmunofilina citosólica llamada " FK-506 *binding-protein*-12 (FKBP12)²⁷⁷ la cual al igual que la ciclofilina y probablemente otras inmunofilinas pueden tener un destacado papel en la señal de transducción de todas las células eucariotas.

Los resultados obtenidos en los estudios más recientes sugieren que ciclosporina y tacrolimus actúan como " una molecular glue", llevando juntas a dos proteínas que normalmente no interactúan entre ellas: las inmunofilinas (ciclofilina, FKBP) y la calcineurina, proteína con actividad fosfatasa que cataliza la reacción de defosforilación de la serina y la

treonina. La calmodulina proteína calcio dependiente, incrementa la afinidad de unión entre la calcineurina y el fármaco unido a la inmunofilina.

La actividad fosfatasa de la calcineurina queda inhibida cuando se une el complejo fármaco-inmunofilina. Esta inhibición de la actividad fosfatasa de la calcineurina impide la defosforilación del componente citoplasmático del factor de transcripción de las células T (NF-Atc), defosforilación que parece ser imprescindible para que tenga lugar su translocación hacia el núcleo²⁹². La translocación nuclear de la subunidad citoplasmática, y su subsiguiente combinación con el componente nuclear, es provocada por un incremento del calcio intracelular²⁹³. Una vez unidas las dos subunidades (la citoplasmática y la nuclear) se inicia la primera fase de activación de las células T.

En resumen, el tacrolimus muestra una acción inmunosupresora similar pero más potente que la de la ciclosporina inhibiendo las respuestas inmunes humoral y celular, en concreto y de forma selectiva actúa sobre las células T a través de su interacción con una inmunofilina citoplasmática específica (FKBP-12), tacrolimus inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina (calcio dependiente). Como consecuencia de este bloqueo, no se lleva a cabo la translocación del factor de transcripción citoplasmático (NF-Atc) al núcleo de la célula T, y por lo tanto, se produce un bloqueo de transcripción del DNA y de la inhibición de la actividad de la RNA polimerasa que interviene en la síntesis de IL-2 (linfocina que desempeña un papel esencial en la proliferación de las células T citotóxicas), de otras linfocinas (IL-3, IL-4, IL-5) y del interferón gamma.

2.4.4- Farmacocinética y Farmacodinámica

2.4.4.1- Absorción

El tacrolimus es un compuesto hidrofóbico que presenta una baja solubilidad en soluciones acuosas, por lo que se absorbería con dificultad desde el tracto gastrointestinal. FK 506 está disponible tanto en preparación parenteral como enteral y por tanto puede ser utilizado por vía oral como

endovenosa. La absorción de tacrolimus de una administración oral es muy variable siendo los principales sitios de absorción el yeyuno y el duodeno. La bilis no es esencial en el proceso de absorción. En la mayoría de las situaciones clínicas puede iniciarse el tratamiento por vía oral (dosis de 0.1 a 0.2 mg/kg/día). La absorción del tacrolimus presenta una elevada variabilidad interindividual. Después de su administración por vía oral en algunos pacientes se absorbe rápidamente, alcanzando la concentración máxima en plasma en 30 minutos, mientras que en otros pacientes se requiere más tiempo para su absorción, dando lugar a un perfil de absorción más plano. La biodisponibilidad media de tacrolimus por vía oral es aproximadamente de un 20% (entre un 6 y 43%) en pacientes adultos transplantados renales o hepáticos. En pacientes transplantados pediátricos la biodisponibilidad por vía oral es de un 25% (entre el 3 y el 77%). Esta elevada variabilidad entre pacientes justifica la necesidad de ajuste individualizado de dosis según las concentraciones pre-dosis de tacrolimus en sangre²⁷⁹.

La presencia de alimentos puede disminuir su absorción, por lo que es aconsejable administrar el fármaco de media hora a una hora antes o dos horas después de la ingesta de alimentos. En cualquier caso, sería muy conveniente que el paciente adquiriera su hábito y tome el fármaco antes o después de las comidas pero debe de hacerlo siempre de la misma forma, para evitar grandes variaciones para su absorción.

2.4.4.2- Distribución

El tacrolimus es altamente liposoluble y se distribuye extensamente en los tejidos²⁹⁴. En el plasma el tacrolimus se une principalmente a proteínas plasmáticas (98%), principalmente a la albúmina y a la alfa-glicoproteína²⁹⁵,²⁹⁶. La fracción libre de medicamento (la farmacológicamente activa) puede variar considerablemente sin que se afecte la concentración total de tacrolimus en sangre. La fracción libre del fármaco viene determinada por la concentración total del fármaco en sangre, por el valor del hematocrito, por

la concentración de proteínas plasmática y por supuesto, por las interacciones medicamentosas. Durante el proceso de distribución el tacrolimus presenta una elevada unión a los eritrocitos, dando lugar a una ratio de distribución de concentraciones en sangre total/plasma de 20:1, aproximadamente²⁹⁷.

2.4.4.3- Eliminación

En individuos sanos el aclaramiento de tacrolimus es de unos 2,2lit./ hora lo que indica su baja extracción hepática. Su vida media de eliminación oscila entre 5.5 a 16.6 horas, (media 8.7 horas)²⁹⁴. Este bajo aclaramiento y la amplia distribución del fármaco en los tejidos explican que los cambios de la dosis tardan unos días en alcanzar de nuevo el estado de equilibrio estacionario.

El tacrolimus se elimina preferentemente por vía biliar. Alteraciones graves de la función hepática da lugar a una marcada disminución del aclaramiento del fármaco y pueden favorecer la aparición de efectos adversos. Por ello, en estas situaciones es recomendable una estrecha monitorización de las concentraciones de tacrolimus, para poder realizar el ajuste de dosis más óptimas.

2.4.4.4- Metabolismo

En humanos el metabolismo hepático del tacrolimus es muy activo (menos del 1% del principio activo se excreta inalterada por bilis y orina) y es catalizado por enzimas del citocromo p450 (subtipos Ia y IIIa^{298, 299}), utilizando como principales vías metabólicas las reacciones de desmetilación e hidroxilación^{300, 301}. El tacrolimus también es metabolizado a nivel del intestino delgado por acción del isoenzima p450 3A4 (el principal responsable de su metabolismo a nivel hepático), que juega un papel decisivo en la biodisponibilidad del medicamento.

Como resultado de este activo metabolismo se han identificado 8 metabolitos, de los cuales únicamente el M-II (31-o-desmetil tacrolimus) presenta una actividad inmunosupresora in Vitro similar a la del fármaco principio activo. En el caso del tacrolimus, y a diferencia de lo que ocurre con ciclosporina A los metabolitos presentan una escasa concentración en la circulación sistémica.

Hasta el momento no disponemos de suficientes datos para establecer la posible acción inmunosupresora y /o tóxica de los metabolitos aislados e identificados por incubación de microsomas hepáticos humanos^{311, 302}.

La alteración de la función hepática está asociada con concentraciones elevadas de tacrolimus en sangre. Ello se debe a la prolongación de la vida media de eliminación del fármaco como consecuencia de la reducción del aclaramiento plasmático^{303, 304}. De hecho las concentraciones plasmáticas de tacrolimus se correlacionan directamente con los niveles séricos de bilirrubina, sugiriendo que la disfunción hepática altera el metabolismo del tacrolimus³⁰⁵.

Las concentraciones plasmáticas de tacrolimus no presentan una buena correlación con las dosis orales administradas^{294, 306}. De manera similar a la ciclosporina, el perfil farmacocinético del tacrolimus muestra una considerable variación interindividual. En diversos estudios clínicos realizados se puede observar una amplia variedad en los regímenes de dosificación de este fármaco, seleccionados para cada paciente con la ayuda de la monitorización de los niveles en sangre total. De esta manera, se asegura una terapia racionalizada individual que permite obtener el máximo efecto terapéutico con un mínimo de efectos secundarios y en el mínimo tiempo posible.

2.4.5- Interacciones farmacológicas

Es bien conocido que el metabolismo del tacrolimus, a nivel gastrointestinal y hepático, es susceptible a la acción de otros fármacos inhibidores o inductores de los sistemas enzimáticos CYP3A y CYP1A

subtipos del sistema citocromo P450 (CYP450)²⁹⁹. Los fármacos que actúan como inhibidores aumentan la biodisponibilidad y la vida media de eliminación del tacrolimus, lo que conlleva un incremento de las concentraciones del inmunosupresor en sangre, favoreciendo así la aparición de efectos adversos. Por el contrario, los medicamentos que inducen el metabolismo de tacrolimus disminuyen su biodisponibilidad así como su vida media, dando lugar a una disminución significativa de las concentraciones en sangre y por tanto reduciendo los efectos inmunosupresor del tacrolimus.

2.4.5.1- Interacciones farmacocinéticas

Drogas que incrementan los niveles de FK506

En la práctica clínica, cuando los pacientes están tratados con medicamentos que interfieren en la farmacocinética del tacrolimus, las concentraciones totales de este último deben monitorizarse estrechamente con el fin de realizar una terapia individualizada y obtener un resultado inmunosupresor óptimo con un mínimo de efectos adversos.

Se han observado concentraciones elevadas de tacrolimus en pacientes transplantados que han recibido de forma concomitante inhibidores de la enzima CYP4503A4 como por ejemplo la eritromicina³⁰⁷, fluconazol³⁰⁸,³⁰⁹, clotrimazol³¹⁰ y danazol³¹¹.

En el caso del clotrimazol, los investigadores han especulado sobre la posibilidad de que estos fármacos compita con el FK506 por los lugares de unión a receptores del sistema enzimático CYP450 en el intestino delgado, dando lugar como consecuencia a una disminución del metabolismo en la mucosa intestinal e incrementando la biodisponibilidad del tacrolimus. Se han publicado asimismo, resultados contradictorios en cuanto a la interacción del tacrolimus y la metil prednisolona³¹². Debido a que el tacrolimus es también metabolizado por el sistema enzimático CYP1A, y es posible que pueda presentar algunas interacciones particulares con compuestos que no interaccionan con la ciclosporina.

Drogas que disminuyen los niveles de FK506

Una diferencia fundamental entre el perfil farmacocinético de la ciclosporina y del tacrolimus es que la absorción de este último no depende de la presencia de bilis³¹³. De este modo, a diferencia de la ciclosporina, agentes que pueden alterar la secreción de bilis y/o la unión a sales biliares, como el probucol³¹⁴, colestiramina³¹⁵, y octreotido³¹⁶, no deberían interactuar con el tacrolimus y disminuir su absorción. Un estudio "in Vitro" ha sugerido que los antiácidos que contienen geles de óxido de magnesio e hidróxido de aluminio dificultan la absorción del tacrolimus³¹⁷; sin embargo, este hecho no ha sido confirmado en la clínica.

Se supone aunque no está todavía confirmado, con la excepción de la rifampicina³¹⁸, que otros inductores enzimáticos como la fenitoina, fenobarbital y carbamazepina inducirían el metabolismo de tacrolimus produciendo en consecuencia una disminución de sus niveles.

Estudios "in Vitro" e "in Vivo" de la farmacocinética del tacrolimus

Estudios de laboratorio han confirmado que la farmacocinética del tacrolimus es susceptible a la inhibición e inducción enzimática³¹⁹. La elevación de la concentración de tacrolimus han sido demostradas en ratas con inhibidores enzimáticos tales como la eritromicina, ketoconazol, diltiazem, fluconazol y cimetidina³²⁰.

Principales fármacos inductores o inhibidores del citocromo P450 que pueden alterar el perfil farmacocinético y las concentraciones del tacrolimus en sangre de los pacientes tratados.

Inductores de Citocromo P4503A4.

Los inductores de citocromo P4503A4 aumentan el metabolismo de FK-506, por lo que hay una serie de drogas que disminuyen las concentraciones de FK-506 en sangre como: La rifampicina, el fenobarbital, la fenitoina, la carbamazepina y los glucocorticoides.

Inhibidores de Citocromo P4503A4.

Los inhibidores de citocromo P4503A4 disminuyen el metabolismo de FK-506 y aumentan las concentraciones de FK-506 en sangre como: la eritromicina, el ketoconazol, el flucoazol, el itraconazol, el clotrimazol, la cimetidina, el danazol, el diltiazem, el verapamilo, la nifedipina y la nifedipina.

Alteraciones inducidas por FK-506 en el metabolismo de otras drogas.

El tacrolimus puede también inhibir la oxidación de otros fármacos que son sustrato del sistema enzimático CYP4503A4, como por ejemplo la troleandromicina, eritromicina, midazolam, nifedipina, etinilestradiol, diltiazem, cortisol y progesterona³²¹. La acción inhibitoria del tacrolimus puede estar relacionada con su fuerte afinidad por las zonas activas del sistema CYPA4503A4, ya que parece ser el más potente de todos los macrólidos probados hasta el momento³²¹.

También se ha comprobado que el tacrolimus inhibe el metabolismo de la ciclosporina y produce un incremento de la concentración de esta droga en el hombre²⁹³, si bien no parece tener consecuencias en alteraciones del aclaramiento de la ciclosporina³¹³. Estudios en perros sugieren que el tacrolimus puede inhibir el metabolismo intestinal de la ciclosporina, teniendo como resultado una absorción elevada y la correspondiente elevación de la concentración de esta droga³²². El uso combinado de estos dos fármacos produce un efecto inmunosupresor sinérgico³²³ y un aumento de la nefrotoxicidad³²⁴.

Por su estructura química de macrólido, el tacrolimus podría producir alteraciones farmacocinéticas en drogas susceptibles de interactuar con la eritromicina como son la teofilina, terfenadina y ciclosporina^{325, 326}. La cimetidina, inhibidor del metabolismo de estos compuestos a través del sistema enzimático CYPA510A, podría también alterar el metabolismo del tacrolimus^{327, 328}.

2.4.5.2- Interacciones farmacodinámicas

Después de que diversos estudios clínicos han demostrado que la incidencia de nefrotoxicidad es aproximadamente equivalente tanto por el uso de tacrolimus como con el uso de ciclosporina³²⁹, ³³⁰, es de esperar un efecto similar con la administración concomitante de tacrolimus y otros agentes nefrotóxicos (como por ejemplo, aminoglicósidos, anfotericina B, cisplatino). Se ha descrito una nefrotoxicidad sobreañadida con el tratamiento combinado de tacrolimus e ibuprofeno³³¹, tacrolimus y ciclosporina³³². Por tanto, será importante que aquellos pacientes que reciben tratamientos combinados con sustancias nefrotóxicas o neurotóxicas estén controlados muy estrechamente (tabla 7).

En resumen y basándonos en los datos actualmente disponibles, sabemos que la farmacocinética de tacrolimus es susceptible a la inhibición e inducción del sistema enzimático CYP450. Debido a su metabolismo a través de los isoenzimas CYP3A²⁹⁷, ³³³ fármacos conocidos que interactúan con la ciclosporina y la eritromicina deberían ser considerados con capacidad potencial de interactuar con FK506.

Aumento de la nefrotoxicidad: - Aminoglucósidos
- Anfotericina B
- Cisplatino
- Ciclosporina
- Ibuprofeno
Hiperpotasemia: Diuréticos ahorradores de K+
Aumento de la neurotoxicidad: - Aciclovir, Ganciclovir
- Imipenem, Quinolonas.

Tabla 7. Interacciones farmacodinámicas de Tacrolimus(FK506)

2.4.6- Monitorización de niveles de Tacrolimus (FK506).

La experiencia clínica con FK506, ha demostrado la enorme variabilidad farmacocinética, tanto intra como interindividual, que este fármaco presenta después de su administración. Los factores predominantes de los que depende esta variabilidad son: la absorción, la función hepática y los tratamientos concomitantes con fármacos que pueden interferir en el metabolismo. En consecuencia, no existe una buena correlación entre las dosis administradas y el efecto esperado. La monitorización de los niveles sanguíneos del fármaco es fundamental para poder aplicar un tratamiento individualizado y así conseguir la mayor eficacia terapéutica evitando al mismo tiempo la aparición de efectos adversos en el paciente.

El tacrolimus se distribuye en sangre de forma desigual. Una parte importante de FK506 se encuentra en los hematíes. En plasma va unido en su mayor parte a proteínas quedando una pequeña fracción libre que es la farmacológicamente activa. Esta unión de tacrolimus a los hematíes se ve alterada en función de la temperatura. Cuando la muestra de sangre es centrifugada a 37°C la concentración de FK506 en plasma es mayor que cuando tal centrifugación de FK506 en plasma es mayor que cuando tal centrifugación se lleva a cabo a 24°C²⁶. Este hecho debe tenerse en cuenta a la hora del procesamiento de las muestras y representa un problema de difícil manejo. Otro factor que altera la concentración de FK506 en plasma es el hematocrito. Cuando el hematocrito es alto, las concentraciones en plasma son menores³³⁴.

Las muestras deben ser recogidas con anticoagulante, preferentemente EDTA, que minimiza los problemas derivados de la formación de coágulos.

La sangre total se ha convertido en el medio aconsejable para la monitorización del tacrolimus con el fin de minimizar la variabilidad debida a los factores anteriormente mencionados. Por otra parte, las mayores concentraciones adquiridas reducen los problemas de sensibilidad de la técnica. Esta nueva forma de procesamiento se ha apoyado en la experiencia

previa con la monitorización de la ciclosporina en sangre total²⁹⁶. El FK506 fue inicialmente medido en plasma, pero trabajos recientes han mostrado que existe poca correlación entre las concentraciones plasmáticas y la clínica³³⁵. Otros trabajos concluyen que la monitorización de la actividad de la calcineurina fosfatasa³³⁶ para el tratamiento es superior de la monitorización de los niveles en sangre.

Se acepta que el mejor momento para la extracción de la muestra es justo antes de la administración de la dosis matinal del fármaco una vez el fármaco se ha absorbido y distribuido en su totalidad. En aquellos pacientes que reciben tacrolimus por vía endovenosa en infusión continua, las muestras deberían ser tomadas durante infusión, con la precaución de no realizar la extracción en la misma vía por la que el fármaco es administrado.

La determinación de FK506 puede realizarse por métodos específicos y inespecíficos. Se han descrito métodos específicos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de espectrometría de masas (HPLC-MS), que permita separar principio activo y sus diferentes metabolitos³³⁷. Por otra parte, esta metodología requiere una extensa preparación previa de la muestra y un personal altamente especializado, resultando difícil de realizar en la rutina analítica en la mayoría de los laboratorios.

De los métodos inespecíficos disponemos de dos técnicas de radioinmunoensayos, el método MEIA³³⁸ (Microparticle Enzyme Immunoassay) y el ELISA³³⁹ (EnzymeLinked Immunosorbent Assay), ambos utilizan el mismo anticuerpo monoclonal no específico de ratón anti-FK506 desarrollado por la compañía farmacéutica Fujisawa y que detecta indistintamente y conjuntamente FK506 y sus metabolitos. Por su fácil manejo y la rapidez del tiempo de análisis, el método MEIA es el más comúnmente utilizado. Hasta el momento, se desconoce la actividad terapéutica y/o tóxica de los metabolitos de FK506. A medida que se avance en el comportamiento de estos metabolitos, la aplicabilidad de un u otro método estará más justificada. Aunque el intervalo terapéutico no está

plenamente definido, se acepta en sangre total una concentración de 5 a 20 ng/mL³⁴⁰.

Matriz biológica:

- Sangre total (anticoagulante de elección EDTA).

Tiempo de muestreo:

- Predosis matinal (doce horas después de la dosis nocturna)

Método analítico:

- HPLC-MS: Método de referencia específico. No se produce reacción cruzada con los metabolitos.

-ELISA/MEIA: Inmunoensayos que utilizan anticuerpo monoclonal no específico. Los más utilizados en la práctica clínica.

Frecuencia de monitorización en nuestros estudios.

- 3, 7, 15 días
- 1, 2, 3, 6, 9, 12 meses
- trimestralmente
- visita final.

Margen terapéutico del tacrolimus en nuestros estudios.

- 7-8 ng/mL en sangre (EMIT 2000, Dade Behring, Milton Keynes, UK)

Tabla 8. Monitorización del Tacrolimus en pacientes con MG

2.4.7- Dosis y administración

Las pautas de tratamiento con tacrolimus son distintas, dependiendo si es administrada después de la realización del trasplante de órganos ya sea hepático o renal o para tratar un paciente miasténico.

En nuestros estudios la dosis inicial indicada en la miastenia gravis es de 0.1mg/kg./día repartida en dos tomas por vía oral 1/2 hora antes de desayuno y cena y ajustando la dosis para conseguir una concentración

plasmática de tacrolimus entre 7-8ng/mL, posteriormente esta dosis se va reduciendo de manera progresiva en función de la mejoría clínica hasta poder retirar la medicación en algunos pacientes.

2.4.8- Toxicidad

El objetivo a conseguir al tratar la miastenia es una franja terapéutica entre 7-8ng/mL de concentración plasmática, con una inmunosupresión eficaz. La interpretación del perfil de tolerabilidad del FK506 resulta difícil debido a la gran variedad de dosificación que se ha utilizado en la investigación clínica en el manejo de los pacientes transplantados, de hecho, los propios efectos adversos han sido la clave para entender y aprender mejor el manejo y el ajuste de la dosificación de este fármaco. En general, la toxicidad se reduce cuando disminuimos la dosis, aunque se han descrito algunas reacciones, como el desarrollo de disartria, que según algunos autores³⁴¹ podrían ser de carácter idiosincrásico o deberse a una causa multifactorial y por lo tanto, no responder a tales medidas.

