



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Bernardo José de Albuquerque Lima

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Myasthenia Gravis: Revision and New Therapeutic Strategies” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Susana Sousa, da Dra. Raquel Silva e da Professora Doutora Eliana Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2018

**Bernardo José de Albuquerque Lima**

**Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Myasthenia Gravis: Revision and New Therapeutic Strategies”, sob orientação da Dr.<sup>a</sup> Susana Sousa, da Dr.<sup>a</sup> Raquel Silva e da Professora Doutora Eliana Souto e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.**

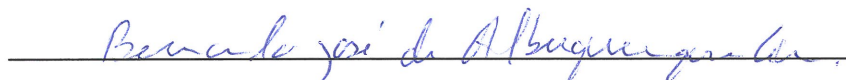
**Setembro 2018**



Eu, Bernardo José de Albuquerque Lima estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2012153999 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Myasthenia Gravis: Revision and New Therapeutic Strategies” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 6 de setembro de 2018.



(Bernardo José de Albuquerque Lima)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, irmã e avós por estarem sempre ao meu lado ao longo destes cinco anos e sobretudo por todo o vosso apoio.

Aos meus amigos e colegas por tudo o que vivemos em Coimbra.

À Professora Doutora Eliana Souto por toda disponibilidade e orientação dada.

À Dr.<sup>a</sup> Susana Sousa, ao Dr. João Reis, à Dr.<sup>a</sup> Carla Branco e à Célia pela amizade, compreensão e apoio a orientar-me durante o estágio.

À Dr.<sup>a</sup> Raquel Silva e a toda a fantástica equipa do gabinete de apoio da CEIC pela compreensão, apoio, confiança e disponibilidade a orientar-me durante o estágio.

A todos os meus colegas de estágio pela amizade e boa disposição.

Um sincero obrigado a todos vós

## **Parte I**

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária: Farmácia Sitália

## **Parte II**

Relatório de Estágio na Comissão de Ética para a Investigação Clínica

## **Parte III**

Monografia “Myasthenia Gravis: Revision and New Therapeutic Strategies”

## **Parte I**

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária: Farmácia Sitália

## Índice

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Análise SWOT.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Pontos Fortes.....</b>	<b>9</b>
3.1 Equipa Técnica.....	9
3.2 Programa de Estágio.....	10
3.3 Consulta Farmacêutica .....	10
3.4 Utentes Fidelizados .....	11
3.5 Aprendizagem Contínua.....	12
3.6 Fitoterapia e Homeopatia .....	12
<b>4. Pontos Fracos.....</b>	<b>12</b>
4.1 Lacunas no Plano de Estudos .....	12
4.2 Acompanhamento Farmacêutico.....	12
4.3 Stocks Reduzidos .....	13
<b>5. Oportunidades .....</b>	<b>13</b>
5.1 Formações Complementares ao Plano de Estágio .....	13
5.2 Conhecimento e Competências.....	14
5.3 Papel do Farmacêutico .....	14
<b>6. Ameaças .....</b>	<b>15</b>
6.1 Valor do Medicamento .....	15
6.2 Massificação de Postos de Venda de MNSRM .....	16
6.3 Contexto Socioeconómico.....	16
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>17</b>
<b>8. Referências .....</b>	<b>18</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**MNSRM** – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

**MSRM** – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

**SNS** – Serviço Nacional de Saúde



## **I. Introdução**

O papel do farmacêutico enquanto profissional de saúde e especialista do medicamento, reflete-se no acompanhamento de todo o percurso do fármaco desde a sua investigação até ao seu uso racional e responsável.

Atualmente, o farmacêutico intervém em variados ramos da atividade farmacêutica sejam eles, a investigação, análises, regulamentação, distribuição, indústria, farmácia hospitalar e de oficina, sendo estes alguns dos exemplos.

Aliada a uma formação adequada, conferida no grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, a formação contínua para atualização dos conhecimentos científicos e técnicos são fundamentais, uma vez que as farmácias são o primeiro contacto que o utente tem com um profissional de saúde.

O estágio curricular em farmácia comunitária é o culminar da formação académica, permitindo a consolidação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo de cinco anos de curso, orientado por uma equipa experiente e em contacto direto com o utente.

A Farmácia Sitália está situada na rua General Humberto Delgado em Coimbra, próxima de vários serviços, o que me permitiu um ambiente com grande afluência de pessoas. Além da localização, as referências que tinha e os serviços farmacêuticos prestados foram decisivos para a realização do estágio curricular nesta farmácia.

O presente relatório descreve o estágio curricular realizado na Farmácia Sitália no período de 22 de janeiro a 27 de abril de 2018 sob orientação da Dr.<sup>a</sup> Susana Sousa.

## **2. Análise SWOT**

O acrónimo *SWOT* faz referência às iniciais de quatro palavras em inglês, *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*, em português, pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças, respetivamente. <sup>1</sup>

Com esta análise crítica relativamente ao estágio frequentado, pretende-se avaliar a pertinência do mesmo na integração e interligação dos conhecimentos teóricos na prática profissional, mas também a adequação do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Desta forma, o relatório de estágio apresenta a forma de uma análise *SWOT*, em que serão discutidas as dimensões interna e externa do mesmo. A análise interna é constituída pelos pontos fortes que contribuíram para a minha formação no decorrer do estágio e, pelos pontos fracos que representam as adversidades enfrentadas. A análise externa é constituída pelas oportunidades e ameaças que influenciaram o decorrer do estágio.

## **3. Pontos Fortes**

### **3.1 Equipa Técnica**

A equipa técnica que constitui a Farmácia Sitália é composta por profissionais qualificados, empenhados, responsáveis e dinâmicos, nomeadamente, um Diretor Técnico, duas Farmacêuticas e uma colaboradora com funções administrativas.

O papel do farmacêutico enquanto profissional de saúde e a sua intervenção na comunidade são a chave para o sucesso e satisfação dos utentes desta farmácia.

O acolhimento e formação por parte da equipa foram fundamentais no decorrer de todo o estágio. A confiança depositada pela equipa na aplicação dos meus conhecimentos e aquisição de independência no desempenho do papel farmacêutico foram decisivos para adquirir novas competências em ambiente de farmácia comunitária. Neste sentido, senti valorizada por toda a equipa técnica a minha presença no desempenho de um serviço farmacêutico de qualidade.

Além disso, durante todo o estágio, a orientação e supervisão farmacêutica prestando auxílio sempre que necessário, contribuíram não só para uma maior segurança no atendimento, mas também para aumentar a minha motivação.

### **3.2 Programa de Estágio**

A organização e planificação do estágio foram fundamentais para me enquadrar dentro do funcionamento e organização interna da Farmácia Sitália, apresentando as tarefas que iria desempenhar.

Numa fase inicial, estive mais tempo em contacto com as encomendas, recordando assim os nomes de marca dos medicamentos, os diferentes laboratórios de genéricos e os restantes produtos de saúde, dermofarmácia e cosmética. Esta fase de *back office* permitiu-me recordar os conhecimentos científicos e farmacológicos dos medicamentos, nomeadamente mecanismo de ação, relembrar doses e posologias. Além disso, a receção de encomendas e gestão dos stocks e de encomendas permitiu-me um primeiro contacto com o programa informático *4digitalcare*.

Posteriormente, a observação dos atendimentos foi algo que acompanhou o meu percurso durante o estágio. Desta forma, fui me familiarizando com o sistema informático e ouvindo os aconselhamentos farmacêuticos feitos aos utentes pelos colaboradores. Relativamente ao receituário, foi-me também esclarecido o funcionamento das participações dos medicamentos do Serviço Nacional de Saúde (SNS) e dos diversos subsistemas de saúde, assim como o procedimento inerente à conferência do receituário.

Por último, e graças à confiança em mim depositada, comecei o atendimento ao balcão, sempre com supervisão de algum dos farmacêuticos.

### **3.3 Consulta Farmacêutica**

No decorrer do estágio tive a oportunidade de acompanhar a realização de uma consulta farmacêutica.

A consulta farmacêutica é realizada por um farmacêutico com as devidas competências científicas, nomeadamente com a pós-graduação em seguimento farmacoterapêutico de acordo com o método Dáder.

Resumidamente, a consulta farmacêutica destina-se sobretudo a utentes polimedicados com dificuldade na gestão da sua terapêutica ou na adesão a esta. É feita uma identificação do utente, regista-se o motivo da consulta assim como a priorização dos mesmos e para cada medicamento identifica-se o nome, dosagem e posologia. Sempre que possível, o utente deve fazer-se acompanhar do último boletim de análises para avaliação e registo dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos.

Desta forma, através da consulta farmacêutica é possível perceber se o utente sabe as indicações a que se destina cada medicamento, se os toma corretamente quer em dose quer em posologia e, se a toma é efetiva para cada fármaco. Toda esta análise permite identificar possíveis erros de medicação, isto é, duplicações, interações, doses tóxicas ou subterapêuticas e interações. Caso algum efeito secundário seja relatado pelo utente, este é igualmente analisado para verificar se advém da medicação. Se existirem duplicações, interações e/ou efeitos secundários transmite-se ao médico de família a informação para que possam ser feitas alterações, por forma melhorar a terapêutica e, conseqüentemente a qualidade de vida do utente.

Muitas vezes, através da consulta farmacêutica é sugerido e aconselhado ao utente a preparação individual da medicação por parte do farmacêutico uma vez que é visível a dificuldade de alguns utentes na gestão da sua terapêutica, ora por terem um regime terapêutico complexo ora por baixa adesão à terapêutica. Assim, o utente recebe a medicação prescrita pelo médico em *pillpacks*, preparados pela farmácia, onde estão identificados os dias da semana e os períodos do dia a que devem ser tomados os medicamentos. Este serviço garante a correta utilização da medicação segundo o regime terapêutico instituído pelo médico, assegurando a individualização das tomas e minimizando a possibilidade de existência de erros relacionados com a medicação.<sup>2</sup>

A consulta farmacêutica permite assim o controlo e monitorização de algumas doenças, principalmente crónicas, por parte do farmacêutico, aumentando dessa forma a efetividade, uso responsável, racional e seguro dos fármacos.

### **3.4 Utentes Fidelizados**

Por forma a ter utentes fidelizados a Farmácia Sitália dispõe no seu sistema informático de gestão da criação de fichas de clientes. Estas fichas têm como objetivo ver o histórico de medicação que os utentes fazem. Devido à grande diversidade de genéricos que existem e como estes apresentam diferentes embalagens, torna-se difícil identificar o laboratório a que os utentes se referem. Assim, através da ficha de cliente é facilmente identificada a medicação habitual e os respetivos laboratórios. Além disso, sempre que suscitem dúvidas relacionadas com a medicação torna-se mais acessível para aceder a toda a informação.

A ficha de cliente é assim, não só, mais cómoda para o utente que evita ter se fazer acompanhar de parte da embalagem, como também é importante para a gestão de stocks, fundamental para otimizar a gestão de recursos e a rentabilidade da farmácia.