El perfil de tolerabilidad se presenta similar tanto para pacientes adultos como pediátricos^{342, 343}. Sin embargo, uno de los beneficios importantes de FK506 con respecto a la ciclosporina es la ausencia de hirsutismo i hiperplasia gingival, clásicamente descritos con la administración de este último. Esto es especialmente importante en el tratamiento de pacientes pediátricos³⁴⁴.

2.4.8.1- Nefrotoxicidad

Al igual que ciclosporina, FK506 presenta una notable toxicidad. De hecho, la presentación clínica y la morfología de los cambios nefrotóxicos inducidos por FK506 son idénticas a la de la ciclosporina³²⁴, además los estudios clínicos muestran que la incidencia de la nefrotoxicidad de estas dos drogas es aproximadamente equivalente³²⁴.

La nefrotoxicidad va íntimamente relacionada con la mayor o menor concentración de tacrolimus en sangre, disminuyendo ésta cuando se reduce la dosis del fármaco. Así en un importante estudio randomizado³⁴⁵, entre pacientes tratados con tacrolimus tras el transplante (n=182) y ciclosporina se observó que la nefrotoxicidad que requirió la retirada del fármaco ocurrió con la misma frecuencia en los dos grupos (2%).

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que el FK506 disminuye la tasa de filtración glomerular y el flujo renal incrementa la resistencia vascular renal³⁴⁶. La nefrotoxicidad se ha correlacionado con un incremento en la producción de tromboxano A2 en el parénquima renal junto con vasoconstricción, hechos que probablemente contribuyen al descenso del flujo sanguíneo glomerular y la hiperplasia yuxttaglomerular³⁴⁷.

En dos estudios multicéntricos randomizados realizados en EEUU y Europa para comparar la eficacia y seguridad del FK506 vs ciclosporina parecen coincidir en el hecho de que los pacientes que recibieron tacrolimus presentan una mayor incidencia de nefrotoxicidad si bien no hubo diferencias importantes en cuanto la tasa media de filtración glomerular y la concentración media de creatinina sérica²⁷⁰. En estos estudios se asocia la nefrotoxicidad de forma evidente con las dosis altas de tacrolimus, disminuyendo tal efecto mediante una reducción de la dosis.

2.4.8.2- Efecto diabetogénico

El tacrolimus puede alterar el metabolismo de la glucosa ya que disminuye la liberación de insulina como respuesta a la hiperglicemia y prolonga el aclaramiento de la glucosa^{348, 349}. En estudios clínicos realizados en pacientes que recibían tacrolimus, se observó una elevada incidencia de diabetes que precisó de la administración de insulina en un 12% de los pacientes con transplante hepático y en un 10% de los pacientes con transplantes de corazón y riñón³⁴¹.

Un estudio randomizado reducido llevado a cabo por Fung en 1991³⁵⁰ no encontró diferencias en la incidencia de pacientes afectados de diabetes insulino-dependiente según hubiesen sido tratados con tacrolimus o ciclosporina, de manera que a los tres meses postrasplante el 17% de los pacientes con tacrolimus y el 17,5% de los pacientes con ciclosporina requerían insulina.

En otro estudio randomizado llevado a cabo entre pacientes pediátricos, la incidencia de hiperglicemia también fue similar con el tratamiento de cualquiera de las dos drogas³⁵¹. Sin embargo, aparece que la incidencia de diabetes de nuevo entre receptores tratados con tacrolimus es inferior para los pacientes pediátricos comparados con la población adulta.

Los datos más recientes extraídos de los grandes estudios multicéntricos de trasplante de órganos, coinciden en atribuir al tacrolimus una mayor incidencia de diabetes mellitus, si bien esta incidencia disminuyó de forma significativa cuando las dosis del fármaco fueron reducidas^{269, 270}.

El mayor y potencial efecto diabetogénico de tacrolimus podría verse compensado por la supresión del tratamiento corticoideo, a medio o largo plazo, hecho que se ha constatado de forma más frecuente para los pacientes tratados con tacrolimus que para los pacientes tratados con ciclosporina^{269, 270}.

2.4.8.3- Neurotoxicidad

El mecanismo específico a través del cual el tacrolimus ejerce su acción neurotóxica no es conocido, pero existe la evidencia de que la administración intravenosa, así como las concentraciones elevadas del inmunosupresor favorecen el desarrollo de neurotoxicidad²⁶⁹.

Estos han sido clasificados según su gravedad neurotoxicidad mayor o grave: mutismo akinético, afasia expresiva, ataques de tipo epiléptico, confusión, psicosis encefalopatía, coma persistente, y neurotoxicidad menor o leve: temblor, cefalea, trastornos del sueño, disestesias, fotofobia^{341, 352}.

En un estudio de trasplante renal europeo, el número de pacientes que presentó temblor fue significativamente mayor en el grupo tacrolimus que en el de ciclosporina. Se presentó insomnio, cefaleas y parestesias en el 24%, el 20,5%, y en 5,6%, respectivamente de los pacientes tratados con tacrolimus³⁵³. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio renal multicentrico de los EEUU donde el temblor fue significativamente mayor en los pacientes que habían recibido tacrolimus en comparación de aquellos pacientes que habían recibido ciclosporina.

En los casos donde se consideró como necesario una reducción de la dosis los síntomas neurológicos fueron, por lo general, reversibles³⁵⁴. Los cambios neuropatológicos observados con tacrolimus parecen ser cualitativamente similares a aquellos asociados a la inmunosupresión con ciclosporina^{355, 356}.

2.4.8.4- Hipertensión arterial

La hipertensión arterial valorada como la necesidad de tratamiento antihipertensivo, fue significativamente menor para los pacientes con tacrolimus comparado con la ciclosporina en dos estudios con pacientes trasplantados adultos y pediátricos, respectivamente³⁵⁷.

La hipertensión arterial fue constatada por Todo³⁵⁸. En el 22% de los pacientes tratados con tacrolimus después de los seis primeros meses de tratamiento y casi todos ellos respondieron bien al tratamiento con un solo fármaco.

2.4.8.5- Infecciones

Las primeras experiencias con tacrolimus mostraron una baja incidencia de infecciones en un estudio comparativo de 20 pacientes con trasplante hepático tratados con tacrolimus con respecto a otro grupo similar con ciclosporina (20% vs 55%, $p < 0.05$) después de un seguimiento máximo de 62 días³⁵⁹. Posteriormente y con más experiencia con este fármaco, se

publicaron estudios no comparativos y durante periodo de tiempo entre 5 y 12 meses³⁶⁰ con 110 trasplantes hepáticos , un 50% desarrollaron alguna infección, la mayoría son bacterianas, y dentro de las virales, la citomegalovirus(CMV) fue la más frecuente. Las infecciones fúngicas fueron menos frecuente (candidiasis y aspergilosis).

La menor incidencia de infección en pacientes trasplantados tratados con FK506 también se ha constatado en estudios sobre población infantil³⁶¹.

2.4.8.6- Enfermedades linfoproliferativas

Las enfermedades linfoproliferativas son una complicación reconocida derivada de la inmunosupresión. En estudios realizados a pacientes trasplantados con tratamiento con tacrolimus se constató una incidencia de entre el 0.7 y el 1.6%³⁶².

Existe una estrecha relación entre el desarrollo de las neoplasias linfoides y la infección por el virus de Epstein-Barr. En un estudio realizado por Reyes³⁶³ encontraron que los 15 pacientes que habían desarrollado linfomas tenían clara evidencia de infección por este virus según los marcadores serológicos.

2.5- Tacrolimus y Miastenia Gravis

Los trabajos publicados en revistas indexadas sobre MG y Tacrolimus se resumen en la tabla 9.

Autor	Año	Revista	Nº Casos	Dosis	Seguimiento (meses)	CSR % *	PR % **	Yatrogenia %
Yoshikawa ³⁶⁴	1997	J Autoimmun	Experim					
Evoli ³⁶⁵	2002	Muscle Nerv	1					
Ponseti ³⁶⁶	2002	Med Clin (Barc)	20	2-8 mg/d	3			
Yoshikawa ³⁷	2002	J Clin Neurosci	2					
Utsugisawa ³⁶⁷	2003	Muscle Nerv	9					
Konishi ³⁶	2003	Muscle Nerv	19	3-5 mg/d	4		47	
Wakata ³⁶⁸	2003	ClinNeurolNeurosurg	13				54	
Iwamoto ³⁶⁹	2004	Yakugaku Zasshi	2	3mg/d				
Takamori ⁷¹	2004	Neurology	33					
Shimojima ³⁷⁰	2004	Clin Rheumatol	1					
Kawaguchi ³⁷¹	2004	Curr Med Res Opin	17	3 mg/d	19,2			
Konishi ³⁷²	2005	J Neurol Neur Psychi	12	2-4 mg/d	24		67	33
Tsukaguchi ³⁷³	2005	J Neurol Sci	2	3 mg/d				
Ponseti	2005	Clin Neurol Neurosur	13	2-8 mg/d	12		84	
Ponseti	2005	Neurology	79	2-8 mg/d	36	5,1	87,3	35,4
Shimojima ³⁷⁴	2006	J Clin Neurosci	7					
Kakisaka ³⁷⁵	2006	Brain Dev	1					
Tada ³⁷⁶	2006	J Neurol Sci	9		24		78	33,3
Ponseti ³⁷⁷	2006	Curr Med Res Opin	48	2-8 mg/d	24,4	33,4	62,6	

*CSR: Remisión Completa. ** PR: Remisión Farmacológica

Tabla 9. Relación de los artículos aparecidos en la literatura referenciados en Medline desde 1997 hasta 2006 del tratamiento con tacrolimus de la miastenia gravis.

2.5.1- Estudios experimentales

El primer trabajo experimental sobre tacrolimus y miastenia gravis aparece en la literatura en 1997 publicado por Yoshikawa³⁶⁴ demostrando que tacrolimus previene la inducción de la miastenia gravis experimental autoinmune en ratones al actuar sobre las células T de forma inmunosupresiva.

2.5.2- Experiencia clínica

Tras este trabajo a nivel experimental, las primeras experiencias a nivel clínico fueron publicadas el año 2002. Evoli³⁶⁵ en Italia tratando un paciente que no respondía al tratamiento convencional y Ponseti³⁶⁶ comunicando los resultados preliminares del estudio de 20 pacientes resistentes a la prednisona con dosis de tacrolimus de 0.1mg/Kg./día en combinación con prednisona durante 3 meses observando mejoría clínica, con descenso del nivel de los anticuerpos anti-AchR, y reducción progresiva de la dosis de prednisona.

Yoshikawa³⁷ publica que tacrolimus a dosis bajas 3mg/día en combinación con prednisona es efectivo en casos de miastenia gravis refractarias al tratamiento convencional, además ha observado el descenso de los niveles de anticuerpos antireceptores de acetilcolina. Otro estudio realizado por Wakata³⁶⁸ valorando los efectos terapéuticos del tacrolimus a dosis fijas de 3 mg/día durante 16 semanas en 13 pacientes evidencia mejoría en 7 pacientes, dicha mejoría en 6 pacientes aparece a las 2 semanas de iniciar el tratamiento.

Konishi³⁶ demuestran en un estudio multicentrico la eficacia de tacrolimus en 19 pacientes durante 16 semanas que no respondían al tratamiento con prednisona. Posteriormente el mismo grupo de Konishi³⁷² presenta los resultados de otro estudio multicentrico de 12 pacientes con dosis de tacrolimus de 2-4.5 mg/día, durante 2 años observando mejorías en 8 pacientes (67%), con descenso de los niveles de anticuerpos antireceptores de acetilcolina en el 83% de los pacientes, y escasos efectos secundarios.

Nagane³⁸ publica el primer trabajo randomizado a doble ciego en pacientes no tratados con anterioridad con otras drogas, demostrando la eficacia del tacrolimus en la miastenia con mínimos efectos secundarios menores y efecto positivo desde la primera semana de tratamiento.

Durante estos años y con múltiples publicaciones en investigación básica y con la experiencia clínica adquirida en el tratamiento con tacrolimus de más de 300 pacientes miastenicos nos ha dado la respuesta o intentado darla en una serie de observaciones:

- 1.- La rapidez en el inicio de la recuperación de la fuerza muscular.
- 2.- La potente acción terapéutica que le permite actuar como monoterapia
- 3.- La posibilidad de reducir la prednisona mas rápidamente que con la asociación de otros medicamentos inmunosupresores.
- 4.- La potente acción en la recuperación de la fuerza muscular en los pacientes con timoma

Todas estas observaciones clínicas se han tratado de explicar con los siguientes fundamentos fisiopatológicos^{378, 379, 380} :

1.- El tacrolimus actúa sobre los receptores “*ryanodine*” estimulando la contracción muscular y la transmisión neuromuscular al interferir en la homeostasis intracelular del calcio. El tacrolimus se une a *FK506-binding protein* (FKBP), formando el complejo FK506-FKBP que se une y bloquea la acción del enzima calcineurina, dando como resultado el fracaso de la defosforilación, de la transcripción IL-2 y del crecimiento de los linfocitos T. En los linfocitos T la calcineurina es activada gracias al aumento del calcio endocitoplasmático, que ocurre después de la estimulación de la célula T por el antígeno. Se sabe que a nivel del músculo esquelético existe una asociación entre un miembro de la familia FKBP de un peso molecular de 12Kda y el receptor “*ryanodine*”/canales de liberación de calcio del músculo esquelético. Consecuentemente el complejo tacrolimus-FKBP12 además de su acción inmunosupresora y de la inhibición de la proliferación celular puede actuar regulando la liberación de los canales del calcio

intracelulares. La liberación de calcio provoca el fenómeno excitación/contracción del músculo esquelético, con un aumento de la fuerza muscular.

2.- El efecto biológico del tacrolimus sobre los receptores glucocorticoideos produce un aumento de esteroides intracelulares por bloqueo de su exportación celular y aumentando la habilidad de los receptores glucocorticoideos para unirse a la hormona. Efecto que explica la rápida posibilidad de reducir la prednisona administrada a los pacientes por un aumento de su utilización intracelular. En contraste la ciclosporina solo actúa sobre los receptores glucocorticoideos inhibiendo los mecanismos de exportación de corticoides.

3.- El tacrolimus, además de reducir los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina también actúa sobre los anticuerpos “*anti-ryanodine*” y anti-titin. Razón por la cual se obtienen mejores resultados en los pacientes con timomas.

4.- El efecto inmunosupresor del tacrolimus también actúa sobre los pacientes seronegativos y en los pacientes con anticuerpos anti tirosin-quinasa específica muscular positivos (anti –MuSK).

5.- El tacrolimus aumenta la apoptosis de células T, acción que no la produce la ciclosporina.

III. OBJETIVOS DE LA TESIS

OBJETIVOS DE LA TESIS

La Unidad de Miastenia Gravis del Hospital Vall d'Hebron inició su actividad en 1970. Los pacientes en los que persistieron síntomas miastenicos después de la timectomía, han sido tratados históricamente con diferentes pautas terapéuticas inicialmente con prednisona y en los casos de alta morbilidad y/o imposibilidad de reducir la dosis, se asoció otro inmunosupresor que al principio fue la azatioprina y desde 1992 la ciclosporina. En los enfermos bajo tratamiento con prednisona-ciclosporina se evidencio mejoría en el 86% pero con alto porcentaje de efectos secundarios y pocos casos con posibilidad de reducción significativa de la prednisona.

La búsqueda de una alternativa mejor para estos pacientes e impulsados por unos prometedores resultados experimentales publicados en el tratamiento de la MG con el tacrolimus³⁶⁴, iniciamos en el año 2000 un estudio de la utilización clínica de esta droga en pacientes miastenicos. Los Hallazgos preliminares de 20 casos fueron publicados por Ponseti³⁶⁶ en Febrero de 2002 con seguimiento de tres meses, observando mejoría clínica y disminución de los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina. Como consecuencia de estas observaciones iniciales y ante la falta de estudios controlados que evaluarán la verdadera efectividad del tacrolimus en la miastenia gravis nos planteamos realizar dos estudios prospectivos cuyos resultados publicamos en la literatura y constituyen la base de esta

tesis doctoral realizada por recopilación de artículos. Sus objetivos fueron los siguientes:

A).Primer trabajo prospectivo, unicéntrico, no comparativo, de un año de duración, con la finalidad de:

- 1- Probar la eficacia del tratamiento de la miastenia gravis con tacrolimus en pacientes que no responden al tratamiento con esteroides y ciclosporina, o con toxicidad relacionada por ciclosporina y/o esteroides.
- 2- Evaluar la mejoría de la fuerza muscular a lo largo del tiempo de estudio.
- 3- Evaluar el efecto inmunosupresor del tacrolimus en relación con los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina.
- 4- Determinar el número de pacientes en lo que es posible lograr una retirada de los esteroides (total o parcial).
- 5- Evaluar la seguridad del tacrolimus en lo que respecta a sus efectos adversos.
- 6- Evaluar el efecto del tacrolimus en pacientes con timoma.

B).Segundo trabajo prospectivo, abierto y a largo plazo de un número elevado de pacientes con el objetivo de:

- 1- Realizar un análisis a mayor escala, tras sustituir la ciclosporina por tacrolimus en un grupo más amplio de pacientes resistentes a la prednisona.
- 2- Valorar los resultados a largo plazo en relación con la fuerza muscular.
- 3- Valorar la posibilidad de reducir o incluso suprimir el tratamiento con prednisona.

- 4- Determinar el porcentaje de pacientes que logran una mejoría significativa de su enfermedad y el intervalo de tiempo necesario para lograrlo.
- 5- Analizar los niveles de anticuerpos anti receptor de acetilcolina y su relación con la repercusión clínica.
- 6- Evaluar el efecto del tacrolimus en los pacientes con timoma, así como en los timomas invasivos.
- 7- Valoración de la yatrogenia secundaria a la utilización de tacrolimus durante un periodo prolongado de tratamiento.

IV. PUBLICACIONES

4.1- PRIMERA PUBLICACIÓN

Benefits of FK506 (tacrolimus) for residual , cyclosporin- and prednisone –resistant myasthenia gravis : one- year follow-up of an open-label study.

José M. Ponseti, Jamal Azem, José M. Fort, Agustín Codina, J. Bruno Montoro, Manuel Armengol.

Clinical Neurology and Neurosurgery 107(2005)187-190.

Benefits of FK506 (tacrolimus) for residual, cyclosporin- and prednisone-resistant myasthenia gravis: one-year follow-up of an open-label study

José M. Ponseti^{a,*}, Jamal Azem^a, José M. Fort^a, Agustín Codina^c,
J. Bruno Montoro^b, Manuel Armengol^a

^a Unit of Myasthenia Gravis, Department of Surgery, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Autonomous University of Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, E-08035 Barcelona, Spain

^b Service of Hospital Pharmacy, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Autonomous University of Barcelona, E-08035 Barcelona, Spain

^c Service of Neurology, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Autonomous University of Barcelona, E-08035 Barcelona, Spain

Received 23 February 2004; received in revised form 8 July 2004; accepted 26 July 2004

Abstract

Thirteen patients with myasthenia gravis, unresponsive to prednisone and cyclosporin after thymectomy, received KF506 (tacrolimus) for 12 months, at starting doses of 0.1 mg/kg per day b.i.d. and then adjusted to achieve plasma concentrations between 7 and 8 ng/mL. The doses of prednisone were progressively reduced and finally discontinued. Anti-acetylcholine antibodies and myasthenia gravis score for disease severity decreased significantly and muscular strength increased by 37%. All patients achieved pharmacological remission, 11 were asymptomatic and two had minimal weakness of eyelid closure. Tacrolimus was well tolerated and appears a suitable approach after unsuccessful treatment with conventional immunosuppressants in patients with disabling myasthenia.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Tacrolimus; Myasthenia gravis; Prednisone; Cyclosporin

1. Introduction

Myasthenia gravis is a chronic autoimmune disease caused usually by antibodies against the acetylcholine receptor (AChR) of skeletal muscle. Its current treatment includes thymectomy as an early consideration, and several immunosuppressive agents, such as corticosteroids, azathioprine and cyclosporin. Although immunosuppressive regimens are very effective, important issues related to the management of patients with generalized uncontrollable myasthenic symptoms or serious side effects of long-term steroid

treatment remained unanswered. Tacrolimus (FK506) is a macrolide molecule of the same immunosuppressant class as cyclosporin and has a potent immunosuppressive. The compound, which suppresses interleukin-2 production associated with T cell activation, inhibits differentiation and proliferation of cytotoxic T cells. Successful treatment of myasthenia gravis with tacrolimus has been recently reported in patients with intractable myasthenia [1–4]. Based on these encouraging initial results we started treatment with tacrolimus in patients with residual myasthenia gravis in whom it was not possible to reduce the doses of prednisone and/or due to the occurrence of important side effects of cyclosporin and/or side effects of prednisone. Results after 12 months of treatment are here presented. As far as we are aware, this is the first report in which tacrolimus has been administered for such a long period of time.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 2746000x6587; fax: +34 93 2746224.