### **3.5 Aprendizagem Contínua**

É de salientar o interesse constante por parte da equipa de farmacêuticos em estar a par dos mais recentes avanços na área das ciências farmacêuticas, quer seja por discussão de notícias quer por pesquisas na internet sempre que uma questão pertinente se levantava. Desta forma, nenhum assunto ficava pendente nem nenhuma questão por resolver. Destaco ainda a postura que considero ser verdadeiramente louvável da Doutora Susana Sousa, que, por vezes, nos períodos de menor movimento, fazia uma revisão a determinados conceitos e conteúdos relacionados com a prática clínica de grande utilidade em farmácia comunitária e que estão em constante atualização.

### **3.6 Fitoterapia e Homeopatia**

As abordagens terapêuticas não convencionais são atualmente uma das opções escolhidas pelos utentes em detrimento do tratamento com moléculas de síntese química. Assim, a Farmácia Sitália procura trabalhar nestas áreas de intervenção, que apesar de serem um nicho de mercado, apresentam-se como uma vantagem competitiva e fator de diferenciação relativamente às restantes farmácias.

## **4. Pontos Fracos**

### **4.1 Lacunas no Plano de Estudos**

Não obstante à abrangência de conhecimentos científicos nas diversas áreas da saúde, o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresenta algumas lacunas refletidas no aconselhamento de produtos na área da dermofarmácia, cosmética, veterinária, dietética e ginecologia.

Desta forma, considero pertinente um enquadramento mais prático nas unidades curriculares indo ao encontro da realidade profissional em farmácia comunitária.

### **4.2 Acompanhamento Farmacêutico**

Uma vez que o estágio tem uma duração limitada, não é possível acompanhar a evolução clínica da maioria dos utentes a quem dispensei medicamentos e/ou prestei aconselhamento farmacêutico. O *feedback* fornecido pelos utentes em relação às indicações dadas, é fundamental para suportar decisões terapêuticas num aconselhamento futuro, sendo aplicável tanto no aconselhamento prestado em relação à dispensa de medicamentos não

sujeitos a receita médica (MNSRM), como ao aconselhamento de produtos de saúde e cosméticos.<sup>3</sup>

Contudo, nem sempre foi possível obter feedback, dado que muitos dos utentes não retornaram à farmácia até precisarem de um novo aconselhamento.

### **4.3 Stocks Reduzidos**

O *stock* de medicamentos, dispositivos médicos, cosméticos e restantes produtos de saúde disponíveis na Farmácia Sitália encontram-se adequados às necessidades da maioria dos utentes fidelizados permitindo uma gestão otimizada dos recursos.

Contudo, por vezes, embora a farmácia dispusesse de algumas gamas de MNSRM, cosméticos, produtos de puericultura, dietéticos e suplementos alimentares nem sempre era possível satisfazer as necessidades do utente de imediato. Relativamente aos MSRMs, o *stock* não afetava o ato farmacêutico uma vez que a grande maioria de clientes eram utentes já fidelizados.

No entanto, e devido aos reduzidos stocks, ocasionalmente era necessário explicar ao utente que dispúnhamos na farmácia de alternativas similares em princípio ativo, indicação terapêutica, dosagem, forma farmacêutica e eficácia, dissipando de alguma forma a desconfiança existente em relação aos medicamentos genéricos. Caso o utente o desejasse, a farmácia em colaboração com os fornecedores, disponibilizava a possibilidade de encomenda do medicamento e/ou produto de saúde num prazo entre 12 a 24 horas, que muitas das vezes era um fator decisivo para satisfazer o utente. É de salientar que no caso dos cosméticos, apesar de existir a opção de encomenda, muitas vezes os utentes escolhiam procurar outro local dado que a maior parte deles não são de venda exclusiva em farmácia.

## **5. Oportunidades**

### **5.1 Formações Complementares ao Plano de Estágio**

Periodicamente, os delegados de informação médica, em representação das respetivas indústrias farmacêuticas, investem em formações a fim de apresentarem o portefólio de produtos comercializados. Geralmente estas formações dividem-se em duas partes. Inicialmente e com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação, é apresentada uma parte mais científica e teórica, identificando a indicação terapêutica, as advertências e vantagens de

utilização do produto. Posteriormente, são abordadas técnicas de *cross-selling* como forma de aconselhamento eficaz do produto.

No decorrer do meu estágio tive a oportunidade de realizar algumas formações. Zambon, Bial e ISDIN são alguns exemplos de indústrias que promoveram formação sobre os produtos do seu portefólio.

Aliada à atualização de conhecimentos sobre o mercado farmacêutico devido à introdução de novos medicamentos no mercado, a participação em formações complementares permite a aquisição de ferramentas relacionadas com técnicas de venda.

## **5.2 Conhecimento e Competências**

No estágio em farmácia comunitária, a diversidade de informação permitiu-me um raciocínio rápido para questões colocadas pelos utentes relacionadas com a terapêutica medicamentosa que lhes é instituída, sendo muitas das vezes necessário interligar conhecimentos das várias unidades curriculares.

A experiência ao balcão e o desenvolvimento de um raciocínio crítico foram sem dúvida preponderantes para o sucesso do meu estágio e uma mais valia da formação adquirida. Além disso, o estágio permitiu-me aprimorar outras competências essenciais no contexto profissional, são exemplos, o espírito de equipa, a autonomia no desempenho de funções, organização e desenvolvimento da comunicação com os utentes e colaboradores.

A heterogeneidade de utentes que recorriam à farmácia fez-me adaptar às diferentes situações, sendo necessária uma apropriação linguística e científica ora mais acessível ora mais formal. Neste sentido, a apropriação da linguagem perante os utentes foi um grande desafio, uma vez que saindo da faculdade a tendência é utilizar demasiados termos científicos, os quais nem sempre são compreendidos pela população em geral, sendo a população mais idosa alvo de um maior cuidado e atenção por parte do profissional de saúde.

## **5.3 Papel do Farmacêutico**

Atualmente, de uma maneira geral o papel do farmacêutico na sociedade ainda é bastante valorizado.

Durante o estágio verifiquei que grande parte dos utentes da farmácia reconheciam o papel do farmacêutico enquanto agente de saúde pública e como especialista do medicamento. Este facto foi constatado pelo crescente acompanhamento farmacoterapêutico realizado nas consultas farmacêuticas, mas também por alguns utentes que aquando da dispensa da receita

ao balcão de atendimento solicitavam que o farmacêutico revisse a sua terapêutica e confirmasse a sua efetividade.

Da mesma forma, foi notória a procura de aconselhamento farmacêutico em dermofarmácia por parte dos utentes, apesar de muitos destes produtos se encontrarem à venda em outros locais que não farmácias.

## **6. Ameaças**

### **6.1 Valor do Medicamento**

Cada vez mais os utentes das farmácias solicitam a dispensa de MSRM sem uma prescrição, argumentando que fica mais dispendioso ir a uma consulta e pedir a receita do que comprar o medicamento sem a mesma, mesmo que o medicamento em causa seja compartilhado. Em situações em que o medicamento não é compartilhado, esta solicitação tem sido cada vez mais comum.

Perante tal, deve ser explicado ao utente a importância da avaliação do histórico clínico para uma posterior prescrição adequada da medicação, dado que por vezes são necessários ajustes de doses e/ou posologia. É impreterível que o utente seja encaminhado para o médico.

No meu entender, estas situações poderiam abrir a possibilidade a uma maior intervenção farmacêutica, nomeadamente, na renovação de receituário prescrito *ad æternum*. Doenças crónicas como hipertensão arterial, dislipidemias e/ou *diabetes mellitus* tipo 2 são exemplos de patologias em que o farmacêutico tem conhecimentos científicos necessários para fazer o acompanhamento farmacoterapêutico, através da interpretação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos. Assim, uma correta formação e especialização do farmacêutico e adequação dos sistemas de informação das farmácias em cooperação com as equipas médicas permitindo a partilha de dados, possibilitaria a realização de ajustes na terapêutica quer seja mudança de substância ativo quer alteração da dosagem e/ou posologia.

O acompanhamento dos utentes pelos farmacêuticos é fulcral, uma vez que muitos dos utentes com patologias crónicas não toma corretamente os medicamentos devido a um regime terapêutico complexo. Nestes casos de medicação crónica, foi também visível um espaçamento temporal muito grande entre as idas ao médico, resultando na maioria das vezes no pedido de medicamentos sem prescrição.



A valorização da profissão farmacêutica seria assim uma mais valia em termos de ganho em saúde quer para os utentes quer para o próprio Serviço Nacional de Saúde (SNS).

## **6.2 Massificação de Postos de Venda de MNSRM**

Com a entrada em vigor do Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de agosto que estabelece o regime de venda de MNSRM fora das farmácias, a vertente económica e o valor da profissão farmacêutica foram seriamente afetadas.

Devido ao volume de compras realizado pelas grandes superfícies comerciais de venda de MNSRM, é possível a estas obterem um preço de custo mais baixo junto dos fornecedores e/ou armazenistas, pelo que o preço de venda ao público será inferior. Esta situação posicionou competitivamente as farmácias num nível inferior.

Desta forma, é importante ressaltar que apesar de se tratar de MNSRM e serem, portanto, de venda livre ao público, da sua administração podem igualmente advir riscos que muitas vezes estão associados à toma com outros medicamentos. A dispensa responsável e racional deverá ser assegurada sob pena de um uso inadequado.

## **6.3 Contexto Socioeconómico**

A entrada em vigor do Decreto-Lei n.º 97/2015 que procedeu à criação do Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde veio alterar a comparticipação dos medicamentos. Assim, o Ministério da Saúde pretende que os medicamentos e dispositivos médicos sejam alvo de avaliação face ao seu financiamento pelo SNS. Consequentemente à avaliação, alguns medicamentos acabaram por perder o seu escalão de comparticipação. Explicar estas alterações nas comparticipações aos utentes, especialmente ao mais idosos, nem sempre é fácil pois na maioria dos casos estes consideram que a farmácia pretende ter mais lucro. Da mesma forma, os motivos que levam a que alguns medicamentos sejam comparticipados e outros não bem como as constantes alterações nos preços, são alvo de crítica pelos utentes.

Por outro lado, a crescente exportação paralela de medicamentos tem-se feito sentir nos stocks de algumas farmácias, os quais por vezes se encontram esgotados. Estas ruturas temporárias no stock são vistas pelos utentes com desconfiança pela atividade farmacêutica.

## **7. Conclusão**

O estágio realizado na Farmácia Sitália foi fulcral para a aplicação de conhecimentos em contexto real da atividade farmacêutica e consolidação de algumas lacunas inerentes à prática, permitindo desenvolver novas competências, essenciais em contexto profissional.

Deste modo, considero o farmacêutico como um profissional de saúde por excelência, com enormes capacidades técnicas e científicas que permitem um uso responsável e racional do medicamento, em prol do bem-estar e qualidade de vida do utente.