E-mail addresses: ponseti@hg.vhebron.es, 5012jpb@comb.es (J.M. Ponseti).

2. Patients and methods

Six men and nine women with a mean of 45.6 years (S.D. 14.6; range 28–72) gave written consent to participate in a prospective, open-label study. The study protocol was approved by the local institutional review board and authorised by the Spanish health authorities (AEM protocol 02-0081, code MG/601200-T). All patients had undergone transsternal extended thymectomy at least in the previous 3 years and were under treatment with prednisone (mean dose 33.1 mg/day, range 10–60) and cyclosporin (2–3 mg/kg per day, plasma levels 80–120 ng/mL). Histological findings included hyperplasia of the thymus in seven patients, encapsulated thymoma (Masaoka stage I) in three and invasive thymoma in five (Masaoka stage III 4, stage IVa 1). According to the Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) clinical classification [5], all patients had muscle weakness affecting other than ocular muscles: class IIIa (moderate weakness predominantly affecting limb, axial muscles, or both), 2 patients; class IIIb (moderate weakness predominantly affecting oropharyngeal, respiratory muscles, or both), 10 patients; and class IVb (severe weakness predominantly affecting oropharyngeal, respiratory muscles, or both) 3 patients. According to the clinical classification of Osserman [6], the clinical type of myasthenia was IIB (moderately severe generalized myasthenia, that is, severe skeletal and bulbar involvement but no crises; drug response less than satisfactory) in all patients. MGFA postintervention status [5] showed improvement (I) in six patients and unchanged (U) in nine. In none of the patients, the dose of prednisone or cyclosporin could be reduced. All patients suffered from adverse effects of long-term corticosteroid and cyclosporin treatment, including obesity, hypertrichosis, gingival enlargement, hypertension, hypercholesterolemia, and renal insufficiency with increased blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations.

Patients were switched from cyclosporin to tacrolimus (FK506, Prograf[®], Fujisawa, S.A., Madrid, Spain) starting at doses of 0.1 mg/kg per day b.i.d. and then adjusted to achieve plasma drug concentrations between 7 and 8 ng/mL (EMIT 2000, Dade Behring, Milton Keynes, UK) The dose of prednisone was intended to be reduced according to response to tacrolimus. We assessed patients at baseline and at 3, 7, 15 and 30 days, and 3, 6, 9 and 12 months after beginning FK596 administration. Determination of AChR antibodies (AChR-Ab RIA kit, RSR Ltd., Cardiff, UK), a test to evaluate muscular strength (TEMS), quantitative MG score for disease severity (QMG score) [5], clinical classification of therapeutic response according to Osserman [6] and MGFA postintervention status [5] were assessed at each visit. Pharmacological remission was defined as the absence of signs and symptoms of myasthenia under an immunosuppressive regimen and without anticholinesterase medication. It is accepted that a patient with pharmacological remission may occasionally have minimal weakness of eyelid closure at any time of the day or the week. Adverse drug reactions were also investigated, and main hematological, biochemical and hormonal laboratory parameters were recorded. The disappearance of steroid-related side effects when the doses of prednisone were reduced or withdrawn was recorded.

Data were analyzed with the Wilcoxon signed-rank test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

Of the 15 patients who gave written consent to participate in the study, 2 were excluded. In one patient, inclusion criteria were not met at baseline assessment and another patient quit through his own decision. Therefore, 13 patients completed the study. As shown in Table 1, after 12 months of

Table 1

Changes in muscle strength according to quantitative myasthenia gravis (QMG) score and MGFA postintervention status over 1-year treatment with tacrolimus

Patient	Age (years)	Sex	Pathology thymus	QMG score/MGFA postintervention status ^a					
				Baseline	1 month	3 months	6 months	9 months	12 months
1	31	F	Hyperplasia	12/I	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
2	28	F	Hyperplasia	21/I	4/MM-1	4/MM-1	0/PR	0/PR	0/PR
3	43	F	Thymoma invasive	28/U	20/I	16/I	0/PR	0/PR	0/PR
4	39	M	Thymoma invasive	19/I	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
5	68	F	Thymoma invasive	20/I	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
6	58	F	Thymoma	19/U	3/MM-1	2/MM-1	0/PR	0/PR	0/PR
7	58	M	Thymoma invasive	20/U	9/I	6/I	3/MM-1	4/MM-1	1/PR ^b
8	51	F	Thymoma	28/I	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
9	66	M	Thymoma invasive	18/U	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
10	52	M	Hyperplasia	18/U	0/PR	0/PR	0/PR	3/MM-1	1/PR ^b
11	32	M	Hyperplasia	20/I	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
12	31	F	Hyperplasia	25/U	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR
13	28	F	Thymoma	28/U	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR	0/PR

^a QMG score ranges from 0 to 39; MGFA postintervention status: PR, pharmacological remission; MM-1, minimal manifestations, the patient continues to receive some form of immunosuppression; I, improvement; U, unchanged.

^b Asymptomatic with minimal weakness of eyelid closure.

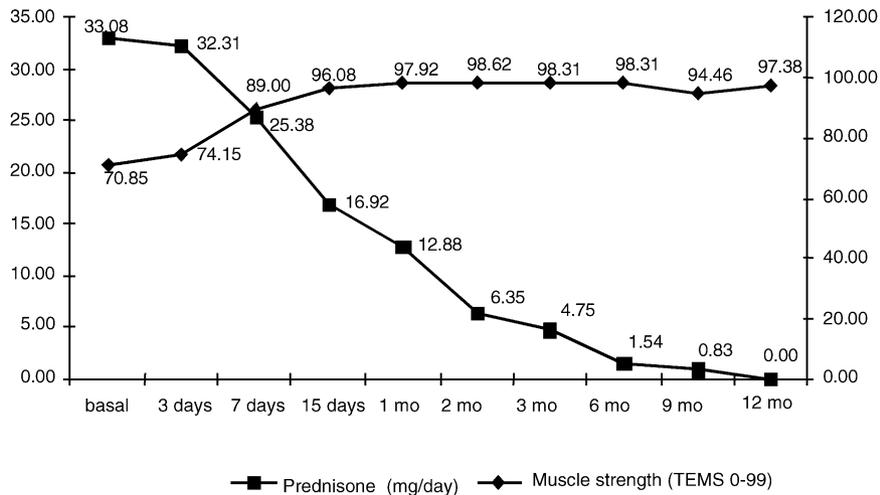


Fig. 1. Improvement of muscular strength and reduction of prednisone doses during treatment with tacrolimus.

treatment with tacrolimus, changes in Osserman therapeutic response were remarkable: 11 patients were asymptomatic and 2 patients had minimal weakness of eyelid closure. Clinical improvement was evident after one month of treatment. According to the MGFA postintervention status, all patients achieved pharmacologic remission (no symptoms or signs of myasthenia except that the patient continues to take some form of therapy). TEMS changed from 70.85 (S.D. 7.47) to 97.38 (S.D. 4.99), with a significant increase of 37.5% ($P = 0.0002$) in the muscular strength (Fig. 1). QMG score decreased from a median of 21.23 (range 12–28) to 0.30 (range 0–2) ($P = 0.001$) (Table 1). Most of these changes were evident shortly after beginning tacrolimus treatment. The doses of prednisone were progressively reduced and finally withdrawn in all patients (Fig. 1). AChR antibodies decreased from 11.10 nmol/L (S.D. 13.38) to 4.50 nmol/L (S.D. 3.74) ($P = 0.0170$) (Fig. 2). The mean (S.D.) dose of tacrolimus at the beginning of treatment was 6.85 (1.82) mg/day and 4.00 (1.53) mg per day at the end of the study ($P = 0.004$). Mean (S.D.) plasma drug concentrations were 6.97 (4.85) ng/mL on the third day of treatment and 6.65 (1.62) ng/mL at 12 months.

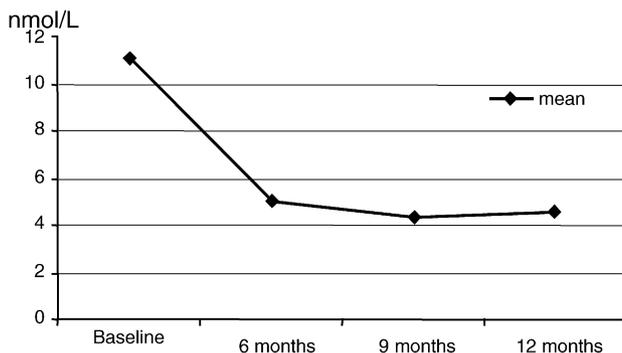


Fig. 2. Progressive reduction of serum anti-AChR antibody concentrations during treatment with tacrolimus.

Blood pressure remained stable, weight loss was 4.4% (from 78.56 kg [S.D. 21.02] to 75.13 kg [S.D. 17.00], $P = 0.0139$) and HDL-cholesterol decreased from 73.09 U/L (S.D. 23.64) to 59.23 U/L (S.D. 13.79) ($P = 0.0469$). Other biochemical parameters including serum magnesium, urea and creatinine values remained unchanged. The mean (S.D.) serum glucose levels were 97.09 (15.85) mg/dL at baseline compared with 97.69 (15.57) mg/dL at the end of the study. The clinical response of patients with thymic hyperplasia and patients with thymoma was similar. No metastasis, relapse of thymoma or new neoplasms developed. Tacrolimus was well tolerated and no adverse events related to the drug were recorded.

4. Discussion

The present study has some limitations because of its unblinded and nonrandomized nature and the relatively small number of patients included. Further studies are needed to investigate long-term clinical outcome as well as the side effects of FK506 in larger numbers of patients, particularly in comparison with side effects related to the use of steroids and cyclosporin. However, the benefits of tacrolimus in steroid- and cyclosporin-resistant myasthenia observed in this study are outstanding. Low-dose tacrolimus (serum concentration below 10 ng/mL) reduced AChR antibodies significantly. Disappearance of myasthenic symptoms was favourable associated with withdrawal of prednisone. Tacrolimus can be considered an alternative treatment for patients with disabling myasthenia gravis that is not responsive to conventional immunosuppressants, or when these other agents are contraindicated. In our patients, treatment with cyclosporin was started at the recommended dose of 5 mg/kg per day [7,8], but the dose of cyclosporin had to be reduced to 2–3 mg/kg per day due to serious adverse effects. In fact, a recent study has shown the usefulness to switch from cyclosporin to

tacrolimus in organ transplant recipients to reduce severe gingival enlargement induced by the administration of cyclosporin [9].

The experience with the use of tacrolimus in patients with myasthenia gravis is limited. Yoshikawa et al. [1] treated two patients suffering from intractable myasthenia gravis and both patients showed significant improvement of myasthenic signs, accompanied by suppressed serum AchR antibodies. In the report of Evoli and coworkers [2], tacrolimus was effective as a single immunosuppressant in a patient who had developed myasthenia gravis during interferon alpha treatment. In this case, the coexistence of hepatitis C and type 2 diabetes contraindicated the use of steroids and azathioprine, and cyclosporine, although effective, had induced renal failure. In 16 patients with steroid-resistant generalized myasthenia gravis, treatment with tacrolimus for 16 weeks was accompanied by significant improvement of myasthenic signs [3]. Wakata et al. [4] studied the therapeutic effect of tacrolimus given for 16 weeks and noted improvement in 7 of 13 myasthenic patients on the clinical muscle test. Two other patients with relapsing ocular symptoms improved. The present results are consistent with data of these aforementioned studies and add evidence to the benefits of including tacrolimus in the therapeutic armamentarium of myasthenia gravis.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgments

We thank Marta Pulido for editing the report and for editorial assistance. *Contributors:* J.M. Ponseti is the principal investigator, who designed the study, treated and followed the patients, planned the statistical analysis, coordinated study

execution and wrote the paper. J. Azem and J.M. Fort participated actively in the care of myasthenic patients, did the statistical analysis, and approved the final draft. A. Codina reviewed the design of the study, participated in study execution, reviewed patients' data, and approved the final version. J.B. Montoro participated in study execution, reviewed the report drafts, and approved the final version. M. Armengol scientifically reviewed the paper, supervised coordination of the study, and approved the final draft. All authors had access to all data in the study and held final responsibility for the decision to submit for publication.

References

- [1] Yoshikawa H, Mabuchi K, Yasukawa Y, Takamori M, Yamada M. Low-dose tacrolimus for intractable myasthenia gravis. *J Clin Neurosci* 2002;9:627–8.
- [2] Evoli A, Di Schino C, Marsilli F, Punzi C. Successful treatment of myasthenia gravis with tacrolimus. *Muscle Nerve* 2002;25:111–4.
- [3] Konishi T, Yohisyama Y, Takamori M, et al. A multicentered clinical open trial of FK506 (tacrolimus) in steroid-resistant myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2000;48:270.
- [4] Wakata N, Saito T, Tanaka S, Hirano T, Oka K. Tacrolimus hydrate (FK506): therapeutic effects and selection of responders in the treatment of myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg* 2003;106:5–8.
- [5] Jaretzi III A, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al. Myasthenia gravis. Recommendations for clinical research standards. *Neurology* 2000;55:13–6.
- [6] Osserman KE. *Myasthenia Gravis*. New York, NY: Grune-Stratton Inc.; 1958.
- [7] Tindall RS, Phillips JT, Rollins JA, Wells L, Hall K. A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1993;681:539–51.
- [8] Ciafaloni E, Nikhar NK, Massey JM, Sanders DB. Retrospective analysis of the use of cyclosporine in myasthenia gravis. *Neurology* 2000;55:448–50.
- [9] Hernandez G, Arriba L, Frias MC, de la Macorra JC, de Vicente JC, Jimenez C, et al. Conversion from cyclosporin A to tacrolimus as a non-surgical alternative to reduce gingival enlargement: a preliminary case series. *J Periodontol* 2003;74:1816–23.

4.2- SEGUNDA PUBLICACIÓN

Long-term results of tacrolimus in cyclosporine- and prednisone-dependent myasthenia gravis.

J.M. Ponseti, J.Azem, J.M. Fort, M. López-Cano, R. Vilallonga, M. Buera, C. Cervera, M. Armengol.

Neurology 2005;64:1641-1643.



Long-term results of tacrolimus in cyclosporine- and prednisone-dependent myasthenia gravis

Abstract—Seventy-nine patients with cyclosporine- and prednisone-dependent myasthenia gravis (MG) after thymectomy received tacrolimus for a mean of 2.5 ± 0.8 years. Prednisone was withdrawn in all but two patients. Anti-acetylcholine antibodies and MG score for disease severity decreased significantly and muscular strength increased by 39%. Complete stable remission was achieved in 5% of patients and pharmacologic remission in 87.3%. All patients resumed full activities of daily living.

NEUROLOGY 2005;64:1641–1643

J.M. Ponseti, MD, PhD; J. Azem, MD; J.M. Fort, MD, PhD; M. López-Cano, MD, PhD; R. Vilallonga, MD; M. Buera, MD; C. Cervera, MD, PhD; and M. Armengol, MD, PhD

Immunosuppressive regimens are effective in myasthenia gravis (MG), but some patients are refractory to immunosuppressants or experience serious side effects of long-term prednisone or cyclosporine treatment. Tacrolimus (FK506) is a macrolide that inhibits T-lymphocyte activation and binds to an intracellular protein, FKBP-12. A complex of tacrolimus–FKBP-12, calcium, calmodulin, and calcineurin is then formed, and the phosphatase activity of calcineurin inhibited. This effect may prevent the dephosphorylation and translocation of nuclear factor of activated T cells, a nuclear component thought to initiate gene transcription for the formation of lymphokines. The net result is the inhibition of T-lymphocyte activation. Successful treatment of MG with tacrolimus has been reported.^{1–7} We here present the long-term results of tacrolimus use in cyclosporine- and prednisone-dependent MG.

Methods. Between April 2000 and May 2004, 89 patients with MG (mean age 48.7 years) gave written consent to participate in a prospective, open-label study to assess the effectiveness of long-term treatment with tacrolimus. The study was approved by the institutional review board. The diagnosis of MG was established by history, signs and symptoms, EMG (single-fiber and repetitive nerve stimulation), edrophonium test, and serum anti-acetylcholine receptor (AChR) antibodies (AChR-Ab RIA kit, RSR Ltd., Cardiff, UK). In anti-AChR antibody–negative patients, the diagnosis was made by clinical findings, EMG, and edrophonium test. All patients had undergone thymectomy at least in the previous 3 years and were under treatment with high doses of prednisone (mean dose 58.9 mg/day) and cyclosporine (mean dose 205.9 mg/day). The doses of prednisone or cyclosporine could not be reduced, and all patients had adverse effects of long-term use of these medications.

Patients were switched from cyclosporine to tacrolimus (FK506, Prograf, Fujisawa, S.A., Madrid, Spain) starting at doses of 0.1 mg/kg/day BID and then adjusted to achieve plasma drug concentrations between 7 and 8 ng/mL (EMIT 2000, Dade Behring, Milton Keynes, UK). Assessments were performed at baseline and at 3, 7, and 15 days and 1, 2, and 3 months of

treatment, and every 3 months thereafter. Serum anti-AChR antibodies, a test to evaluate muscular strength (TEMS), range 0 to 99,⁸ a validated quantitative MG score for disease severity (quantitative MG [QMG] score, range 39 to 0),⁹ and clinical state according to Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) postintervention status⁹ were assessed at each visit. Body weight, blood pressure, laboratory tests including plasma concentrations of tacrolimus, cyclosporine- and steroid-related side effects, and adverse drug events were also recorded. The mean follow-up was 2.5 ± 0.8 years (range 0.13 to 3.72).

Categorical data were analyzed with the χ^2 test or Fisher's exact test and continuous data with the Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis test. The McNemar test, the Wilcoxon signed rank test, and Friedman one-way analysis of variance were used for comparisons of two or more groups. Data were analyzed with the SPSS statistical package (version 11.5). Significance was set at $p < 0.05$.

Results. Seven of the 86 patients were excluded due to failure to attend control visits at month 2 ($n = 4$) and voluntary decision to quit ($n = 3$). Of the 79 patients included in the study, 76 (96.3%) were treated with tacrolimus for more than 1 year, 75 (94.9%) completed 2 years of treatment, and 73 (92.4%) received tacrolimus for more than 3 years. In five patients, tacrolimus was withdrawn due to drug-related adverse effects: renal insufficiency in three, ataxia and neuropathy in one, and dizziness, instability, and vertigo in one. In three other patients, tacrolimus was stopped due to unrelated causes: pregnancy in one, lung cancer with generalized metastases in one, and renal adenocarcinoma in one.

The table shows the clinical characteristics and results of treatment with tacrolimus. Mean plasma drug concentrations were 8.2 ± 3.5 ng/mL in the first week of treatment and 6.6 ± 2.0 ng/mL at the end of the study ($p < 0.05$). The doses of prednisone were reduced and finally withdrawn in all but two patients (figure 1). Improvement of muscular strength was significant ($p < 0.0001$) for TEMS, with an increase of 39% at the end of the study (see figure 1). Changes were already evident after approximately 10 days of treatment in 49 patients (62%). In 22 patients (27.8%), muscular strength increased more than 10 points in the first week. QMG score also decreased ($p < 0.0001$). According to the MGFA postintervention status,⁹ 5.1% of patients achieved complete stable remission, 88.6% pharmacologic remission, and 6.4% had minimal symptoms. Excluding the 11 anti-AChR antibody–negative patients, AChR antibodies also decreased ($p < 0.0001$), and five patients became seronegative (figure 2).

All patients resumed full activities of daily living. The clinical response of patients with thymic hyperplasia and

From the Myasthenia Gravis Unit, Department of Surgery (Drs. Ponseti, Azem, Fort, López-Cano, Vilallonga, Buera, and Armengol) and Neurology Service (Dr. Cervera), Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received October 28, 2004. Accepted in final form January 26, 2005.

Address correspondence and reprint requests to Dr. José M. Ponseti, Unit of Myasthenia Gravis, Department of Surgery, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, E-08035 Barcelona, Spain; e-mail: jmponseti@vhebron.net and 5012jpb@comb.es

Table Baseline characteristics and results at the final visit in 79 thymectomized patients with myasthenia gravis on long-term treatment with tacrolimus

Characteristics	Baseline	Final visit*
Male/Female	30/49	
Age, y, mean ± SD (range)	47.9 ± 15.8 (14–80)	
Time from thymectomy, y, mean ± SD (range)	9.6 ± 9.3 (3.0–34.7)	
Histologic findings, no. (%)		
Hyperplasia of the thymus	34 (43.0%)	
Encapsulated thymoma (Masaoka stage I)	16 (20.3%)	
Invasive thymoma (Masaoka stages III and IV)	13 (16.4%)	
Thymic involution	16 (20.3%)	
MGFA clinical classification, no. (%)		
Class IIb	1 (1.3%)	
Class IIIa	11 (13.9%)	
Class IIIb	35 (44.3%)	
Class IVb	21 (26.6%)	
Class V	11 (13.9%)	
MGFA postintervention status, no. (%)		
Complete stable remission†	0 (0.0)	4 (5.1)
Pharmacologic remission‡	2 (2.5)	70 (88.6)
Minimal manifestations (MM)§		
MM-0	28 (35.4)	0 (0.0)
MM-1	0 (0.0)	4 (5.1)
MM-3	0 (0.0)	1 (1.3)
Improved	0 (0.0)	0 (0.0)
Unchanged	40 (50.6)	0 (0.0)
Worse	9 (11.4)	0 (0.0)
Prednisone, mg/d, mean ± SD (range)	58.9 ± 22.2 (10–90)	2.4 ± 12.0 (0–15)
Cyclosporine, mg/d, mean ± SD (range)	205.9 ± 46.6 (150–300)	0
Tacrolimus, mg/d, mean ± SD	5.5 ± 1.7	3.6 ± 1.9
Muscular weakness, mean ± SD		
TEMS	72.1 ± 8.7	98.9 ± 0.9
QMG score	20.7 ± 4.9	0.5 ± 3.2
AChR antibodies, nmol/L, mean ± SD	40.4 ± 47.9	5.6 ± 4.9
Adverse events per patient, mean ± SD (range)	6.0 ± 3.6 (0–14)	0.8 ± 1.4 (0–6)
Weight loss (kg), mean ± SD	76.9 ± 15.7	70.3 ± 14.1

* Mean follow-up of 2.5 ± 0.8 years (range 0.13 to 3.72 years).

† No symptoms or signs of myasthenia gravis for at least 1 year and no therapy for myasthenia gravis during that time.

‡ The same criteria as for complete stable remission except that the patient continues to take some form of therapy for myasthenia gravis.

§ No symptoms of functional limitations from myasthenia gravis but some weakness on examination of some muscles.

MGFA = Myasthenia Gravis Foundation of America; TEMS = test to evaluate muscular strength; QMG = quantitative myasthenia gravis; AChR = acetylcholine receptor.

patients with thymoma was similar. The percentage of patients with cyclosporine- and prednisone-related adverse effects decreased from 96.2% at baseline to 35.4% at the final visit ($p < 0.001$). The percentage of patients with hypertrichosis decreased from 50.6% before treatment with tacrolimus to 2.3%, and the percentage of patients with acne from 54.1% to 1.2%. Other adverse effects, such as paresthesias, gingival enlargement, malleolar edema, tremor, headache, depressive symptoms, and diarrhea, also decreased ($p < 0.05$). There was a reduction in the number of patients with hypercholesterolemia, increased blood urea nitrogen, elevated serum creatinine concentration, and hyperglycemia ($p < 0.05$). Symptoms of tacrolimus-induced hypomagnesemia, such as paresthesias, tremor, and muscular cramps, resolved after adjustment of the plasma levels of tacrolimus or the administration of magnesium supplements.

Administration of tacrolimus was not associated with an increase in infections (2.4% vs 1.2%). Three patients developed a new malignancy: two patients with lung can-

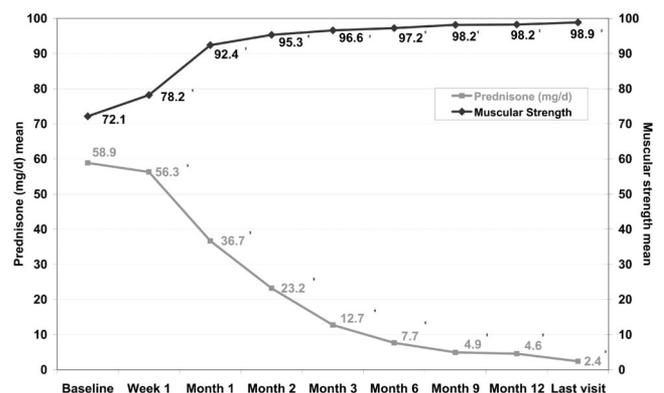


Figure 1. Changes of the test to evaluate muscular strength show improvement of muscular strength and reduction of mean daily doses of prednisone during treatment with tacrolimus (*Wilcoxon test, $p < 0.05$ for doses of prednisone and $p < 0.0001$ for muscular strength).

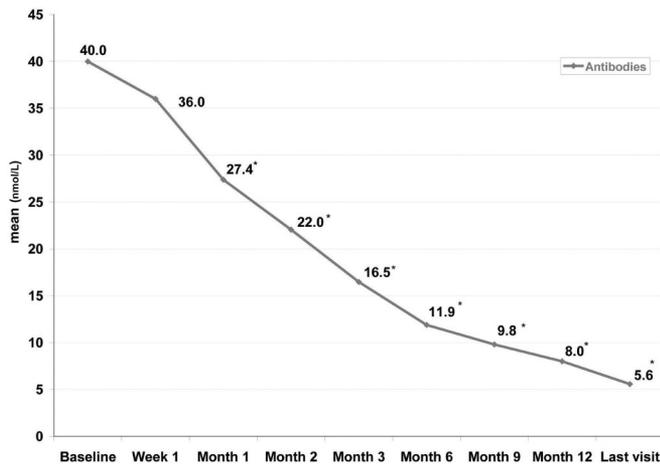


Figure 2. Progressive reduction of mean serum anti-acetylcholine receptor antibody concentrations during treatment with tacrolimus (*Wilcoxon test, $p < 0.0001$).

cer at 4 and 6 months of treatment and one with renal cancer at 4 months of treatment. One patient with lung cancer had cerebral and bone metastases at the time of diagnosis and died 1 month later. The patient with renal cancer underwent a nephrectomy. In these two patients, treatment with tacrolimus was discontinued. The remaining patient with lung cancer underwent a lobectomy, and tacrolimus was not withdrawn.

Discussion. Tacrolimus is 10 to 100 times more potent than cyclosporine,¹⁰ but there have been a few reports its use in MG. The current study is unblinded and nonrandomized, but we studied a large, homogeneous group of high-risk patients with MG, thymectomized at least in the previous 3 years, treated in a single center, and closely followed by the same research team. All patients had disabling MG and were unresponsive to combined treatment with prednisone and cyclosporine or were switched to tacrolimus to minimize side effects of the immunosuppressive regimen.

Tacrolimus was not administered at a fixed low dose of 3 mg/day, as reported by others.^{3,5} Patients received therapeutic doses of 6 to 10 mg/day to

achieve plasma drug concentrations of 7 to 8 ng/mL, and after 1 year of treatment, the doses could be reduced to achieve drug levels of approximately 6 ng/mL, which were shown to be effective because the doses of prednisone could be reduced and finally withdrawn in 98% of patients. Approximately 1 year after starting treatment, all but two patients continued with tacrolimus monotherapy, and 92% of patients had received tacrolimus for more than 3 years. A cause-effect in the three patients with solid tumors seems unlikely because of the short interval between the start of treatment and diagnosis of malignancy. Tacrolimus was well tolerated, without adverse effects related to long-term treatment with prednisone and cyclosporine, and might replace these drugs as a sole immunosuppressive agent for the treatment of MG.

Acknowledgment

The authors thank Marta Pulido, MD, for editing the manuscript and editorial assistance.

References

1. Yoshikawa H, Mabuchi K, Yasukawa Y, Takamori M, Yamada M. Low-dose tacrolimus for intractable myasthenia gravis. *J Clin Neurosci* 2002;9:627–628.
2. Evoli A, Di Schino C, Marsili F, Punzi C. Successful treatment of myasthenia gravis with tacrolimus. *Muscle Nerve* 2002;25:111–114.
3. Konishi T, Yoshiyama Y, Takamori M, Yagi K, Mukai E, Saida T, Japanese FK506 MG Study Group. Clinical study of FK506 in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2003;28:570–574.
4. Wakata N, Saito T, Tanaka S, Hirano T, Oka K. Tacrolimus hydrate (FK506): therapeutic effects and selection of responders in the treatment of myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg* 2003;106:5–8.
5. Kawaguchi N, Yoshiyama Y, Nemoto Y, Munataka S, Fukutake T, Hattori T. Low-dose tacrolimus treatment in thymectomized and steroid-dependent myasthenia gravis. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1269–1273.
6. Ponseti JM, Fort JM, Espin E, Armengol M. Tacrolimus (FK506) in the treatment of prednisone-resistant myasthenia gravis. Preliminary results of 20 cases [in Spanish]. *Med Clin (Barc)* 2002;118:117.
7. Ponseti JM, Azem J, Fort JM, Codina A, Montoro JB, Armengol M. Benefits of FK506 (tacrolimus) for residual, cyclosporin- and prednisone-resistant myasthenia gravis: one-year follow-up of an open-label study. *Clin Neurol Neurosurg* 2005 (in press).
8. Ponseti JM. *Myasthenia gravis. Manual terapéutico*. Barcelona: Springer-Verlag, 1995.
9. Jaretzki A III, Barohn RJ, Ernstoff RM, et al. Myasthenia gravis. Recommendations for clinical research standards. *Neurology* 2000;55:16–23.
10. Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, et al. The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* 1989;143:718–726.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

No existe en la actualidad un tratamiento ideal de la miastenia gravis con una remisión rápida e indefinida de la enfermedad en todos los casos y sin efectos secundarios. La búsqueda de una alternativa que nos acerque a esta situación nos condujo a iniciar estos estudios clínicos utilizando un fármaco inmunosupresor de reciente introducción, el tacrolimus ó FK506.

En nuestro primer trabajo iniciamos el tratamiento con tacrolimus en un grupo de 15 pacientes con un tiempo de evolución post-timectomía transesternal ampliada superior a 3 años. Seis hombres y nueve mujeres con edades comprendidas entre 28 y 72, media de 45.6 años. El estudio histopatológico del timo de los 15 incluidos mostró diferentes grados de hiperplasia tímica en 7 casos, timoma encapsulado en 3 (Masaoka grado I), y timoma invasivo en 5 (4 con grado de Masaoka III, 1 con grado Masaoka IVa).

Las variaciones en la clasificación clínica de Osserman en respuesta a la terapia con tacrolimus, así como la respuesta post-tratamiento según la Clasificación Americana de MG (MGFA post-tratamiento o MGFA *postintervention status*), observadas al año de tratamiento nos indicaron que todos los enfermos presentaban una remisión farmacológica (ausencia de

signos y síntomas miasténicos bajo un tratamiento inmunosupresor y sin medicación anticolinérgica durante un año) pero ninguno una remisión completa. Históricamente mediante el tratamiento con prednisona habíamos observado un 75% de remisión farmacológica y ninguna remisión completa.

El aumento constatado por el test de la fuerza muscular al final del estudio es del 37.5% ($p=0.0002$), valor estadísticamente significativo, donde observamos menos limitación de su fuerza muscular permitiendo más integración a nivel social, laboral y familiar. Esta mejoría de la fuerza muscular también ha sido observada por Wakata³⁶⁸ en aproximadamente el 50% de sus pacientes y Konishi³⁶ en el 67%.

También el estudio de la fuerza muscular con el QMGS (escala cuantitativa de la MG, que valora la clínica miasténica con un rango de 0 a 39), pasó de valores basales medios de 21.23 a valores de 0.30 al completar el año de seguimiento ($p=0.0001$). Este fenómeno concuerda con los resultados de Shimojima³⁷⁰ donde observa reducción significativa de la QMGS y de la escala de actividad de vida diaria. Tada³⁷⁶ publica una reducción del QMGS en el 77.8% de sus casos después de 1 año de tratamiento. Konishi³⁶ encuentra mejoría del 47% de los enfermos en la escala cuantitativa de la MG o en la escala de actividad diaria.

Las dosis de prednisona pudieron reducirse progresivamente hasta retirar la medicación en el 100% de nuestros pacientes. Resultados de reducción de la dosis de este medicamento sin retirarlo totalmente en los pacientes tratados con tacrolimus fueron publicados por Kawaguchi³⁷¹ con reducción de hasta el 50%, Konishi³⁷² con una media del 37% en el 58% de los casos y Nagane³⁸ consigue reducciones estadísticamente significativas. Tada³⁷⁶ obtiene una reducción del 50% de la dosis de corticoides en el 50% de sus enfermos al año de tratamiento con tacrolimus

La reducción de los títulos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina en nuestro trabajo fue del 59%. Hallazgos similares de reducción del nivel de anticuerpos han sido comunicados por Evoli³⁶⁵ y Yoshikawa³⁷. Konishi³⁶ obtiene buenos resultados con reducción de los títulos de anticuerpos del

35.5% en el 83% de los casos y Kawaguchi³⁷¹ observa también una reducción de alrededor del 55%.

El control de la presión arterial evidenció una disminución de un 5.0% y 6.9% de los valores tanto sistólicos como diastólicos respectivamente entre el control basal y final. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

La evolución del peso a lo largo del estudio, gravado en su inicio por la yatrogenia secundaria a la prednisona y la ciclosporina sufrió una reducción progresiva de un 4.4%, valor estadísticamente significativo ($p=0.0139$).

Los niveles de colesterol HDL disminuyeron de (73.09 ± 23.64 U/L) a (59.23 ± 13.79 U/L), ($p=0.0469$). Los niveles plasmáticos de magnesio, urea y creatinina no se alteraron. La media de niveles plasmáticos de glucosa es de 97,09 mg/dL en el control basal y de 97,69 mg/dL al final. Konishi³⁷² no observa aumento del nivel de creatinina ni hiperglicemia en sus enfermos después de 2 años de tratamiento con tacrolimus. Wakata³⁶⁸ en uno de sus enfermos aparece hiperglicemia relacionada con la alta concentración de tacrolimus en sangre (11ng/mL) que se normaliza al retirar el fármaco.

La respuesta tanto clínica como analítica de los pacientes con timo hiperplásico y timoma fue similar. El tacrolimus fue bien tolerado y sin efectos adversos durante el año de tratamiento. Fenómeno observado por diferentes autores (Konishi³⁷², Nagane³⁸). Tada³⁷⁶ obtiene efectos secundarios no graves en el 33.3% de los enfermos.

Los autores japoneses utilizan tacrolimus con una dosis fija oral de 3 mg/día sin tener en cuenta la edad y el peso del paciente y sin prestar atención a los niveles de tacrolimus en sangre^{367, 372}. Por el contrario, en nuestros trabajos hemos realizado controles de los niveles de tacrolimus en sangre en todas las visitas ajustando la dosis del fármaco para mantener dichos niveles entre 7-8 ng/mL para que sean efectivos en la miastenia. En nuestra experiencia niveles de tacrolimus en sangre inferiores a 6 ng/mL han resultado insuficientes para mantener una buena fuerza muscular. Valores superiores a 8 ng/mL no han obtenido más fuerza muscular pero si han aumentado la yatrogenia. De las publicaciones de estos autores podemos

concluir que con este fármaco hay una buena respuesta de los enfermos miasténicos, con mejoría de su fuerza muscular, descenso del nivel de anticuerpos anti-acetilcolina, reducción progresiva de la dosis de prednisona y consecuentemente reducción de la yatrogenia, y sin observar efectos adversos importantes secundarios al fármaco. No obstante todos aconsejan estudios randomizados más amplios para evaluar la eficacia y el papel de esta droga en el tratamiento de la MG.

Nuestro trabajo tiene ciertas limitaciones por el reducido número de casos por tratarse de un grupo no aleatorizado, y valorado a medio plazo. Sin embargo los resultados observados en el grupo de enfermos miasténicos resistentes al tratamiento con prednisona y ciclosporina son altamente satisfactorios, con un aumento de la fuerza muscular y una reducción del título de anticuerpos, junto con la posibilidad de supresión de la prednisona en el 100% de los casos. La yatrogenia generada por la corticoterapia y la ciclosporina ha disminuido o desaparecido de forma significativa en todos los pacientes, por lo tanto tacrolimus se puede considerar una alternativa terapéutica en pacientes que no responden o presentan importantes efectos secundarios a los inmunosupresores convencionales (prednisona, ciclosporina).

El segundo trabajo corresponde a un estudio prospectivo de un grupo más amplio, y durante un periodo de seguimiento más largo. Se analizan de forma prospectiva 86 pacientes afectados de miastenia gravis con timectomía realizada al menos 3 años antes, y que para mantener una buena fuerza muscular precisaban de un tratamiento con altas dosis de prednisona y ciclosporina, sin posibilidad de reducir las dosis terapéuticas y con importantes efectos adversos secundarios a ambos tratamientos.

De los 86 pacientes 7 fueron excluidos del estudio, de los 79 pacientes restantes, en 8 pacientes se suspendió el tratamiento, 5 de ellos por presentar yatrogenia y los otros 3 por causas ajenas al fármaco.

Del total de pacientes finalmente incluidos, la dosis de prednisona se pudo reducir de manera progresiva hasta suspenderla totalmente en el 98% de los casos. Otros autores como Tada³⁷⁶ en un estudio durante 2 años

consiguen reducir la dosis de prednisona hasta el 50%, en el 50% de sus enfermos, sin poder retirarla del todo. Probablemente esta diferencia es debida a que este autor pauta dosis fija de tacrolimus sin ajustar la dosis según el nivel plasmático del FK506. En nuestra opinión para conseguir un efecto óptimo del tratamiento es importante la monitorización del tacrolimus plasmático y la mejoría clínica nos permite reducir o retirar la prednisona en función de la tolerancia de los pacientes.

La mejoría de la fuerza muscular comenzó a los 10 días de tratamiento en el 62% de los casos y continuó mejorando de forma progresiva en todos los pacientes hasta el final del estudio. Este fenómeno es comentado por Wakata³⁶⁸ que observa mejoría de sus enfermos a las 2 semanas de comenzar el tratamiento, probablemente debido a la acción directa del tacrolimus sobre la unión neuromuscular. Dicha mejoría se evidenció con el Test de Valoración de Fuerza Muscular (TFM) con un aumento del 39% al final del estudio ($p < 0.0001$), así como, con la escala cuantitativa de MG (*QMGS*) que disminuyó de forma estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), superponible a lo evidenciado con el TFM, y con las variaciones de la MGFA post-tratamiento (MGFA Postintervention Status), con 5.1% de remisiones totales (CRS), y un 87.3% de pacientes asintomáticos con remisión farmacológica (PR), y 6.4% con manifestaciones mínimas (MM 0-3). Mientras, con el tratamiento inicial de prednisona/ciclosporina la remisión completa era del 0%, la remisión farmacológica del 2.5% y las manifestaciones mínimas del 35.4%.

La media de descenso de los títulos de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina al finalizar nuestro estudio fue del 86%. Tsukaguchi³⁷³ presenta sus resultados en 2 casos con MG IIB asociado a timoma invasivo con reducción del nivel de los anticuerpos anti-AchR. Konishi³⁶ obtiene una reducción significativa tanto del nivel de anticuerpos como de la interleuquina-2.

La respuesta al tacrolimus fue similar tanto en pacientes con timo hiperplásico y timoma fenómeno también observado por Wakata³⁶⁸.

La yatrogenia presente en el 96.2% en pacientes bajo tratamiento prednisona-ciclosporina, descendió al 35.4% al finalizar las visitas. Este descenso es consecuencia de que se pudo reducir o retirar la prednisona en el 98% de los enfermos.

Analizando la yatrogenia de forma individualizada nos encontramos que de 71 casos bajo tratamiento con prednisona-ciclosporina con obesidad, se evidenció una reducción estadísticamente significativa del peso medio de 76.9Kg. a 70.3Kg.($p < 0.0001$) a medida que se redujo la prednisona y continuaron solo con tacrolimus.

El habito "cushingoide" disminuyó de forma significativa pasando del 88.2% al 5.9% al finalizar el estudio desapareciendo en el 100% de los casos que se pudo suspender la prednisona.

La hipertrichosis, el acné, y la hipertrofia gingival presentes en el 50.6%, 54.1% y 44.7% respectivamente desaparecieron casi por completa a los 3 meses de suspender la ciclosporina persistiendo en el 2.3%, 1.2% y 0% respectivamente.

El 15.3% de los enfermos presentaban hiperglicemia en la visita basal secundaria a la prednisona-ciclosporina y al finalizar el tratamiento sólo el 3.5% continuaron con hiperglicemia precisando tratamiento con antidiabéticos orales.

La hipercolesterolemia descendió del 40.5% de los casos al 5.1% en la visita final. Los niveles plasmáticos de urea, creatinina elevados en el 21.5% de los pacientes descendieron hasta el 7.6 % de los casos al final del estudio.

Las parestesias presentes en el 49.4% de los casos descendieron al 8.9% ($p < 0.0001$). Las diarreas descendieron del 10.1% al 2.5% pero no fue estadísticamente significativo.

La hipertensión arterial la presentaron el 15.2% de los pacientes en la visita basal y al final el 3.8% siguieron siendo hipertensos.

Respecto a los efectos secundarios al tratamiento con tacrolimus el 11.8% de los enfermos presentaron hipomagnesemia, con síntomas como las parestesias, temblores y calambres musculares que desaparecieron al ajustar

los niveles plasmáticos de tacrolimus o después de la administración de pequeñas cantidades de magnesio oral. La incidencia de infecciones secundaria al tacrolimus es del 1.2% de los casos y se mantuvo constante a lo largo del estudio. Nagane³⁸ en un estudio piloto randomizado de 34 pacientes (18 con prednisona y tacrolimus, 16 con solo prednisona) durante 1 año concluyó que ninguno de estos casos presentó efectos adversos debido al tacrolimus. Wakata³⁶⁸ en su estudio sólo observa hiperglicemia en el 12.5% de los enfermos (1 de 8 pacientes) secundaria al tacrolimus que desaparece al suspender el tratamiento. Konishi³⁶ no observa nefrotoxicidad ni diabetes mellitus ni otros efectos adversos graves, salvo leucocitosis y linfopenia. Tada³⁷⁶ obtiene efectos secundarios poco importantes en el 33.3% de los enfermos.