O valor da profissão farmacêutica é um paradigma que está gradualmente a ser alterado, facto visível pela crescente procura pelos utentes da farmácia como o primeiro local a que recorrem para contactar com um profissional de saúde qualificado. A formação constante é necessária para conseguir dar resposta às exigências dos utentes.

Apesar de o caminho ainda ser longo até ao reconhecimento do devido valor do farmacêutico, a especialização e o aumento dos serviços farmacêuticos serão uma aposta frutífera na valorização das suas capacidades e intervenção na sociedade.

## 8. Referências

1. HOUBEN, G., LENIE, K. & VANHOOF, K. - **Knowledge-based SWOT-analysis system as an instrument for strategic planning in small and medium sized enterprises**. *Decis. Support Syst.* **26**, (1999) 125–135.
2. PINHEIRO, L., ALVES DA COSTA, F. - **Preparação Individual da Medicação (PIM)**. (2018) 15–21.
3. SANTOS, H. J., I. NUNES DA CUNHA, P. V.COELHO P. CRUZ, R. BBOTELHO, G. FARIA, C. MARQUES A. GOMES, - "**Boas Práticas Farmacêuticas para farmácia comunitária (BPF)**", *Conselho Nacional da Qualidade*, 3ª edição, 2009. [Online]. Disponível:[https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas\\_praticas\\_farmaceuticas\\_para\\_a\\_farmacia\\_comunitaria\\_2009\\_20853220715ab14785a01e8.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf)  
Acedido em 27/07/2018

## **Parte II**

Relatório de Estágio na Comissão de Ética para a Investigação Clínica

## Índice

<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Análise SWOT.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Pontos Fortes.....</b>	<b>23</b>
3.1 Legislação Aplicável na Investigação Clínica.....	23
3.2 Conhecimento do Registo Nacional de Estudos Clínicos .....	24
3.3 Equipa do Gabinete de Apoio à CEIC.....	24
3.4 CEIC .....	24
3.5 Conhecimentos Adquiridos e Competências Desenvolvidas .....	26
<b>4. Pontos Fracos.....</b>	<b>27</b>
4.1 Duração do Estágio .....	27
4.2 Plano de Estudos não Adaptado às Saídas Profissionais.....	27
<b>5. Oportunidades .....</b>	<b>27</b>
5.1 Formação <i>On-Job</i> .....	27
5.2 Saídas Profissionais .....	28
5.3 Localização da CEIC.....	28
<b>6. Ameaças .....</b>	<b>29</b>
6.1 Pressão Constante dos Promotores e Requerentes .....	29
6.2 Desconhecimento da Legislação Nacional para a Investigação Clínica.....	29
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>31</b>
<b>Referências .....</b>	<b>32</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**CEIC** – Comissão de Ética para a Investigação Clínica

**GECC** – Gestão de Ensaio Clínicos CEIC

**RNEC** – Registo Nacional de Estudos Clínicos

## **I. Introdução**

O papel do farmacêutico enquanto profissional de saúde e especialista do medicamento, reflete-se no acompanhamento de todo o percurso do fármaco desde a sua investigação até ao seu uso racional e responsável.

Atualmente, o farmacêutico intervém em variados ramos da atividade farmacêutica sejam eles, a investigação, análises, regulamentação, distribuição, indústria, farmácia hospitalar e de comunitária, sendo estes alguns dos exemplos.

No presente ano letivo, e no âmbito da unidade curricular “Estágio Curricular” referente ao Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizei estágio na Comissão de Ética para a Investigação Clínica, organismo independente com a missão de salvaguardar os direitos e segurança dos participantes em estudos clínicos.<sup>1</sup>

A CEIC, enquanto organismo independente designada pelo Ministro da Saúde, está integrada administrativamente na Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P..

O presente relatório descreve o estágio curricular realizado na Comissão de Ética para a Investigação Clínica, CEIC, no período de 02 de maio de 2018 a 31 de julho de 2018 sob a orientação da Dra. Raquel Silva.

## **2. Análise SWOT**

O acrónimo *SWOT* faz referência às iniciais de quatro palavras em inglês, *Strengths*, *Weaknesses*, *Opportunities* e *Threats*, em português, pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças, respetivamente.<sup>1</sup>

Com esta análise crítica relativamente ao estágio frequentado, pretende-se avaliar a pertinência do mesmo na integração e interligação dos conhecimentos teóricos na prática profissional, mas também a adequação do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Desta forma, o relatório de estágio apresenta a forma de uma análise *SWOT*, em que serão discutidas as dimensões interna e externa do mesmo. A análise interna é constituída pelos pontos fortes que contribuíram para a minha formação no decorrer do estágio e, pelos pontos fracos que representam as adversidades enfrentadas. A análise externa é constituída pelas oportunidades e ameaças que influenciaram o decorrer do estágio.

## **3. Pontos Fortes**

### **3.1 Legislação Aplicável na Investigação Clínica**

O estágio na Comissão de Ética para a Investigação Clínica permitiu-me adquirir novos conhecimentos acerca do enquadramento legislativo e político na Investigação Clínica. Excetuando alguns procedimentos estabelecidos pela CEIC, toda a atividade realizada neste organismo é regulada por legislação publicada em Diário da República, bem como *guidelines* provenientes da Comissão Europeia.

Desta forma, e numa fase inicial, foi necessário ler e interpretar a legislação inerente ao desempenho das funções estabelecidas para o estágio, uma vez que as atividades realizadas têm de estar de acordo com a lei, *guidelines* e diretivas. Todo este contacto com a legislação ajudou-me a perceber a importância e a dominar os conhecimentos desta área, imprescindível na minha formação enquanto estagiário no gabinete de apoio da CEIC.