Tres pacientes presentaron neoplasias (2 con cáncer pulmonar a los 4 y 6 meses en enfermos con alta adicción al tabaco, y otro caso de cáncer renal a los 4 meses de tratamiento). Dado el corto tiempo entre el comienzo del tratamiento y la aparición del tumor, así como la presencia de otros factores desencadenantes, parece improbable que sean secundarias al inmunosupresor.

El efecto obtenido con el tacrolimus a los pocos días del inicio del tratamiento que observamos coincide con las observaciones de Konishi³⁷², Kawaguchi³⁷¹ y Wakata³⁶⁸. Este fenómeno podría estar relacionado con su acción farmacológica sobre la contracción muscular (receptor “*ryanodine*”), y sobre la transmisión neuromuscular (“*acetylcolin release reflecting intracellular calcium homeostasis*”). La unión de tacrolimus a la FK506-*binding protein* (FKBP) formando el complejo FK506-FKBP y bloqueando la acción del enzima calcineurina con el resultado de fallo en la defosforilación, transcripción de la IL-2 y la proliferación de las células T. Se ha observado que a nivel del músculo esquelético, existe asociación entre (FKBP12) y el receptor “*ryanodine*” (RyR1) y el canal de liberación de calcio, por lo tanto el complejo tacrolimus-FKBP12 además de su efecto inmunosupresor bloqueando la proliferación celular, parece actuar regulando el calcio intracelular, esta regulación favorece la excitación-

contracción del músculo esquelético con aumento de la fuerza muscular^{378, 379, 380}. Estos hallazgos se han confirmado recientemente por la presencia de anticuerpos anti-receptores “*ryanodine*” en casos de timoma asociado a miastenia gravis³⁶⁹.

El efecto biológico del tacrolimus sobre los receptores de glucocorticoides posibilita la reducción de la medicación esteroidea. Ello es debido al aumento de la concentración intracelular de esteroides, gracias al bloqueo de su extracción celular aumentando de la capacidad de dichos receptores glucocorticoides para unirse a hormonas mediante el FKBP51/PP5 (intercambio de inmunofilinas). En cambio la ciclosporina solamente afecta los receptores glucocorticoides al bloquear el mecanismo de extracción esteroidea³⁸¹.

Además, potenciado el efecto del tacrolimus en la miastenia gravis esta el efecto de este inmunosupresor sobre la apoptosis de células T. Se ha sugerido que la supervivencia de los linfocitos depende del balance entre los mediadores proapoptóticos y anti-apoptóticos. Respecto a esto sabemos que el tacrolimus aumenta la apoptosis de linfocitos T, efecto que no lo produce la ciclosporina, probablemente debido a que la ciclosporina y el tacrolimus tienen diferente habilidad de inhibir la permeabilidad de la membrana mitocondrial³⁸². Recientemente se han publicado que la FKBP38, una proteína de la familia de las FKBP puede interactuar con la anti-apoptótica proteína Bcl-2 y la Bcl-X1 convirtiéndolas en inestables y desprotegiéndolas de la degradación³⁸³. Este efecto pro-apoptótico representa un mecanismo adicional al inmunosupresor del tacrolimus³⁸⁴.

Los malos resultados observados en el grupo de pacientes afectados de miastenia asociada a timoma con escasa respuesta y con frecuentes recaídas con tratamiento convencional (anticolinérgicos, prednisona y azatioprina) mejoran e incluso son superponibles a los obtenidos en el grupo sin tumor tímico cuando el paciente se trata con tacrolimus. Esta observación también la encuentra Tsukaguchi³⁷³ y Tanahashi³⁸⁵.

Takamori⁷¹ analiza los anticuerpos anti-receptor “*ryanodine*” de 33 pacientes con miastenia y timoma y su reducción tras el tratamiento con

tacrolimus, por lo que apunta hacia el efecto inmunosupresor del fármaco tanto sobre los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina como los anti-“*ryanodine*”. Los buenos resultados observados en nuestros pacientes con miastenia y timoma nos hace sospechar tal como apunta Takamori⁷¹ que este inmunosupresor actúa sobre los anticuerpos anti-receptor de acetilcolina y sobre otros anticuerpos presentes en este grupo de pacientes (*anti-ryanodine* y *anti-titin*).

El grupo de pacientes seronegativos y de entre ellos los que presentan anti-MuSK también responden satisfactoriamente al tratamiento con tacrolimus como han observado Ponseti³⁷⁷, Tada³⁷⁶ y Takahashi³⁸⁶.

El tacrolimus administrado a dosis de 6-10mg/día para conseguir niveles plasmáticos de 7-8ng/mL, es un inmunosupresor altamente efectivo, y que nos ha permitido suspender la ciclosporina, y reducir la prednisona progresivamente para posteriormente retirarla en el 98% de los pacientes. En cambio otros autores lo administran a dosis fija y baja de 3 mg/día y sin valorar el nivel plasmático^{367, 372}, ya que niveles superiores a 10 ng/mL aumenta las posibilidades de presentar yatrogenia.

Hasta la fecha se han comunicado en la literatura, alrededor de 300 pacientes tratados con tacrolimus, de los cuales un elevado número corresponden a enfermos de nuestra unidad de MG. La conclusión de todas estas publicaciones que este fármaco es útil para tratar los pacientes afectos de MG refractaria a la terapia convencional o con yatrogenia asociada mejorando sus síntomas, su fuerza muscular y reduciendo los efectos adversos secundarios a la prednisona-ciclosporina.

A la luz los buenos resultados que hemos observado en cuanto a la repercusión del tacrolimus en la fuerza muscular y la baja incidencia de efectos secundarios durante el largo periodo del estudio nos hacen pensar que este inmunosupresor puede tener un importante papel en el tratamiento de la miastenia gravis. No obstante son necesarios estudios controlados, posiblemente multicentricos, por la prevalencia de la enfermedad para confirmar de forma más contundente nuestros resultados y validar al

tacrolimus como monoterapia inmunomoduladora en el tratamiento de la miastenia gravis.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1) En pacientes con miastenia gravis refractaria a la prednisona y/o ciclosporina el tratamiento con tacrolimus, nos ha permitido suspender la ciclosporina y una reducción progresiva de la prednisona hasta poder retirarla de forma total en el 98% de los casos, con la consiguiente reducción del 63.2% de los efectos secundarios a estos dos fármacos.

2) Se ha observado un aumento de la fuerza muscular del 39% con el uso del tacrolimus. Esto ha permitido mejorar la calidad de vida de estos pacientes a nivel social, laboral y familiar.

3) Los niveles de anticuerpos anti-receptor de acetilcolina han experimentado una reducción del 86.14% con la utilización del FK506.

5) Con el tacrolimus, a dosis de 0.1mg/kg./día y durante más de tres años, no hemos observado la aparición de recidivas en los casos de timomas invasivos.

6) El tratamiento con tacrolimus mejora los resultados, con remisión completa del 5.1% y remisión farmacológica del 87.3 % sin provocar efectos secundarios importantes y con buena tolerancia en la mayoría de los pacientes.

7) No se ha evidenciado diferencias en la respuesta terapéutica al tacrolimus en los pacientes con o sin timoma.

8) Ante la evidencia obtenida en estos dos trabajos prospectivos, que incluyen un número importante de pacientes y pese a las limitaciones de no ser unos estudios aleatorizados, los resultados nos permiten apuntar al tacrolimus como un inmunosupresor a tener muy en cuenta en el tratamiento de la miastenia gravis tanto por su potente efecto terapéutico, como por los mínimos efectos secundarios.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

¹ Sanders DB, Scoppeta C. The treatment of patients with myasthenia gravis. En: Myasthenia gravis and myasthenia syndromes. Neurol Clin 1994; 12:343-68.

² Tzartos SJ, Lindstrom JM, Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:755-9.

³ Mossman S, Vincent A, Newsom- Davis J. passive transfer of myasthenia gravis by immunoglobulins: Lack of correlation between AChR with antibody bound, acetylcholine receptor loss and transmission defect. J neurol Sci 1988;84:15-28.

⁴ Marx A, Wilisch A, Schultz A, Gattenloher S, Nenninger R, Muller-Hermelink HK.. Pathogenesis of myasthenia gravis. Virchows Arch 1997;430(5):355-64.

⁵ Wolf SM, Rowland LP, Schotland DL, McKinney AS, Hoefler PF, Aranow H Jr. Masthenia as an autoimmune disease: clinical aspects. Ann NY Acad Sci 1966; 135:517- 35.

⁶ Bird HA. Current management of rheumatoid arthritis. *Br J Hosp Med* 1986; 35: 374-81.

⁷ Khamashta MA, Ruiz-Irastorza G, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus flares during pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 1997;23:15-30.

⁸ Andrews PI, Massey JM, Howard JF Jr, Sanders DB. Race, sex, and puberty influence onset, severity, and outcome in juvenile myasthenia gravis. *Neurology* 1994;44(7):1208- 14.

⁹ Campell H, Bramwell E. Myasthenia gravis. *Brain* 1990; 23:277- 337.

¹⁰ Kennedy FS, Moersch FP,. Myasthenia Gravis: a clinical review of eighty-seven cases observed between 1995 and the early of 1932. *CMAJ* 1937;37:216- 223.

¹¹ Viets HR. A historical review of myasthenia gravis from 1672-1900. *JAMA* 1953;153:1273-80.

¹² Rowland LP, Hoefler PFA, Aranow, Merritt HH. Fatalities in myasthenia gravis: a review of 39 cases with 26 autopsies. *Neurology* 1956;6:307- 26.

¹³ Ponseti JM, Espin E, Armengol M., Cirugía del timo. Miastenia gravis. En: Caminero JA, Fernandez L. *Manual de neumología y cirugía torácica* 1998; Ed. Editores.

¹⁴ Richman DP, Agius MA. Treatment of autoimmune myasthenia gravis. *Neurology* 2003;61:1652-61.

-
- ¹⁵ Walker MB. Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. *Lancet* 1934;1:1200- 1201.
- ¹⁶ Mee J, Palne M, Byrne E, King J, Reardon K, O'Day J: Immunotherapy of ocular myasthenia gravis reduces conversion to generalized myasthenia gravis. *J Neuroophthalmol* 2003; 23: 251-5.
- ¹⁷ Sommer N, Sigg B, Melms A, Weller M, Schepelmann K, Herzau V, Dichgans J. Ocular myasthenia gravis: response to long term immunosuppressive treatment *J Neurol Neurosurg Psychiatry*1997; 62:156-62.
- ¹⁸ Monsul NT, Patwa HS, Knorr AM, Lesser RL, Goldstein JM. The effect of prednisone on the progression from ocular to generalized myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2004 ;217:131-3.
- ¹⁹ Bromberg MB, Wald JJ, Forshew DA, Feldman EL, Albers JW. Randomized trial of azathioprine or prednisone for initial immunosuppressive treatment of myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 1997;150:59-62.
- ²⁰ Kuks JB, Djojoatmodijo S, Oosterhuis HJ. Azathioprine in myasthenia gravis: observation in 41 patients and a review of literature. *Neuromuscul Disord* 1991;1:423-31.
- ²¹ Niakan E, Harati Y, Rolak LA. Immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis. *Arch Neurol* 1986;43:155-6.
- ²² Drachman DB, Adams RN, McIntosh K, Pestronk A. Treatment of experimental myasthenia with cyclosporine A. *Clin Immunopathol* 1985; 34: 174-88.

-
- ²³ Tindall RSA, Phillips JT, Rollins JA, Wells L, Hall K. A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1993; 681: 539-51.
- ²⁴ Kahan BD. Drug therapy – cyclosporine. *N Engl J Med* 1989;321:1725-38.
- ²⁵ Ciafaloni E, Massey JM, Tucker-lipscomb B, Sanders DB. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis : an open- label pilot study . *Neurology* 2001;56:97- 99.
- ²⁶ Meriggioli MN, Rowin J, Richman JG, Leurgans S. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *Ann N Y Acad Sci* 2003;998:494-9.
- ²⁷ Zaja F, Russo D, Fuga G, Perella G, Baccarani M : Rituximab for myasthenia gravis developing after bone marrow transplant. *Neurology* 2000;55:1062-3.
- ²⁸ Rowin J, Meriggioli MN, Tuzun E, Leurgans S, Christadoss P: Etanercept treatment in corticosteroid-dependent myasthenia gravis. *Neurology* 2004;63:2390-2.
- ²⁹ Vidic-Dankovic B, Kosaec D, Damjanovic M, Apostolski S, Isakovic K, Bartlett RR: Leflunomide prevents the development of experimentally induced myasthenia gravis. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:273-81.
- ³⁰ Pinching JA, Pters DK. Remission of myasthenia gravis following plasma-exchange. *Lancet* 1976;2:1373- 6.

-
- ³¹ Dau PC, Lindstrom JM, Cassel CK, Denys EH, Shev EE, Splitter LE. Plasmapheresis and immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1977;297:1134-40.
- ³² Pinching AJ, Peters DK, Davis JN. Plasma exchange in myasthenia gravis. *Lancet* 1977;1:428-9.
- ³³ Rasura EL, Bick A, Brunner NG, Namba T, Grob D. High-dose intravenous immunoglobulin in the management of myasthenia gravis. *Arch Inter Med* 1986;146:1365-8.
- ³⁴ Gajdos P, Chevret S, Clair B, Tranchant C, Chastang C. Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. *Myasthenia Gravis Clinical Study. Ann Neurol* 1977;41:789-96.
- ³⁵ Fung JJ. Tacrolimus and transplantation: a decade in review. *Transplantation* 2004;77:S41-S43.
- ³⁶ Konishi T, Yoshiyama Y, Takamori M, Yagi K, Mukai E, Saida T; Japanese FK506 MG Study Group. Clinical study of FK506 in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2003Nov;28(5):570-4
- ³⁷ Yoshikawa H, Mabuchi K, Yasukawa Y, Takamori M; Yamada M. Low-dose tacrolimus for intractable myasthenia gravis. *J Clin Neurosci*. 2002;9(6):627- 8. .
- ³⁸ Nagane Y, Utsugisawa K, Obara D, Kondoh R, Terayama Y, Efficacy of low-dose FK506 the treatment of myasthenia gravis. A randomized pilot study. *Eur Neurol* 2005; 53: 146-50.

-
- ³⁹ Lambert EH, Elmquist D. Quantal components of end plate potentials in the myasthenic syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1971; 183 : 183-99.
- ⁴⁰ Albuquerque EX, Rash JE, Mayer RJ, Satterfield JR: An electrophysiological and morphological study of the neuromuscular junction in patients with myasthenia gravis. *Exp Neurol* 1976 ; 51 : 536-63.
- ⁴¹ Changeux JP. The acetylcholine receptor : its molecular biology and biotechnological prospects. *BioEssays* 1980 ; 10 : 48-54.
- ⁴² Kuffer SW, Yoshikami D. The number of transmitter molecules in a quantum and estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J Physiol* 1975 ; 251 : 465-82.
- ⁴³ Adams PR. Transmitter action at end plate membrane. En : Salptere MM (Ed) *The vertebrate neuromuscular junction*. New York, Alan R Liss 1987, pp 317-59.
- ⁴⁴ Maselli RA, Soliven BC. Analysis of the organophosphate-induced electromyographic response to repetitive nerve stimulation : Paradoxical response to edrophonium and D-tubocurarine. *Muscle Nerve* 1991 ; 16 : 1193-203.
- ⁴⁵ Wernig A. Estimation of statistical release parameters from crayfish and frog neuromuscular junctions. *J Physiol* 1975 ; 244 : 207-221.
- ⁴⁶ Rahamimoff R, Erulkar SD, Lev Tov A, Meiri H. Intracellular and extracellular calcium ions in transmitter release at the neuromuscular synapse. *Ann NY Acad Sci* 1978 ; 307 : 583-98.

⁴⁷ Peper K, Sterz R. Effect of drugs and antibodies on the post synaptic membrane of the neuromuscular junction. *Ann NY Acad Sci* 1981 ; 377 : 519-43.

⁴⁸ Stockbridge N, Moore JW. Dynamics of intracellular and its possible relationship to phasic transmitter release calcium and facilitation at the frog neuromuscular junction. *J Neurosci* 1984 ; 4 : 803 -11.

⁴⁹ Brockes JP, Berg DK, Hall ZW: The biochemical properties and regulation of acetylcholine receptors in normal and denevated muscle. *Cold Spring Harbor Symp on Quant Biol.* 1976; 40 : 253-62.

⁵⁰ Drachman DB, Adams RN, Josikef LF, Pestronk A, Stanley EF. Antibody-mediated mechanisms of ACh receptor loss in myasthenia gravis: Clinical relevance. *Ann NY Acad Sci* 1981; 377: 175-88.

⁵¹ Shyng SL, Xu R, Salpeter MM. Cyclic AMP stabilizes the degradation of original junctional acetylcholine receptors in denervated muscle. *Neuron* 1991; 6 : 469-75.

⁵² Appel SH, Anwyl R, McAdams MW, Elias S. Accelerated degradation and acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74 : 2130-4.

⁵³ Cohen SA, Pumplin DW. Clusters of intramembrane particles associated with binding sites for α -bungarotoxin in cultured chick myotubes. *J Cell Biol* 1979; 82 : 494-516, 1992.

⁵⁴ Tzartos SJ, Barkas T, Cung MT, Kordossi a, Loutrari H, Marraud M, Papadouli I, Sakarellos C, Sophianos D, Tsikaris V. The main immunogenic

region of the acetylcholine receptor. Structure and role in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 1991; 8(4) : 259-70.

⁵⁵ Gomez CM, Richman DP. Anti-acetylcholine receptor antibodies directed against the α -bungarotoxin binding site induce a unique form of experimental myasthenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 ; 80(13) : 4089-93.

⁵⁶ Maselli RA, Nelson DJ, Richman DP : Effects of a monoclonal anti-acetylcholine receptor antibody on the avian end plate. *J Physiol* 1989 ; 411 : 271-83.

⁵⁷ Nastuk WL, Plescia OJ, Osserman KE. Changes in serum complement activity in patients with myasthenia gravis. *Proc Soc Exp Biol* 1960 ; 105 : 177-84.

⁵⁸ Tsujihata M, Yoshimura T, Satoh A, Kinoshita I, Matsuo H, Mori M, Nagataki S. Diagnostic significance of IgG, C3 and C9 at limb muscle motor end-plate in minimal myasthenia gravis. *Neurology* 1989 ; 39(10) : 359-63.

⁵⁹ Pascuzzi RM, Campa JF. Lymphorrhage localized to the muscle end plate in myasthenia gravis. *Arch Pathol Lab Med* 1988 ; 112 : 934-7.

⁶⁰ Maselli RA, Richman DP, Wollmann RL. Inflammation at the neuromuscular junction in myasthenia gravis. *Neurology* 1991 ; 41(9): 1497-504.

⁶¹ Rash JE, Albuquerque EX, Hudson CS, Mayer RF, Satterfield JR. Studies of human myasthenia gravis : electrophysiological and ultrastructural evidence compatible with antibody attachment to acetylcholine receptor complex. *Ann NY Acad Sci* 1976 ; 73 : 4584-8.

⁶² Dahlback O, Elmqvist D, Johns TR, Radner S, Thesleff S. An electrophysiological study of the neuromuscular junction in myasthenia gravis. *J Physiol* 1961 ; 156 : 336-43.

⁶³ Elmqvist D, Hofmann WW, Kugelberg J, Quastel DM.. An electrophysiological investigation of neuromuscular transmission in myasthenia gravis. *J Physiol* 1964 ; 174 : 417-34.

⁶⁴ Cull-Candy SG, Miledi R, Trautmann A. End-plate currents and acetylcholine noise at normal and myasthenic human end plates. *J Physiol* 1979 ; 287 : 247-65.

⁶⁵ Cull-Candy SG, Miledi R, Trautmann A, Uchitel OD. On the release of transmitter at normal, myasthenia gravis and myasthenic syndrome affected human end-plates. *J Physiol* 1980; 299 : 621-38.

⁶⁶ Sahashi K, Engel AG, Linstrom JM, Lambert EH, Lennon VA.. Ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3) at the end plate in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1978; 37(2) : 212-223.

⁶⁷ Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vinceny A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine Kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies .*Nat Med* 2001; 7: 365- 8.

⁶⁸ Linaje Y, Hoch W, Beeson D, Vincent A. The agrin/muscle-specific kinase pathway: new targets for autoimmune and genetic disorders at the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 2002;25: 4- 16.

⁶⁹ Aarli JA, Stefansoon K, Marton LS, Wollman RL. Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin. *Clin Exp Immunol* 1990;82:284-8.

⁷⁰ Voltz RD, Albrich WC, Nagele A, Schumm F, Wick M, Freiburg A, Gautel M, Thaler HT, Kirchner T, Hohlfer R. Paraneoplastic myasthenia gravis: detection of anti-MGT30(titin) antibodies predicts thymic epithelial tumor. *Neurology* 1997;49(5):1454-7.

⁷¹ Takamori M, Motomura M, Kawaguchi N, Nemoto Y, Hattori Y, Yoshikawa H, Otsuka K. Anti-ryanodine receptor antibodies and FK506 in myasthenia gravis. *Neurology* 2004; 62:1894-6.

⁷² Skele GO, Aarli JA, Gilhus NE. Titin and ryanodine receptor antibodies in myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2006;183:19-23.

⁷³ Aguis MA, Zhu S, Kirvan CA, Schafer AL, Lin MY, Fairclough RH, Oger JJ, Aziz T, Aarli JA. Rapsyn antibodies in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1998;841:516-521.

⁷⁴ Drachman DB, McIntosh KR, Reim J, Balcer L. Strategies for treatment of myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1993 ; 681 : 515 – 28.

⁷⁵ Fambrough DM, Drachman DB, Satyamurti S. Neuromuscular junction in Myasthenia Gravis: decreased acetylcholine receptors. *Science* 1973;182(109):293-5.

⁷⁶ Drachman DB. How to recognize an antibody-mediated autoimmune disease: criteria. *Research publications Association for research in nervous and mental disease.* New York: Raven Press 1990; 68: 183-6.

-
- ⁷⁷ Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA, Whittingham S, Duane DD. Antibody to acetylcholine receptor in Myasthenia Gravis: Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* 1976;26(11):1054-9.
- ⁷⁸ Vincent A, Newson-Davis J. Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for Myasthenia Gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48:1246-52, 1985.
- ⁷⁹ Drachman DB. Myasthenia Gravis. *New England J Med* 1994;330:1797-810.
- ⁸⁰ Protti MP, Manfredi AA, Horton RM, Bellone M, Conti-Tronconi BM. Myasthenia Gravis: recognition of a human autoantigen at the molecular level. *Immunol Today* 1993; 14:363-68.
- ⁸¹ Engel AG, Sahashi K, Lambert EH, Howard FM. The ultrastructural localization of the acetylcholine receptor, immunoglobulin G and the third and ninth complement components at the motor end-plate and their implications for the pathogenesis of myasthenia gravis. In : Aguayo AJ, Karpati G, eds. *Current topics in nerve and muscle research*. Amsterdam: Excerpta medica 1979; 111-22.
- ⁸² Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, Pestronk A, Winkelstein JA, Fishbeck KH, Kao I. Myasthenia Gravis: study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med* 1977;296(3):125-31.
- ⁸³ Patrick J, Lindstrom J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973; 180:871-2.
- ⁸⁴ Berman PW, Patrick J. Experimental myasthenia gravis. A murine system. *J Exp Med* 1980;151(1):204-23.

-
- ⁸⁵ Hertel G, Mertens HG, Reuther P, Ricker K. The treatment of myasthenia gravis with azathioprine. In: Dau PC, ed. Plasmapheresis and the immunobiology of myasthenia gravis. Boston: Houghton Mifflin 1979;315-28.
- ⁸⁶ Dau PC, Lindstrom JM, Cassel CK, Clark EC. Plasmapheresis in myasthenia gravis and polymyositis. In: Dau PC, ed. Plasmapheresis and the immunobiology of myasthenia gravis. Boston: Houghton Mifflin 1979;229-47.
- ⁸⁷ Lisak RP, Levinson AI, Zweiman B. Autoimmune aspects of myasthenia gravis. *Concepts Immunopathol* 1985;2:65-101.
- ⁸⁸ Ashikawa T, Appel SH. Immunopathologic events at the endplate in myasthenia gravis. *Springer Sem Immunopathol* 1985; 8:177-196.
- ⁸⁹ Levinson AI, Zweiman B, Lisak RP. Immunopathogenesis and treatment of myasthenia gravis. *J Clin Immunol* 1987;7(3):187-97.
- ⁹⁰ Engel AG, Tsujimata M, Lindstrom JM, Lennon VA. The motor endplate in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis: a quantitative ultrastructural study. *Ann NY Acad Sci* 1976;274:60-79.
- ⁹¹ Sterz R, Holdfield R, Rajki K. Effector mechanisms in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1986;9:306-312.
- ⁹² Engel AG, Arahata K. The membrane attack complex of complement at the endplate in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1987; 505:326-32.
- ⁹³ Kao I, Drachman DB. Myasthenic immunoglobulin accelerates acetylcholine receptor degradation. *Science* 1977;196(4289):527-9.

⁹⁴ Drachman DB, Angus CW, Adams RN, Michelson JD, Hoffman GJ. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N Engl J Med* 1978;298(20):1116-22.

⁹⁵ Pumplin DW, Drachman DB. Myasthenic patients 'IgG causes redistribution of acetylcholine receptors: freeze-fracture studies. *J Neurosci* 1983;3(3):576-84.

⁹⁶ Drachman DB, Adams RN, Josifek LF, Self SG. Functional activities of autoantibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1982;307(13):769-75.

⁹⁷ Howard FM Jr, Lennon VA, Finley J, Matsumoto J, Elveback LR. Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1987;505:526-38.

⁹⁸ Kachalsky SG, Aladjem M, Barchan D, Fuchs S. The ligand binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor: immunological analysis. *FEBS lett* 1993;318(3):264-8.

⁹⁹ Vincent A, Whiting PJ, Schlupe M, Heidenreich F, Lang B, Roberts A, Willcox N, Newsom-Davis J.. Antibody heterogeneity and specificity in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1987;505: 106-20.

¹⁰⁰ Lindstrom J, Shelton D, Fujii Y. Myasthenia Gravis. *Adv Immunol* 42:233-84, 1988.

¹⁰¹ Tzartos SJ, Cung MT, Demange P, Loutrari H, Mamalaki A, Marraud M, Papadouli I, Sakarellos C, Tsikaris V. The main immunologic region (MIR)

of the nicotinic acetylcholine receptor and the anti-MIR antibodies. *Mol Neurobiol* 1991;5(1):1-29.

¹⁰² Nielsen FC, Rodgaard A, Djurup R, Somnier F, Gammelteft S.. A triple antibody assay for the quantitation of plasma IgG subclass antibodies to acetylcholine receptors in patients with myasthenia gravis. *J Immunol Methodes* 1985;83(2):249-58.

¹⁰³ Drachman DB, de Silva S, Ramsay D, Pestronk A. Humoral pathogenesis of Myasthenia Gravis. *Ann NY Acad Sci* 1987;505:90-105.

¹⁰⁴ Mosman S, Vincent A, Newsom-Davis J. Myasthenia Gravis without acetylcholine receptor antibody: a distinct disease entity. *Lancet* 1986;1(8473):116-9.

¹⁰⁵ Yamamoto T, Vincent A, Ciulla TA, Lang B, Johnston I, Newsom-Davis J. Seronegative myasthenia gravis: a plasma factor inhibiting agonist-induced acetylcholine receptor function copurifies with IgM. *Ann Neurol* 1991;30(4):550-7.

¹⁰⁶ Drachman DB, de Silva S, et al. "Sero-negative" myasthenia gravis: a humorally mediated variant of myasthenia. *37:Suppl 1:214,Abstract*, 1987.

¹⁰⁷ Brooks EB, Pachner AR, Drachman DB, Kantor FS. A sensitive rosetting assay for detection of acetylcholine receptor antibodies using BC3H-1 cells, positive results in "antibody negative" myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1990;28(1):83-93.

¹⁰⁸ Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME.. Experimental autoimmune myasthenia gravis: cellular and humoral immune responses. *Ann NY Acad Sci* 1976;274:283-99.

¹⁰⁹ Sommer N, Harcourt GC, Willcox N, Besson D, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology* 1991; 41(8) :1270-6.

¹¹⁰ Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Gower Medical Publishing Ltd., London; 1986.

¹¹¹ Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-296.

¹¹² Nelfjes JJ, Ploegh HL. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol Today* 1992;13:179-184.

¹¹³ Sprent J, Webb SR. Function and specificity of T-cells subsets in the mouse. *Adv Immunol* 1987; 41:39-133.

¹¹⁴ Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signaling pathway determines the outcome of T-cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:445-480.

¹¹⁵ Abramsky O, Aharonov A, Webb C, Fuchs S. Cellular immune response to acetylcholine receptor rich-fraction, in patients with myasthenia gravis. *Clin Exp immunol* 1975;19(1):11-6.

¹¹⁶ Hohfeld R, Toyka KV, Michels M, Heininger K, Conti-troconti B, tzartos SJ.. Acetylcholine receptor-specific human T-lymphocyte lines. *Ann NY Acad Sci* 1987;505:27-38.

¹¹⁷ Richman DP, Agius MA. Acquired myasthenia gravis. *Immunopathology. Neurol Clin of North America* 1994; vol 12(2): 273-84.

-
- ¹¹⁸ Newson-Davis J, Harcourt G, et al. T cell reactivity in myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2:suppl;101-108, 1989.
- ¹¹⁹ Melms A, Chrestel S, Schalke BC, Wekerle H, Mauron A, Ballivet M, Barkas T. Autoimmune T lymphocytes in myasthenia gravis. Determination of target epitopes using T lines and recombinant products of the mouse nicotinic acetylcholine receptor gene. *J Clin Invest* 1989;83(3):785-90.
- ¹²⁰ Melms A, Malcherek G, Germ U, Wietholter H, Muller CA, schoepfer R, Lindstrom J.. T cells from normal and myasthenic individuals recognize the human acetylcholine receptor: heterogeneity of antigenic sites on the alpha-subunit. *Ann Neurol* 1992;31(3):311-8..
- ¹²¹ Moiola L, Protti MP, Manfredi AA, Yuen MH, Howard JF Jr, Conti-Tronconi BM. T-helper epitopes on the human nicotinic acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1993;681:198-218.
- ¹²² Tesch H, Hohlfeld R, Toyka KV. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements in the thymus of myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol* 1989;21(2-3):169-76.
- ¹²³ Grunewald J, Ahlberg R, Lefvert AK, Dersimonian H, Wigzell H, Janson CH. Abnormal T-cell expansion and V-gene usage in myasthenia gravis patients. *Scand J Immunol* 1991;34(2):161-8.
- ¹²⁴ Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG): a model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med* 1975;141(6):1365-1375.
- ¹²⁵ Toyka KV, Drachman DB, Pestronk A, Kao I. Myasthenia Gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* 1975;190(4212):397-399.

¹²⁶ Richman DP, Wollmann RL, Masselli Ra, Gomez CM, Corey AL, Aguis MA, Fairclough RH. Effector mechanisms of myasthenic antibodies. *Ann NY Acad Sci* 1993;681:264-273.

¹²⁷ Engel AG. Morphologic and immunopathologic findings in myasthenia gravis and in congenital myasthenic syndromes. *J Neurol Neurosurg psychiatry* 1980;43:577-589.

¹²⁸ Richman DP, Gómez CM, Berman PW, Burres SA, Fitch FW, Arnason BG.. Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies can cause experimental myasthenia. *Nature* 1980;286(5779):738-9.

¹²⁹ Protti MP, Manfredi AA, Straub C, Howard JF Jr, Conti-Tronconi BM. CD4+ T-cell response to the human acetylcholine receptor alpha-subunit in myasthenia gravis: A study with synthetic peptides. *J Immunol* 1990;144(4):1276-1281.

¹³⁰ Bellone M, Ostlie N, Lei S, Manfredi AA, Conti-Tronconi BM. T-helper function of CD4+ cells specific for defined epitopes on the acetylcholine receptor in congenic mouse strains. *J Autoimmun* 1992;5(1):27-46.

¹³¹ Shigemoto K, Kubos, Maruyama N, Hato N, Yamada H, Jie C, Kobayashi N, Nominoki K, Abe Y, Veda N, Natsuda S. Induction of myasthenia gravis by immunization against muscle-specific kinase. *J Clin Invest* 2006 Marzo 23.

¹³² Vincent A, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor antibody characteristics in Myasthenia Gravis.II. Patients with penicillamine-induced myasthenia or idiopathic myasthenia of recent onset. *Clin Exp Immunol* 1982;49(2):266-72.

-
- ¹³³ Tesis Doctoral: Dr. Manuel Lopez-Cano. Miastenia Gravis y Timoma. Factores Pronosticos. UAB 2001.
- ¹³⁴ Berrith S, Gaud C. Evaluation of T cell subsets in MG using anti-T cell monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1981;45:1-8.
- ¹³⁵ Berrith S, LeBrigand H, Levasseur P, Gaud C, Bach JF. Depletion of helper/inducer T cells after thymectomy in myasthenia gravis patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1983;28(2):272-81.
- ¹³⁶ Haynes BF, Harden EA, Olanow CW, Eisenbarth GS, Wechsler AS, Hensley LL, Roses AD. Effect of thymectomy on peripheral lymphocyte subsets in MG: selective effect on T cells in patients with thymic atrophy. *J Immunol* 1983;131(2):773-77.
- ¹³⁷ Miller AE, Hudson J, Tindall RS. Immune regulation in myasthenia gravis: Evidence for an increased suppressor T-cell population. *Ann Neurol* 1982;12(4):341-47.
- ¹³⁸ Engel WK, Trotter JL. Thymic epithelial cells contain acetylcholine receptor. *Lancet* 1977;1:1310-1311.
- ¹³⁹ Monell R. Acetylcholine binding sites on peripheral blood an CSF mononuclear cells from myastenic patients. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:848-849.
- ¹⁴⁰ Richman DP, Antel JP, Burns JB, Amason BG. Nicotinic acetylcholine receptor on human lymphocytes. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:427-435.

¹⁴¹ Shore A, Limatiblul S . Identification of two serum components regulating the expression of T lymphocyte function in childhood myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1979;301:625-29.

¹⁴² Kelly RE, Keesy JC. Immunoregulation of total IgG synthesis in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:403-10.

¹⁴³ Mischak RP, Dau PC. Lymphocyte binding antibodies and suppressor cell activity in myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:436-46.

¹⁴⁴ Zilko PJ, Dawkins RL. Genetic control of suppressor lymphocyte function in myasthenia gravis: Relationship of impaired suppressor function HLA-B8/DRW3 and cold reactive lymphocytotoxic antibodies. *Clin Immunol* 1979;14:222-30.

¹⁴⁵ Newson-Davis J, Willcox N. Thymus cells in myasthenia gravis selectively enhance production of antiacetylcholine receptor antibody by autologous blood lymphocytes. *N Engl J Med* 1981;305:1312-18.

¹⁴⁶ Lefvert AK. Anti-idiotypic antibodies against the receptor antibodies in myasthenia gravis. *Scand J Immunol* 1981;13:493-97.

¹⁴⁷ Lefvert AK, Pirskanen R. Anti-idiotypic antibodies, acetylcholine receptor antibodies and disturbed neuromuscular function in healthy relatives to patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1985;9:41-53.

¹⁴⁸ Dwyer DS, Bradley RJ. Naturally occurring anti-idiotypic antibodies in MG patients. *Nature* 1984;30:611-14.

¹⁴⁹ Stephansson K, Dieperink ME. Sharing of antigenic determinants between the nicotinic acetylcholine receptor and proteins in *Escherichia*

Coli, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumoniae*. *N Engl J Med* 1984;312:221-25.

¹⁵⁰ Dwyer DS, Vakil M. Idiotypic network connectivity and a possible case of myasthenia gravis. *J Exp Med* 1986;164:1310-18.

¹⁵¹ Erlanger BF, Cleveland WL. The autoidiotypic route to antireceptor antibodies. *Ann NY Acad Sci* 1986;475:219-26.

¹⁵² Castleman B, Norris EH. The pathology of the thymus gland in myasthenia gravis. *Medicine* 1949;28:27-58.

¹⁵³ Buckingham JM., Howard FM.Jr, Bernatz PE, Payne WE, Harrison EG,O'Brian PC, Weiland LE. The value of thymectomy in myasthenia gravis: a computer –assisted matched study . *Ann Surg* 1976;184:453-8.

¹⁵⁴ Sommer N, Willcox N, Harcourt GC, Newsom-Davis J. Myasthenic thymus and thymoma are selectively enriched in acetylcholine receptor–reactive T cells. *Ann Neurol* 1990;28(3):312-9.

¹⁵⁵ Wekerle H, Paterson B. Striated muscle fibers differentiate in monolayer cultures of adult thymus reticulum. *Nature* 1975;256:493-4.

¹⁵⁶ Kao I, Drachman, DB. Thymic muscle cells bear acetylcholine receptors:possible relation to myasthenia gravis. *Science* 1977; 195(4273): 74-5.

¹⁵⁷ Wheatley LM, Urso, D, Tumas K, Maltzman J, Loh E, Levinson AI.. Molecular evidence for the expresión of nicotinic acetylcholine receptor alfa chain in mouse thymus. *J Immunol* 1992;148(10):3105-9.

¹⁵⁸ Aoki T, Drachman DB, Asher DM, Gibbs CJ Jr, Bahmanyar S, Wolinsky JS. Attempts to implicate viruses in myasthenia gravis. *Neurology* 1985;35(2):185-92.

¹⁵⁹ Schwimmbeck PL, Dyrberg T, Drachman DP, Oldstone MB: Molecular mimicry and myasthenia gravis. An autoantigenic site of the acetylcholine receptor alpha-subunit that has biologic activity and reacts immunochemically with herpes simplex virus. *J Clin Invest* 1989;84(4):1174-80.

¹⁶⁰ Stefansson K, Dieperink ME, Richman DP, Gomez CM, Martons LS. Sharing of antigenic determinants between the nicotinic acetylcholine receptor and proteins in *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, and *Klebsiella pneumoniae*. Possible role in the pathogenesis of myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1985;312(4):221-5.

¹⁶¹ Carlsson B, Wallin J, Pirskanen R, Mattel G, Smith CI. Different HLA DR-DQ associations in subgroups of idiopathic myasthenia gravis. *Immunogenetics* 1990;31(5-6):285-90.

¹⁶² Oosterhuis HJGH. Clinical aspects. In: de Baets MH, Oosterhuis HJGH, eds. *Myasthenia gravis*. Boca Raton, Fla.:CRC Press, 1993; 13-42.

¹⁶³ Sieb JP. Myasthenia Gravis: emerging new therapy options. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:303-7.

¹⁶⁴ Genkins G, Sivak M, Tartter P. Treatment strategies in myasthenia gravis. In: Penn AS et al (Eds). *Myasthenia gravis and related disorders. Experimental and clinical aspects. Ann NY Acad Sci* 1993 ; 681 : 603 - 8.

¹⁶⁵ Grob D, Brunner NG, Namba T. The natural course of myasthenia gravis and effect of therapeutic measures. *Ann NY Acad Sci* 1981;377:652-69.

¹⁶⁶ Osserman KF. Progress report of mestinon bromide (pyridostigmine bromide). *Am J Med* 1955; 19 : 737-9.

¹⁶⁷ Swab RS. Win 8077 in treatment of sixty myasthenia gravis patients : A twelve months report. *Am J Med* 1955; 19 : 734-6.

¹⁶⁸ Osserman KE, Kaplan I. Rapid diagnostic test for myasthenia gravis : Increased muscle strength, without fasciculations, after administration of edrophonium. *JAMA* 1952; 150 : 265-8.

¹⁶⁹ Block RJ, Stallcup WB. Agonist action of neostigmine on acetylcholine receptors of cultured mammalian muscle. *Brain Res* 1979; 172 : 378-81.

¹⁷⁰ Argov Z, Wirguin I. Drugs and the neuromuscular junction : Pharmacotherapy of transmission disorders and drug induced myasthenic syndromes. En : Lisak RP (Ed.) Handbook of myasthenia and myasthenic syndromes. Marcel Dekker Inc., Nueva York 1994; 295-319.

¹⁷¹ White MC, DeSilva P, Havard CWH. Plasma pyridostigmine levels in myasthenia gravis. *Neurology* 1981, 31 : 141-150.

¹⁷² Spiro AJ. Disorders of the myoneural junction. In: Berg BO, editor. Principals of Child Neurology. New York: McGraw-Hill; 1996.p.1657-64.

¹⁷³ Ponseti JM. Miastenia gravis. Manual terapéutico. Springer Verlag. Barcelona 1995.

¹⁷⁴ Rothenberg DM, Berns AS, Barkin R. Bromide intoxication secondary to pyridostigmine bromide therapy. *JAMA* 1990; 263; 1121-2.

¹⁷⁵ Sieb JP, Engel AG. Ephedrine: effects on neuromuscular transmission. *Brain Res* 1993;623:167-71.

¹⁷⁶ Lundh H, Nilsson O, Rosen I. Improvement in neuromuscular transmission in myasthenia gravis by 3,4-diaminopyridine. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 1985;234:374-7.

¹⁷⁷ Perlo VP, Poskanzer DC, Schwab RS, Viets HR, Osserman KE, Genkins G. Myasthenia gravis: Evaluation of treatment in 1,355 patients. *Neurology* 1966;16:431-9.

¹⁷⁸ Gronseth Gs, Barohn RJ. Practice Parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2000;55:7-15.

¹⁷⁹ DeFilippi VJ, Richman DP, Ferguson MK. Transcervical thymectomy for myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg* 1994;57:194-7.