Entre os várias Leis, Decretos-Lei, Portarias, Deliberações e *guidelines* aplicáveis, destaco: Lei n.º 21/2014, 16 de abril e 73/2015 de 27 de julho que aprovam a investigação clínica; Portaria n.º 135-A/2014, 1 de julho que aprova a composição, o financiamento e as regras de funcionamento, bem como a articulação; Portaria n.º 63/2015, 5 de março que fixa as taxas que são devidas pelos atos prestados no âmbito da Lei n.º 21/2014, 16 de abril;



Portaria n.º 64/2015, 5 de março que estabelece as normas de funcionamento da Rede Nacional das Comissões de Ética para a Saúde (RNCES); Portaria n.º 65/2015, 5 de março que estabelece as normas a que deve obedecer o funcionamento do Registo Nacional de Estudos Clínicos (RNEC); Deliberação n.º 1704/2015, aplicável ao tratamento de dados pessoais efetuados no âmbito da Investigação Clínica; *guidelines for clinical trial* CT-1, CT-2 e CT-3.

### **3.2 Conhecimento do Registo Nacional de Estudos Clínicos**

A Lei n.º 21/2014, de 16 de abril criou, no seu artigo 39.º, o Registo Nacional de Estudos Clínicos (RNEC) que constitui uma plataforma eletrónica para registo e divulgação dos estudos clínicos, promovendo a interação entre os diversos intervenientes na área da investigação clínica e, conseqüentemente facilitando e incentivando o desenvolvimento de investigação de elevada qualidade em benefício dos doentes, assim como a divulgação da investigação clínica nacional.<sup>2,3</sup>

Esta plataforma veio desmaterializar a transmissão de informação no processo de submissão e de autorização dos pedidos de parecer, notificação de todos os documentos inerentes ao estudo, bem como facilitar o acompanhamento e conclusão dos estudos clínicos.

Dado que esta plataforma ainda apresenta alguns entraves à submissão de documentos, ainda são registados pedidos de parecer e notificações em suporte de papel.

### **3.3 Equipa do Gabinete de Apoio à CEIC**

A equipa do gabinete de Apoio à CEIC é constituída principalmente por farmacêuticos e assistentes técnicos sendo coordenada pela Dr.ª Raquel Silva.

O acolhimento e formação por parte da equipa foi fundamental no decorrer de todo o estágio. A organização da equipa é feita de acordo com os procedimentos estabelecidos e acompanhamento que é necessário dar aos processos submetidos.

Destaco a preocupação de todos os colaboradores em integrar-me na equipa assim como a disponibilidade para esclarecimento de dúvidas em matérias das quais não tinha conhecimentos.

### **3.4 CEIC**

O conhecimento da orgânica de uma das autoridades competentes na Investigação Clínica foi sem dúvida o ponto forte do estágio.

A Comissão de Ética para a Investigação Clínica é dotada de autonomia técnica e científica e funciona sob a tutela do Ministério da Saúde. Esta é composta por cerca de três dezenas de personalidades com conhecimentos e reconhecida experiência na área da investigação clínica e da ética.

Desta forma, e apesar desta Comissão funcionar junto do INFARMED, I.P., dispõe de um Presidente, o Professor Doutor Alexandre Quintanilha e de uma Vice-Presidente a Professora Doutora Maria Alexandra Ribeiro.<sup>4</sup>

Os pedidos de parecer inicial e alterações substanciais submetidos via RNEC ou presencialmente em suporte físico, são numa fase inicial validados pelo secretariado do gabinete de apoio que verifica se estão preenchidos todos os requisitos legais e regulamentares. Caso os pedidos sejam válidos, são emitidos ofícios de validação dos mesmos sendo que uma vez invalidados são igualmente emitidos ofícios referindo os motivos da invalidação. Só depois desta validação, são distribuídos pelas gestoras de processos ao peritos-médicos que fazem uma primeira avaliação ao projeto de ensaio. Posteriormente, o perito responsável poderá solicitar esclarecimentos a determinados documentos que apresentem informação menos clara ou que suscitem dúvidas, seguindo o processo para informações complementares a que o promotor se deve pronunciar. Assim, o perito elabora um parecer inicial, favorável condicionado ou desfavorável sendo o processo discutido em reunião da Comissão Executiva, a qual é composta pela presidência da CEIC e por um número definido de peritos designado e aceite para tal. Se continuarem a existir dúvidas relativamente às questões colocadas o processo poderá seguir para uma segunda ronda de informações complementares ou caso o perito e/ou a Comissão Executiva assim o entenda, poderá ser marcada uma “audição prévia” com o promotor, por forma a remover os obstáculos e chegar a um acordo. Só então é elaborado um parecer final da avaliação do perito que será discutido e votado em reunião plenária.

Em reunião plenária estão presentes os peritos que avaliam os processos e que vão desde médicos especialistas, farmacêuticos e teologistas, assim como o Presidente e Vice-Presidente.

Uma vez aprovado o pedido de parecer são emitidos os respetivos ofícios, sendo feita uma comunicação via RNEC ao requerente e às Comissões de Ética para a Saúde de todos os centros participantes no estudo.

Após a obtenção de aprovação e emitido o ofício, cabe à CEIC a monitorização das notificações de início e fim de recrutamento, início e fim dos centros de ensaio, atualização dos seguros de responsabilidade civil, contratos financeiros e farmacovigilância.

As alterações ao pedido de parecer inicial, sejam elas alterações ao protocolo, consentimentos informados, adição de novos centros de ensaio ou mudança dos investigadores Principais e/ou Coordenador, seguem um processo de validação e avaliação do perito idêntico à submissão de um pedido de parecer inicial.