¹⁸⁰ Masaoka A, Yamakawa Y, Niwa H, et al. Extended thymectomy for myasthenia gravis patients: a 20 year review. *Ann Thorac Surg* 1996;62:853-9.

¹⁸¹ Jaretzki III A, Steinglass KM, Sonett JR. *Seminars in Neurology*/ 2004/Volume 24, Number 1.

¹⁸² Case JP. Old and new drugs used in rheumatoid arthritis: a historical perspective. Part 1: the older drugs. *Am J Ther* 2001;8:123-43.

¹⁸³ Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroids in allergic disease. *Allergy* 2001;56:928-36.

¹⁸⁴ Parrillo JE, Fauci AS. Mechanisms of glucocorticoid action on immune processes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1979; 19 : 179-201.

¹⁸⁵ Tindall RS. Humoral immunity in myasthenia gravis : effects of steroids and thymectomy. *Neurology* 1980; 30 : 554-7.

¹⁸⁶ Abramsky O, Aharonov A, Teitelbaum D, Fuchs S. Myasthenia gravis and acetylcholine receptor effect of steroids in clinical course and cellular immune response to acetylcholine receptor. *Arch Neurol* 1975; 32 : 684-7.

¹⁸⁷ Kaplan I, Flakely BT, Pavlath GK, Travis M, Blau HM. Steroids induce acetylcholine receptors on cultured human muscle : implications for myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8100-4.

¹⁸⁸ Van Wilgenburg H. The effect of prednisolone on neuromuscular transmission in the rat diaphragm. *Eur J Pharmacol* 1979; 55: 355-61.

¹⁸⁹ Mann JD, Johns TR, Campa JF. Long term administration of corticosteroides in myasthenia gravis. *Neurology* 1976;26:729-40.

¹⁹⁰ Seybold ME, Drachman DB. Gradually increasing doses of prednisone in myasthenia gravis. Reducing the hazards of treatment *N Engl J Med* 1974;290:81-4.

¹⁹¹ Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med* 1998;339:292-9.

¹⁹² Warmolts JR, Engel WK. Benefit from alternate-day prednisone in myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1972;286:17-20.

-
- ¹⁹³ Richaud-Patin Y, Vega-Boada F, Vidaller A, Llorente A. Multidrug resistance-1(MDR-1) in autoimmune disorders IV. P-glycoprotein overfunction in lymphocytes from myasthenia gravis patients. *Biomed Pharmacoth* 2004;58:329-324.
- ¹⁹⁴ Matell G, Bergström K, Franksson C. Effects of some immunosuppressive procedures on myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1976;274:659-676.
- ¹⁹⁵ Galanaud P, Crevon MC, Erard D, Wallon C, Dormont J. Two processes for B cell triggering by T independent antigens as evidenced by the effect of azathioprine. *Cell Immunol* 1976; 22: 83-92.
- ¹⁹⁶ Elion Gb. Significance of Azathioprine metabolites. *Proc R Soc Med* 1972;65:257-60.
- ¹⁹⁷ Bromberg MB, Wald JJ, Forshew DA, Feldman EL, Albers JW. Randomized trial of azathioprine or prednisone for initial immunosuppressive treatment of myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 1997;150:59-62.
- ¹⁹⁸ Kuks JB, Djojoatmodijo S, Oosterhuis HJ. Azathioprine in myasthenia gravis: observation in 41 patients and a review of literature. *Neuromuscul Disord* 1991;1:423-31.
- ¹⁹⁹ Witte AS, Cornblath DR, Parry GJ. Azathioprine in the Treatment of Myasthenia Gravis. *Ann Neurol* 1984;15(6):602-5.
- ²⁰⁰ Matell G. Immunosuppressive drugs : azathioprine in the treatment of myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 1987; 505 : 588-94.

²⁰¹ Hohfeld R, Michels M, Heininger K. Azathioprine toxicity during long term immunosuppression of generalized myasthenia gravis. *Neurology* 1988; 38 : 258-61.

²⁰² Kissel Jt, Levy RJ, Mendell JR, Griggs RC. Azathioprine toxicity in neuromuscular disease. *Neurology* 1986;36:35-9.

²⁰³ Evans WE, Hon YY, Bomgaars L. Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 2001;!9:2293-301.

²⁰⁴ McLeod HL, Siva C. The thiopurine S-methyltransferase gene locus-implications for clinical pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2002;3:89-98.

²⁰⁵ Zhu LP, Cupps TR, Whalen G, Fauci AS. Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation, and differentiation of human B cells. *J Clin Invest* 1987;79:1082-90.

²⁰⁶ Perez MC, Buot WL, Mercado Danguilan C. Stable remissions in myasthenia gravis. *Neurology* 1981; 31: 32-7.

²⁰⁷ Niakan E, Harati Y, Rolak LA. Immunosuppressive drug therapy in myasthenia gravis. *Arch Neurol* 1986;43:155-6.

²⁰⁸ Borel JF, Feurer C, Gubler HV. Biological effect of cyclosporin A: a new anti-lymphocytic agent. *Agent actions* 1976;6:468-75.

-
- ²⁰⁹ Kronke M, Leonard WJ, Depper JM. Cyclosporine A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1984;81:5214-8.
- ²¹⁰ Matasuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000;47:119-25.
- ²¹¹ Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ. Cyclophilin : a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 1984;226:544-7.
- ²¹² Schalke BCG, Kappos L, Rohrbach E. Cyclosporine A vs. Azathioprine in the treatment of myasthenia gravis : final results of a randomized, controlled, double blind clinical trial. *Neurology* 1988; 38 (Suppl) 1:135 (abstract).
- ²¹³ Word AJ, Maurer G, Niederberger W. Cyclosporine: pharmacokinetics, metabolism, and drug interactions. *Transplant Proc* 1988; 20 (suppl 1): 641.
- ²¹⁴ Beveridge T. Pharmacokinetics and metabolisms of cyclosporin A. In white DJG, ed. *Cyclosporin A: Proceedings of an international conference on Cyclosporin A.* Amsterdam: Elsevier biomedical press, 1982:35.
- ²¹⁵ Rosano TG, Freed BM, Cerilli J, Iempert N. Immunosuppressive metabolites of cyclosporine in the blood of renal allograft recipients. *Transplantation* 1986; 42: 262.
- ²¹⁶ Yee GC, Leenon TP, Gmur DJ, Kennedy MS, Deeg HJ. Age dependent cyclosporine pharmacokinetics in the marrow transplant recipients. *Clin pharmacol Ther* 1986 ; 40: 438.

²¹⁷ Klahr S, Ishidoya S, Morrisey J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995;26:141-6.

²¹⁸ Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999;397:530-4.

²¹⁹ Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant* 1996;10:77-84.

²²⁰ European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995;345:1321-5.

²²¹ Allison Ac, Eugeni EM. Mycophenolate mofetil and its mechanism of action. *Immunopharmacology* 200;47:85-118.

²²² Chaudhry V, Cornblath DR, Griffen JW, O'Brein R, Drachman DB. Mycophenolate mofetil: a safe and promising immunosuppressant in neuromuscular disease. *Neurology* 2001;56:94- 6.

²²³ Caponnetto C, Rossi E, Primavera A. Mycophenolate mofetil: a new immunosuppressive approach. Successful treatment in a case of myasthenia gravis associated with incomplete lupus erythematosus syndrome and hepatitis C virus infection.

²²⁴ Lipsky JJ: Mycophenolate mofetil. *Lancet* 1996;348:1357-9.

²²⁵ Sollinger HW for the U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in

the primary cadaveric renal allograft recipients . *Transplantation* 1995 ;60:225-32.

²²⁶ Behrend M. A review of clinical experience with the novel immunosuppressive drug mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Clin Nephrol* 1996;45:336-41.

²²⁷ Hauser RA, Malek AR, Rosen R. Successful treatment of a patient with severe refractory myasthenia gravis using mycophenolate mofetil. *Neurology* 1998;51:912-3.

²²⁸ Meriggioli MN, Ciafaloni E, Al Hayk KA, Rowin J, Tucker-Lipscomb B, Massey JM, Sanders DB. Mycophenolate mofetil for myasthenia gravis: an analysis of efficacy, safety, and tolerability. *Neurology* 2003;61:1438-40.

²²⁹ Goluzko E, Deng C, Poussin MA, Christadoss P: Tumor necrosis factor receptor p55 and p75 deficiency protects mice from developing experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2002;122:85-93.

²³⁰ Behan PO, Sakir RA, Simpson JA. Plasmaexchange combined with immunosuppressive therapy in myasthenia gravis. *Lancet* 1979;2:438-40.

²³¹ Kornfeld P, Fox S, Maier K, MahjoubM. Ten years experience with therapeutic apheresis in a community hospital. *J Clin Apheresis* 1992; 7: 63-8.

²³² Pasternak JF, Hagemann J, Adams A, Alistair S, Gardner TH. Exchange transfusion neonatal myasthenia gravis. *J Pediatr* 1981; 99: 644-6.

²³³ Miller RG, Milner-Brown HS, Dau PC. Antibody negative acquired myasthenia gravis : successful therapy with plasma exchange (carta). *Muscle Nerve* 1981; 4: 255.

²³⁴ Roses AD, Olanow W, McAdams MW, Russell JM, Lane M. No direct correlation between serum antiacetylcholine receptor antibody levels and clinical state of individual patients with myasthenia gravis. *Neurology* 1981; 31: 220-4.

²³⁵ Pollack S, Cunningham-Rundles C, Smithwick EM. High dose intravenous gammaglobulin for autoimmune neutropenia. *N Engl J Med* 1982; 307: 253.

²³⁶ Sultan Y, Kazatchkine MD, Maisonneuve P. Anti-idiotypic supression of autoantibodies to factor VIII (antihæmophilic factor) by high dose intravenous gammaglobulin. *Lancet* 1984; 2: 765-7.

²³⁷ Furusho K, Tetsuro K, Hiroyaki N. High dose intravenous gammaglobulin for Kawasaki disease. *Lancet* 1984; 2: 1055-7.

²³⁸ Imbach P, Barandum S, D'Apuzzo V, Baumgartner G, Hirt A, Morell A, Rossi E, Schoni M, Vest M, Wagner HD. High dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenia purpura in childhood. *Lancet* 1981;i: 1228-30.

²³⁹ Genkins G, Horowitz SH, Kornfeld P. Studies in myasthenia gravis: Gamma globulin and staging. Scientific Session, Myasthenia Gravis Foundation, New York, 1976.

²⁴⁰ Gajdos Ph, Outin H, Elkharrat D. High dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; i: 406.

-
- ²⁴¹ Fateh-Moghadam A, Wick M, Besinger U, Geursen RG. High dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; i: 848-9.
- ²⁴² Devathassan G, Kueh YK, Chong PN. High dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; i: 809-10.
- ²⁴³ Ippoliti G, Cosi V, Piccolo G, Lombardi M, Mantegaz R. High dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *Lancet* 1984; i: 809.
- ²⁴⁴ Arsura E, Bick A, Brunner N, Tatsuji N, Grob D. High dose intravenous immunoglobulin in the management of myasthenia gravis. *Arch Int Med* 1986;146: 1365-8.
- ²⁴⁵ Bonaventura I, Ponseti JM, Español T, Matias-Guiu J, Codina-Puiggros A. High dose intravenous gammaglobulin for myasthenia gravis. *J Neurol* 1987; 234: 363.
- ²⁴⁶ Fort JM, Ponseti JM. Altas dosis de globulina gamma intravenosa en el tratamiento de la miastenia grave. *Med Clin (Barc)* 1988; 91: 325-8.
- ²⁴⁷ Edan G, Landgraf F. Experience with intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis : a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 55-6.
- ²⁴⁸ Thornton CA, Ballow M. Safety of intravenous immunoglobulin. *Arch Neurol* 1993; 50: 136-7.
- ²⁴⁹ Dalakas MC. High dose intravenous immunoglobulin and serum viscosity : risk of precipitating thromboembolic events. *Neurology* 1994; 44: 223-6.

-
- ²⁵⁰ Steg RE, Lefkowitz DM. Cerebral infraction following intravenous immunoglobulin therapy for myasthenia gravis. *Neurology* 1994; 44 (6): 1180-1.
- ²⁵¹ Meiner Z, Ben-Hur T, River Y, Reches A. Aseptic meningitis as complication of intravenous immunoglobulin therapy for myastehnia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56 (7): 830-1.
- ²⁵² Amato AA, Barohn RJ, Jackson CE. Inclusion body myositis: treatment with intravenous immunoglobulin. *Neurology* 1994; 44: 1516-8.
- ²⁵³ Ayliffe W, Harney M, Roberts SC, Lavin M. Uveitis after antineutrophil cytoplasmic antibody contamination of immunoglobulin replacement therapy. *Lancet* 1992; 339: 558-9.
- ²⁵⁴ Tamn E, Hajinazarian M, Bay W. Acute renal failure resulting from intravenous immunoglobulin therapy. *Arch Neurol* 1993; 50: 137-40.
- ²⁵⁵ Chan Lam D, Fitzsimons EJ, Douglas WS. Alopecie after immunoglobulin infusion. *Lancet* 1987; i: 1436.
- ²⁵⁶ Buckley RH, Schiff RI. The use of intravenous immunoglobulin in immunodeficiency diseases. *N Eng J Med* 1991; 325: 110-7.
- ²⁵⁷ Dwyer JM. Manipulating the immune system with immune globulin. *New Eng J Med* 1992; 326: 107-16.
- ²⁵⁸ Ferrero B, Durelli I, Cavallo R, Dutto A, Aimo G, Pecchio F, Bergamasco B. Therapies for exacerbation of myasthenioa gravis. The

mechanism of action of intravenous high dose immunoglobulin G. *Ann NY Acad Sci* 1993; 681: 563-6.

²⁵⁹ Durelli L, Ferrero B, Aimo G. Anti-idiotypic mechanisms of high dose gammaglobulin in myasthenia gravis. *Neurology* 1992; 42 (S): 307.

²⁶⁰ Blascyk R, Westhoff U, Grosse-Wilde H. Soluble CD4, CD8 and HLA molecules in commercial in immunoglobulins preparations. *Lancet* 1993; 341: 789-90.

²⁶¹ Lam L, Whitsett CF, McNicoll JM, Hodge TW, Hooper J. Immunologically active proteins in intravenous immunoglobulin. *Lancet* 1993; 342: 678.

²⁶² Pirofsky B, Reid RH, Bardana et al. Myasthenia gravis treated with purified antithymocyte antiserum. *Neurology* 1979; 29: 112-6.

²⁶³ Leovey A, Szobor A, Szegedi G, et al. Myasthenia gravis : ALG treatment of seriously ill patients. *Eur Neurol* 1975; 13: 422-32.

²⁶⁴ Okumura S, McIntosh K, Drachman DB. Oral administration of acetylcholine receptor : effects on experimental myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1994; 36: 704-13.

²⁶⁵ Ahlberg R, Yi Q, Pirskanen R, et al. Treatment of myasthenia gravis with anti-CD4 antibody : improvement correlate to decreased T cell autoreactivity. *Neurology* 1994; 44: 1732-7.

²⁶⁶ Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. FK506, a novel immunosuppressant

isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiotics* 1987;40(9):1249-55.

²⁶⁷ Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H. Fk506 a novel immunosuppressant isolated from a streptomyces. II immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiotics* 1987;40(9):1256-65.

²⁶⁸ Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Suzuki T, Asano T, Uematsu T, Goto T, Hori S, Kenmochi T, Nakagoori T. Effect of a new immunosuppressive agent, FK506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transpl Proc* 1987;19(1pt2):1284-6.

²⁶⁹ Todo S, Podesta L, lee PH, Lai HS, Chapman F, Nalesnik MA, Makowka L, Starzl TE,. Orthotopic liver transplantation in dogs receiving FK506. *Transpl Proc* 1987;19 (5Suppl.6):64-7.

²⁷⁰ European Fk506 Multicenter Liver Study Group. Randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in prevention of liver allograft rejection. *Lancet* 1994;344:423-8.

²⁷¹ The US Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of Tacrolimus (FK506) and Cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *New Eng Journal Med* 1994;Vol.331 No.17:1110-5.

²⁷² Ellis D. Clinical use of tacrolimus (FK506) in infants and children with renal transplants. *Pediatr Nephrol* 1995;9:487-94.

²⁷³ Laskow DA, Neylan JF 3rd, Shapiro RS, Pirsch JD, Vergne-Marini PJ, Tomlanovich SJ. The role of tacrolimus in adult kidney transplantation: a review. *Clin Transplant* 1998;12(6):489-503.

-
- ²⁷⁴ McDiarmid SV. The use of tacrolimus in paediatric liver transplantation. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 1998;26:90-102.
- ²⁷⁵ Sokal EM, Antunes H, Beguin C, Bodeus M, Wallemacq P, De ville de Goyet J, Reding R, Janssen M, Buts JP, Otte JB. Early signs and risk factors for the increased incidence of EBV related posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 1997;64(10):1438-42.
- ²⁷⁶ Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH . A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 1989;341(6244):755-7.
- ²⁷⁷ Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 1989;341(6244):758-60.
- ²⁷⁸ Tesis Doctoral Dr. Edo Cots. Inmunosupresión con FK506(Tacrolimus) en el trasplante hepatico humano. UAB; 1996.
- ²⁷⁹ Tacrolimus. Editores Brunet M, Campistol JM, Rimola A. *Drug Farma* ;2000.
- ²⁸⁰ Starzl TE, Todo S, Fung JJ, Demetris AJ, Venkataramanan R, Jain A. FK506 for liver, kidney, and pancreas transplantation. *Lancet II* 1989;2(8670):1000-4.
- ²⁸¹ Todo SS, Fung JJ, Demetris AJ, Jain A, Venkataramanan R, Starzl TE. Early trials with FK506 as primary treatment in liver transplantation. *Transpl Proc* 1990; 22(SI):13-6.

²⁸² Lewis DW, Jenkins RL, Burke PA, Winn KM, Shaffer D, Lopez R, Monaco AP. FK506 rescue therapy in liver transplant recipients with drug-resistant rejection. *Transplant Proc* 1991;23(S6):2989-91.

²⁸³ McDiarmid SV, Klintmalm G, Busuttil RW, et al. FK506 rescue therapy in liver transplantation: Outcome and complications. *Transplant Proc* 1991;23(S6):2996-9.

²⁸⁴ Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H. Structure of FK 506: A novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J Am Chem Soc* 1987; 109:5031-3.

²⁸⁵ Honbo T, Kobayashi M, Hane K, Hata T, Ueda Y. The oral dosage form of FK506. *Transplant Proc* 1987; 19(suppl 6) : 17-22.

²⁸⁶ Wallemacq PE, Firdaous I, Hassoun A. Improvement and assessment of enzyme-linked immunosorbent assay to detect low FK 506 concentrations in plasma or whole blood within 6 hours. *Clin Chem* 1993; 39:1045-49.

²⁸⁷ Thomson A.W. FK 506- how much potential ? *Immunology Today* 1989;10:6-9.

²⁸⁸ Kung L, Halloran PF. Immunophilins may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation* 2000;70:327-35.

²⁸⁹ Peters David H, Fitton A, Greg L, and Faulds P. and D. Tacrolimus . A review of its pharmacology and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drug* 1993; 46(4) : 746- 94.

-
- ²⁹⁰ Schreiber SL, Liu J, Albers MW, Karmacharya R, Koh E, Martin PK, Rosen MK, Standaert RF, Wandless TJ. Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signalling pathways. *Transplant Proc* 1991;23(6):2839-44.
- ²⁹¹ Klee C, Crouch TH, Krinks MH. Calcineurin a calcium-calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:6270-3.
- ²⁹² Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and Cyclosporin A. *Nature* 1991;352(6338):803-7.
- ²⁹³ Baumann G. Molecular Mechanism of Immunosuppressive Agents. *Transpl Proc* 1992;24(4 Suppl.2):4-7.
- ²⁹⁴ Venkataramanan R, Jain A, Cadoff E, Warty V, Iwasaki K, Nagase K, Krajack A, Imventarza O, Todo S, Fung JJ. Pharmacokinetics of FK506 : preclinical and clinical studies . *Transplant Proc* 1990; 22 (Suppl. 1): 52-6.
- ²⁹⁵ Habucky K, Flowers F, Warty VS, Venkataramanan R, Fung JJ. Blood protein binding (BPB) of FK506 in various species. Abstract . *Pharmaceutical Research* 1992; 9:534.
- ²⁹⁶ Warty VS, Venkataramanan R, Zendeihrouh P, Mc Kaveney T, Chao J. Distribution of FK 506 in plasma lipoproteins in transplant patient . *Transplant Proc* 1991 ; 23: 954-5.
- ²⁹⁷ Japanese FK 506 study group . Japanese study of FK506 on Kidney transplantation : the Benefit of monitoring the whole blood FK506 concentration . *Transplant Proc* 1991 ; 23: 3085-88.

²⁹⁸ Sattler M, Guengerich F.P. , Yun C.H., Christians V, Sewing K.F. Cytochrome P-450 3 A enzymes are responsible for biotransformation of FK 506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metabolism and Disposition*. 1992; 20(5):753-61.

²⁹⁹ Vicent SH, Karaman BV , Painter SK, Chiu SL. In vitro metabolism of FK506 in rat, rabbit, and human liver microsomes: identification of a major metabolite and of cytochrome P450 3A as the major enzymes responsible for its metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992, 294: 454- 60.

³⁰⁰ Christians V, Braun F, Khoisan N, Schimidt M, Schiebel HM . High performance liquid chromatography mass spectrometry of FK506 and its metabolites in blood , bile, and urine of liver grafted patients. *Transplant Proc* 1991, 23: 2741- 44.

³⁰¹ Christians V, Kruse C, Kownatzki R, Schiebel HM, Schwinzer R. Measurement of FK506 by HPLC and isolation and characterization of its metabolites. *Transplant Proc* 1991; 23: 940-1.

³⁰² Iwaski K, Shiraga T , Nagase K, Tozuda Z, Noda K, Sakuma S, Fujitsu T, Shimatani K, Sato A, and Fujioka M. Isolation , identification and biological activities of oxidative metabolites of FK506 , a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug metabolism and Disposition*. 1993; 21(6): 971-7.

³⁰³ Jain AB , Venkataramanan R, Cadoff E, Fung JJ, Todo S, Krajack A, Starzl TE.. Effect of hepatic dysfunction and T tube clamping on FK506 pharmacokinetics and trough concentration. *Transplant Proc* 1990; 22(suppl. 1): 57-9.

-
- ³⁰⁴ Jain AB, Abu-Elmagd K, Abdallah H, Warty V, Fung JJ, Todo S, Starzl TE, Venkataramanan R. Pharmacokinetics of FK506 in liver transplant recipients after continuous intravenous infusion. *Journal of Clinical Pharmacology*. 1993; 33(7): 606-11.
- ³⁰⁵ Abu-Elmagd K, Fung J, Alessiani M, Jain A, Venkataramanan R, Warty VS, Takaya S, Todo S, Shannon WD, Starzl TE. The effect of graft function on FK506 plasma levels, dosage, and renal function with particular reference to the liver. *Transplantation* 1991; 52(1): 71-7.
- ³⁰⁶ Cadoff EM, Venkataramanan R, Krajack A, Jain AS, Fung JJ, Todo S, Starzl TE. Assay of FK506 in plasma. *Transplant Proc* 1990; 22(suppl.1): 50-2.
- ³⁰⁷ Shaeffer MS, Collier D, Sorrell MF. Interaction between FK506 and erythromycin. *Ann pharmacother* 1994;28:280-1.
- ³⁰⁸ Venkataramanan R, Jain A, Warty VS, Abu-Elmagd K, Alessiani M, Lever J, Krajack A, Flowers J, Mehta S, Zukerman S. Pharmacokinetics of FK506 in transplant patients. *Transplant Proc* 1991;23(6):2736-40.
- ³⁰⁹ Mañez R, Martin M, Raman D, Silverman D, Jain A, Warty V, Gonzalez-Pinto I, Kusne S, Starzl TE. Fluconazole therapy in transplant recipients receiving FK506. *Transplantation* 1994;57(10):1521-3.
- ³¹⁰ Miele L, Venkataramanan R, Yokoyama I, Warty VJ, Starzl TE. Interaction between FK506 and clotrimazole in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1991;52(6):1286-71.

³¹¹ Shapiro R, Venkataramanan R, Warty VS, Scantlebury VP, Rybka W, McCauley J, Fung JJ, Starzl TE. FK506 interaction with danazol. *Lancet* 1993;341(8856):1344-5.

³¹² Zeevi A, Eiras G, Burckart G, Jain AB, Kragack A, Venkataramanan R, Todo S, Fung J, Starzl TE, Duquesnoy RJ. Bioassay of plasma specimens from liver transplant patients on FK506 immunosuppression. *Transplant Proc* 1990;22(1):60-3.

³¹³ Jain AB, Venkataramanan R, Fung J, Burckart G, Emeigh J, Diven W, Warty V, Abu-Elmagd K, Todo S, Alessiani M. Pharmacokinetics of cyclosporine and nephrotoxicity in orthotopic liver transplant patients rescued with FK506. *Transpl Proc* 1991;23(6):2777-9.

³¹⁴ Gallego C, Sanchez P, Planells C, Sanchez S, Monte E, Roma E, Sanchez J, Pallardo LM. Interaction between probucol and cyclosporine in renal transplant patients. *Ann Pharmacother* 1994;28(7-8):940-3.

³¹⁵ Keogh A, Day R, Critchley L, Duggin G, Baron D. The effect of food and cholestyramine on the absorption of cyclosporine in cardiac transplant recipients. *Transplant Proc* 1988;20(1):27-30.

³¹⁶ Landgraf R, Landgraf-Leurs MM, Nusser J, Hillebrand G, Illnerl WD, Abendroth WO, Land W. Effect of somatostatin analogue (SMS201-995) cyclosporine levels. *Transplantation* 1987; 44(5):724-5.

³¹⁷ Steeves M, Abdallah HY, Venkataramanan R, Burckart GJ, Ptachcinski RJ, Abu-Elmagd K, Jain AK, Fung F, Todo S, Starzl TE. In-vitro interaction of a novel immunosuppressant, FK506, and antacids. *J Pharm Pharmacol* 1991;43(8):574-7.

-
- ³¹⁸ McDiarmid SV, Colonna JO 2nd, Shaked A, Ament MA, Busuttil RW. Differences in oral FK506 dosage requirements between adult and pediatric liver transplantation patients. *Transplantation* 1993;55(6):1328-32.
- ³¹⁹ Christians U, Guengerich FP, Schmidt G. In-Vitro metabolism of FK506, cytochrome P450 and drug interactions. *Ther Drug Monit* 1993;15(2):145.
- ³²⁰ Rui X, Flowers J, Warty VS, . Drug interactions with FK506. *Phar Res* 1992;9:314.
- ³²¹ Pichard L, Fabre I, Domergue J, Joyeux H, Maurel P. Effect of FK506 on human hepatic cytochromes P-450: Interaction with CyA. *Transplant Proc* 1991;23(6):2791-3.
- ³²² Wu YM, Venkataramanan R, Suzuki M, Zhu Y, Abadía H, Emeigh J, Burckart GJ, Warty VS, Fung JJ, Todo S. Interaction between FK506 and cyclosporine in dogs. *Transplant Proc* 1991;23(6):2797-9.
- ³²³ Zeevi A, Duquesnoy R, Eiras G, Rabinowich H, Todo S, Makowka L, Starzl TE. Immunosuppressive effect of FK-506 on in vitro Lymphocyte alloactivation: Synergism with cyclosporine A. *Transplant Proc* 1987;19(5 Suppl 6):40-4.
- ³²⁴ McCaurley J,. The nephrotoxicity of FK506 as compared with cyclosporine. *Current opinion in Nephrology and Hypertension* 1993;2:662-9.
- ³²⁵ Honig PK, Woosley RL, Zamani K, Conner DP, Cantilena LR Jr. Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin. *Clin pharmacol Ther* 1992;52(3):231-8.

-
- ³²⁶ Ludden TM. Pharmacokinetic interactions of the macrolide antibiotics. *Clin Pharmacokinet* 1985;10(1):63-79.
- ³²⁷ Henry DA, MacDonald IA, Kitchingman G, Bell GD, Langman MJ.. Cimetidine and ranitidine: Comparison of effects on hepatic drug metabolism. *Br Med J* 1980;281(6243):775-7.
- ³²⁸ Sorkin EM, Darvey DL. A review of cimetidine drug interactions. *Drug Intell Clin Pharm* 1983;17:110-20.
- ³²⁹ Martin MF. Nephrotoxic effects of immunosuppression. *Mayo Clin Proc* 1994;69:191-2.
- ³³⁰ Porayko MK, Textor SC, Krom RA, Hay JE, Gores GJ, Richards TM, Crotty PH, Beaver SJ, Steers JL, Weisner RH. Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK506 and cyclosporine regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Proc* 1994;69(2):105-11.
- ³³¹ Sheiner PA, Mor E, Chodoff L, Glabman S, Emre S, Schwarte ME, Millar CM.. Acute renal failure associated with the use of ibuprofen in two liver transplant recipients on FK506. *Transplantation* 1994;57(7):1132-33.
- ³³² McCauley J, Takaya S, Fung J, Tzakis A, Abu-Elmagd K, Jain A, Todo S, Starzl TE. The question of FK506 nephrotoxicity after liver transplantation. *Transplant Proc* 1991;23(1 pt 2):1444 -47.
- ³³³ Burke MD, Omar G, Thomson AW, Whiting PH: Inhibition of the metabolism of cyclosporine by human liver microsomas by FK506. *Transplantation* 1990;50:901-2.

³³⁴ Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, Noda K. Distribution and protein binding of FK-506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol* 1994;46(2):113-7.

³³⁵ Winkler M, Ringe B, Baumann J, Loss M, Wonigeit K, Pichlmayr R. Plasma vs Whole blood for therapeutic drug monitoring of patients receiving FK-506 for immunosuppression. *Clin Chem* 1994;40(12):2247-53.

³³⁶ Jorgensen KA, Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N. Calcineurin Phosphate Activity and immunosuppression. A Review on the Role of Calcineurin Phosphate Activity and the Immunosuppressive Effect of Cyclosporin A and Tacrolimus. *Scand J Immunol* 2003;57:93-8.

³³⁷ Gonschior AK, Christians U, Winkler M, Schiebel HM, Linck A, Sewing KF. Simplified high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for measurement of Tacrolimus and its metabolites and cross-validation with microparticle enzyme immunoassay. *Therapeutic Drug Monitoring* 1995;17(5):504-10.

³³⁸ Grenier FC, Luczkiw J, Bergmann M, Lunneta S, Morrison M, Bolonski D, Shoemaker K, Kobayashi M. A whole blood FK506 assay for the IMx analyzer. *Transplant Proc* 1991;23(6):2748-9.

³³⁹ Tamura K, Kobayashi M, Hashimoto K, Kojima K, Nagase K, Iwasaki K, Kaizu T, Tanaka H, Niwa M. A highly sensitive method to assay FK506 levels in plasma. *Transplant Proc* 1987;19(5 Suppl. 6):23-9.

³⁴⁰ Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, Christians U, Winkler M, Fitzsimmons WE, Lieberman R. Consensus

Document: Therapeutic monitoring of Tacrolimus(FK-506). Therapeutic Drug Monitoring 1995;17(6):606-14.

³⁴¹ Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, VanThiel D, Armitage J, Jain A, McCauley J. Adverse effects associated with the use of FK506. Transplant Proc 1991;23(6):3105-8.

³⁴² Tzakis A, Fung JJ, Todo S, Reyes J, Green M, Starzl TE. Use of FK506 in pediatric patients. Transplant Proc 1991;23(1pt2):924-7.

³⁴³ Tzakis A, Reyes J, Todo S, Nour B, Shapiro R, Jordan M, McCauley J, Armitage J, Fung JJ, Starzl TE. Two- years experience with FK506 in pediatric patients. Transplant Proc 1993; 25(1pt1):619-21.

³⁴⁴ Reding R, de Ville de Goyet J, Sokal E, Moulin D, Clement de Cleto S, Wallemacq P, Otte JB. Compassionate use of FK506 in pediatric liver transplantation: a pilot study. Transplant Proc 1991;23(6):3002-4.

³⁴⁵ Klintmala GBG. US multicenter prospective randomized trial comparing FK506 to cyclosporine after liver transplantation. Primary outcome analysis. Abstract. Presented at The American society of Transplant Surgeons 19th Annual Scientific Meeting, Houston, Texas, May 1993.

³⁴⁶ Moutabarrak A, Ishibashi M, Fukunaga M, Kameota H, Takano Y, Jiang H, Kokado Y, Takahara S. FK506 mechanism of nephrotoxicity. Stimulatory effect on endothelin secretion by cultured kidney cells. Transplant Int 1992;5(Suppl 1):S93-7.

³⁴⁷ Yamada K, Sugisaki Y, Suzuki S, Akimoto M, Amemiya H, Yamanaka N. New morphological changes induced by FK506 in a short period in the rat kidney and the effect of superoxide dismutase and OKY-046 on THEM :

the relationship of FK506 nephrotoxicity to lipid peroxidation and change in production of thromboxane A₂ in the Kidney. *Transplant Int* 1992;5(Suppl 1):S564-7.

³⁴⁸ Carrol PB, Boschero AC, Li M-Y, Tzakis AG, Starzl TE, Atwater I. Effect of immunosuppressant FK-506 on glucose-induced insulin from adult rat islets of Langerhans. *Transplantation* 1991; 51:275-8.

³⁴⁹ Van Hoof JP; Van Duijnhoven EM, Christiaans MHL. Tacrolimus and Glucose metabolism. *Transplant Proc* 1999;31:49S-50S.

³⁵⁰ Fung J, Abu-Elmagd K, Jain A, Gordon R, Tzakis A, Todo S, Takaya S, Alessiani M, Demetris A, Bronster O. A randomized trial of primary liver transplantation under immunosuppressive with FK506 vs cyclosporine. *Transpl Proc* 1991;23(6):2977-88.

³⁵¹ Esquivel CO, Egawa H, Cox K. Experience with FK506 conversion therapy in pediatric liver transplantation (OLT). Abstract. Presented en "The American Society of Transplant Physicians 12th Annual Meeting" . Houston Texas ,Mayo 1993.

³⁵² Eidelman BH, Abu-Elmagd K, Wilson J, Fung JJ, Alessiani M. Neurologic complications of FK506. *Transplant Proc* 1991;23:3175-8.

³⁵³ European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK-506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 1997; 64 (3): 436-43.

³⁵⁴ Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK-506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63 (7):977-83

³⁵⁵ Freise CE, Rowley H, Lake J, Hebert M, Ascher NL, Roberts JP. Similar clinical presentation or neurotoxicity following FK-506 and cyclosporine in a liver transplant recipient. *Transplant Proc* 1991; 23(6):3173-4.

³⁵⁶ Lopez OL, Martinez AJ, Torre-Cisneros J. Neuropathologic findings in liver transplantation: a comparative study of cyclosporine and FK506. *Transplant Proc* 1991; 23:3181-2.

³⁵⁷ Tzakis AG, Reyes J, Todo S, Green M, Ohya T. FK506 versus cyclosporine in pediatric liver transplantation. *Transplant Proc* 1991;23:3010-5.

³⁵⁸ Todo S, Fung JJ, Tzakis A, Demetris AJ, Jain A, Alessiani M, Takaya S, Day R, Gordon R, Starzl TE. One hundred ten consecutive primary orthotopic liver transplantation under FK506 in adults. *Transplant Proc* 1991;23(1pt2):1397-402.

³⁵⁹ Alessiani M, Kusne S, Martin FM, Fung JJ, Jain A, Todo S, Simmons R, Starzl TE. Infections with FK506 immunosuppression: preliminary results with primary therapy. *Transplant Proc* 1990;22(Suppl 1):44-6.

³⁶⁰ Alessiani M, Kusne S, Martin M, Jain A, Abu-Elmagd K, Moser J, Todo S, Fung J, Starzl TE. Infections in adult liver transplant patients under FK506 immunosuppression. *Transplant Proc* 1991;23(1pt):1501-3.

³⁶¹ Green M, Tzakis A, Reyes J, Nour B, Todo S, Starzl TE. Infectious complications of pediatric liver transplantation under FK506. *Transpl Proc* 1991;23(6):3038-9.

³⁶² Nalesnik MA, Demetris AJ, Fung JJ, Starzl TE. Lymphoproliferative disorders arising under immunosuppression with FK506: initial observations in a large transplant population. *Transplant Proc* 1991;23(1pt2):1108-10.

³⁶³ Reyes J, Tzakis A, Green M, Nour B, Nalesnik M, Van Thiel D, Martin M, Breinig MK, Fung JJ, Cooper M. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring under primary FK506 immunosuppression. *Transplant Proc* 1991;23(6):3044-6.

³⁶⁴ Yoshikawa H, Iwasa K, Satoh K, Takamori M. FK506 Prevents Induction of Rat Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis. *J Autoimmunity* 1997;10(1):11-6.

³⁶⁵ Evoli A , Schino CD , Marsili F , Punzi C , Successful treatment of myasthenia gravis with tacrolimus. *Muscle Nerve* 2002;25:111-14.

³⁶⁶ Ponseti JM, Fort JM, Espin E, Armengol M. Tacrolimus (FK506) en el tratamiento de la miastenia gravis resistente a la prednisona. Resultados preliminares de 20 casos. *Med Clin (Barc)*2002;118(3):117.

³⁶⁷ Utsugisawa K, Nagane Y, Yoezawa H, Obara D, Kondoh R, Tohgi H. Effects of FK506 on myasthenia gravis patients with high interleukin-2 productivity in peripheral blood mononuclear cells. *Muscle Nerve* 2003;27(2):245-8.

³⁶⁸ Wakata N, Saito T, Tanaka S, Hirano T, Oka K. Tacrolimus hydrate(FK506): Therapeutic effects and selection of responders in the treatment of myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg* 2003;106819:5-8.

³⁶⁹ Iwamoto T, Ioka M, Naito Y, Kagawa Y, Kuzuhara S, Kojima M. Successful treatment by tacrolimus in two patients with Osserman's grade III intractable myasthenia gravis and elderly Ib. *Yakugaku Zasshi* 2004;124(4):237-41.

³⁷⁰ Shimojima Y, Gono T, Yamamoto K, Hoshi K, Matsuda M, Yoshida K, Ikeda S. Efficacy of tacrolimus in treatment of polymyositis associated with myasthenia gravis. *Clin Rheumatol* 2004;23(3):262-5.

³⁷¹ Kawaguchi N, Yoshiyama Y, Nemoto Y, Munakata S, Fukutake T, Hattori T. Low-dose Tacrolimus treatment in thymectomised and steroid-dependent myasthenia gravis. *Curr Med Res Opin* 2004;20(8):1269-73.

³⁷² Konishi T, Yoshiyama Y, Takamori M, Saida T. Long-term treatment of generalised myasthenia gravis with FK506 (tacrolimus). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76(3):448-50.

³⁷³ Tsukaguchi M, a M, Ikeda K, Urai Y, Sasaki I, Deguchi K, Rouge T, Takeuchi H, Kuriyama S. Low-dose tacrolimus for two cases of myasthenia gravis with invasive thymoma that relapsed shortly after thymectomy. *J Neurol Sci* 2005;23(1-2):85-8.

³⁷⁴ Shimojima Y, Matsuda M, Gono T, Ishii W, Tokoda T, Ikeda S. Tacrolimus in refractory patients with myasthenia gravis: coadministration and tapering of oral prednisolone. *J Clin Neurosci* 2006;13(1):39-44.

³⁷⁵ Kakisaka Y, Haginoya K, Yokohama H, Ishitobi M, Wakusawa K, Sato I, Togashi N, Kitamura T, Fukuyo N, Yoshihara Y, Inuma K. Successful treatment of a 2-year-old girl with intractable myasthenia gravis using Tacrolimus. *Brain Dev* 2006;28(8):534-6.

³⁷⁶ Tada M, Shimohata T, Tada M, Oyake M, Igarashi S, Onodera O, Naruse S, Tanaka K, Tsuji S, Nishizawa M. Long-term therapeutic efficacy and safety of low-dose tacrolimus(FK506) for myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2006;247(1):17-20.

³⁷⁷ Ponseti JM, Azem J, Fort JM, López-Cano M, Vilallonga R, Gamez J, Armengol M. Experience with starting tacrolimus postoperatively after transternal extended thymectomy in patients with myasthenia gravis. *Curr Med Res Opin* 2006;22(5):885-95.

³⁷⁸ Marks R. Cellular functions of immunophilins . *Physiol Rev* 1996;76:631-49.

³⁷⁹ Timerman AP, Ogubumni E, Freund E, Wiederrecht G, Marks AR, Fleischer S. The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKPB-12 to the calcium release channel skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1993;268(31):22992-9.

³⁸⁰ Sinkins WG, Goel M, Estacion M, Schilling WP. Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *J Biol Chem* 2004;279:34521-9.

³⁸¹ Davies TH, Ning YM, Sánchez ER. Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506. *Biochemistry* 2005;44:2030—8.

³⁸² Migita K, Tanaka F, Abriu S. The role of mitochondria in nitric oxide-mediated thymocyte apoptosis. *Immunol Lett* 2003;90:87-91.

³⁸³ Kang CB, Feng L, Chia J, Yoon HS. Molecular characterization of FK-506 binding protein 38 and its potential regulatory role of the anti-apoptotic protein Bcl.2. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:30-8.

³⁸⁴ Migita K, Eguchi K, FK506-mediated T-cell apoptosis induction. *Transpl Proc* 2001;33:2292-3.

³⁸⁵ Tanahashi N, Sato H, Nogawa S, Satoh T, Kawamura M, Shimoda M. A case report of giant cell myocarditis and myositis observed during the clinical course of invasive thymoma associated with myasthenia gravis. *Keio J Med* 2004;53(1):30-42.

³⁸⁶ Takahashi H, Kawaguchi N, Nemoto Y, Hattori T. High-dose intravenous immunoglobulin for the treatment of MuSK antibody positive seronegative myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2006 Jul 27;(Pend. Publicación) .