A compreensão de todo o encadeamento para um pedido de parecer, ou seja, todo o ciclo de trabalho que é realizado na CEIC foi a pedra basilar deste estágio.

### **3.5 Conhecimentos Adquiridos e Competências Desenvolvidas**

A aquisição de conhecimentos na área de Ensaio Clínicos foi um complemento valioso uma vez que ao plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas não é contemplada nenhuma unidade curricular específica para esta área. A crescente necessidade de se encontrarem moléculas para novos alvos terapêuticos, moléculas com novas indicações terapêuticas e melhorar o perfil de eficácia e segurança das mesmas, leva a que a indústria farmacêutica invista na investigação, mas sempre com olhar dirigido para as margens de lucro a obter e a concretização dos seus objetivos. Assim, é missão da CEIC garantir os direitos de todos os intervenientes nestes estudos clínicos, principalmente dos participantes.

Ao longo do estágio foram-me atribuídas diversas atividades, permitindo-me desenvolver as minhas competências e tornar-me progressivamente mais autónomo na realização das mesmas.

Entre as diversas atividades desempenhadas, validação de pedido de parecer de novo ensaio ou alteração substancial, análise de contratos, tratamento de notificações de monitorização dos ensaios, destaco a gestão dos processos, preparação para reuniões Plenária e Executiva, procedimentos pós reuniões Plenária e Executiva e atualização do site da CEIC.

A gestão dos processos da CEIC permitiu-me não só estar em contacto com a dinâmica de distribuição dos processos entre os peritos, mas também um acompanhamento mais próximo de todo percurso de um pedido de parecer desde a sua entrada na CEIC até obtenção de aprovação.

Relativamente às funções de secretariado nas reuniões Executivas e Plenárias e à elaboração das respetivas atas, considero que esta foi uma das competências mais valiosa e

gratificante que desenvolvi graças à confiança que em mim foi depositada, e pela qual estou grato.<sup>4</sup>

## **4. Pontos Fracos**

### **4.1 Duração do Estágio**

O estágio curricular realizado na Comissão de Ética para a Investigação Clínica teve a duração de três meses. Apesar de esta ter sido uma oportunidade meritória de estagiar numa Autoridade Competente na área da Investigação Clínica o tempo de estágio foi limitado para aprofundar determinados temas, interferindo assim diretamente com o retorno que seria expectável em termos de conhecimentos e autonomia.

### **4.2 Plano de Estudos não Adaptado às Saídas Profissionais**

A abrangência do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências farmacêuticas proporciona conhecimentos científicos em várias áreas das ciências da saúde, qualificando o papel do farmacêutico.

Contudo, áreas como Assuntos Regulamentares, Farmacoeconomia, Tecnologias em Saúde e Ensaio Clínicos representam uma pequena parte desse plano de estudos, criando uma lacuna à formação dos estudantes e posteriormente dificultando a integração no mercado de trabalho na indústria farmacêutica.

Dado o crescimento da indústria farmacêutica em Portugal na última década, é imperativo que a formação dos estudantes colmate estas lacunas.

No meu caso, considero que conhecimentos mais aprofundados na área de Ensaio Clínicos e Bioética teriam sido um ótimo apoio.

## **5. Oportunidades**

### **5.1 Formação *On-Job***

A formação recebida no decorrer do estágio dada pelos colaboradores do gabinete de apoio à CEIC permitiu-me ter uma visão integrada do trabalho que é desenvolvido e das diversas tarefas que pude desempenhar. Inicialmente, houve uma introdução geral à legislação aplicável e aos procedimentos estabelecidos pela CEIC. Em relação à validação dos pedidos de parecer foram-me explicados quais os critérios de validação de acordo com os requisitos

legais. Em relação à aprovação de contratos financeiros foram-me explicados quais os procedimentos a ter em conta para aprovação dos mesmos. Relativamente à distribuição dos processos pelos peritos foram-me explicados quais os procedimentos a realizar para proceder ao envio da documentação a ser avaliada. Também tive formação sobre o tratamento dado às diversas notificações recebidas relativas a segurança, atualização de seguros, início e fecho de centro, fim de estudo e a alterações não substanciais como é o caso da Brochura do Investigador. A realização de todas estas tarefas acima descritas careceu também de uma formação sobre a plataforma informática, GECC (Gestão de Ensaios Clínicos CEIC), imprescindível para a realização de todas as tarefas administrativas. Por último, tive a oportunidade de aprender a preparar e secretariar as reuniões Executivas e Plenárias assim como realizar as atas das mesmas. Toda esta formação estava incluída no plano de formação dos estagiários.

## **5.2 Saídas Profissionais**

Após a realização do estágio na CEIC, o conhecimento de algumas saídas profissionais em que o farmacêutico pode integrar são uma oportunidade que irá retratar um futuro próximo. A maioria dos processos que são submetidos à CEIC são provenientes da indústria farmacêutica, excetuando os ensaios promovidos por instituições de ensino e por investigadores. Anteriormente à realização deste estágio não tinha conhecimento que na indústria existia um departamento destinado a Ensaios Clínicos.

Nestes departamentos da Indústria Farmacêutica são preparados os documentos para submissão às Autoridades Competentes, nomeadamente ao INFARMED, I.P. e à CEIC, para aprovação dos ensaios clínicos.

Desta forma, além da realidade da Comissão de Ética para a Investigação Clínica, fiquei também a conhecer todos os procedimentos requeridos para quem submete.

## **5.3 Localização da CEIC**

A CEIC encontra-se localizada no pavilhão I7-A do Parque da Saúde de Lisboa, uma zonal central de Lisboa e com fáceis acessos. Para além da CEIC e do INFARMED, I.P., encontram-se no Parque da Saúde de Lisboa várias unidades de saúde nomeadamente o Hospital Júlio de Matos, o Centro de Saúde de Alvalade, a Administração do Sistema de Saúde, I.P., o Instituto Português do Sangue e Transplantação, A Escola Superior de Enfermagem de Lisboa entre outros.

Comparativamente com Coimbra, em Lisboa é notória a diversidade de seminários e conferências sobre as diferentes áreas da atividade farmacêutica. Destaco a participação num seminário organizado pela Ordem dos Farmacêuticos na sua sede nacional, subordinado ao tema: “Informação sobre Ensaio Clínicos: Onde e como pesquisar?”.

## **6. Ameaças**

### **6.1 Pressão Constante dos Promotores e Requerentes**

Atualmente os encargos com a Investigação Clínica são bastante avultados, sendo que os promotores dos Ensaio Clínicos necessitam de garantir que o investimento irá ter retorno e, portanto, será de esperar que estes tentem obter respostas mais rápidas e se empenhem em remover obstáculos à sua atividade. A realidade vivida na CEIC espelha este facto. Cada vez mais os requerentes, sob pressão dos promotores, exigem às autoridades competentes a maior celeridade possível na aprovação dos pedidos de parecer submetidos, ora porque já têm marcada a visita de início do centro de ensaio ora porque querem iniciar o recrutamento. Contudo, muitas das vezes numa primeira fase de validação a documentação que é submetida poderá não estar de acordo com os requisitos legais necessários sendo que o requerente fica obrigado a submeter nova documentação. Por outro lado, é também exercida pressão pelos requerentes em que os processos avancem esta fase de validação para serem distribuídos aos peritos e mais rapidamente os processos serem discutidos em sede de reunião Executiva e Plenária por forma a obterem aprovação.

Desta forma, esta pressão constante por vezes gera alguma entropia nos processos, a qual irá impedir que os mesmos avancem até obterem uma deliberação, entrando assim na maioria dos casos em conflito com os interesses do Promotor.

É de salvaguardar que o interesse maior da CEIC é sempre a preservação dos direitos dos participantes nos ensaios clínicos face a estas situações.

### **6.2 Desconhecimento da Legislação Nacional para a Investigação Clínica**

O desconhecimento da Legislação Nacional por parte de quem submete a documentação à CEIC é na maioria das vezes o fator que condiciona numa fase inicial a validação do processo e que, conseqüentemente irá atrasar todas as restantes démarches.

Da mesma forma, muitas entidades estrangeiras que submetem ensaios clínicos com centros de ensaio em Portugal, deparam-se com algumas dificuldades na submissão da

documentação de acordo com os requisitos legais. Em determinadas situações estas dificuldades relacionam-se com a necessidade de submeter um ensaio clínico a um parecer ético de um Comissão centralizada e não às Comissões de Ética para a Saúde dos centros de ensaio do estudo, uma vez que esta é a prática comum noutros países da União Europeia.

Por estes motivos, e sempre com a sua missão bem presente, defesa dos participantes dos ensaios, a CEIC tem se demonstrado sempre disponível para tentar ultrapassar e remover alguns obstáculos, através do diálogo com as entidades e instituições envolvidas.

Assim, é disponibilizado no site da CEIC informações acerca da documentação e instruções de submissão, os formulários necessários e toda a legislação em vigor nesta temática.

## **7. Conclusão**

A oportunidade de estagiar na Comissão de Ética para a Investigação Clínica não só foi essencial para o desenvolvimento de competências numa área que até à data me era desconhecida, como também me permitiu consolidar e adquirir novos conhecimentos com fundamento e base no enquadramento legislativo e na orgânica de trabalho deste organismo.

Este estágio permitiu-me também estar ocorrente do panorama nacional da Investigação Clínica nomeadamente das áreas terapêuticas, patologias e medicamentos experimentais alvo de investigação nos ensaios clínicos.

Ao longo do estágio, o interesse por esta área foi gradualmente aumentando, bem como todas as questões relacionadas com as tarefas desempenhadas diariamente. Aliado a este crescente interesse, a equipa que constitui o gabinete de apoio à CEIC foi fundamental para o sucesso da realização do meu estágio, tornando-o numa experiência gratificante quer a nível profissional como pessoal.



## Referências

1. HOUBEN, G., LENIE, K. & VANHOOF, K. - **Knowledge-based SWOT-analysis system as an instrument for strategic planning in small and medium sized enterprises**. *Decis. Support Syst.* **26**, (1999) 125–135.
2. Lei n.º 21/2014, de 16 de abril - *Diário da República*, n.º 75/2014, Série I de 2014-04-16 .
3. Portaria n.ª 65/2015, de 5 de março, do Ministério da Saúde - *Diário da República*, n.º 45/2015, Série I de 2015-03-05.
4. Regulamento Interno CEIC - Comissão de Ética para a Investigação Clínica - Disponível em : <http://www.ceic.pt/regulamento-interno> - Acedido em 20/08/2018.

**Parte III**

**Monografia**

**“Myasthenia Gravis: Revision and New Therapeutic Strategies”**

## Table of Contents

<b>List of Abbreviations and Acronyms .....</b>	<b>36</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>37</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>38</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>39</b>
<b>2. The Neuromuscular Junction.....</b>	<b>40</b>
<b>3. Myasthenia Gravis .....</b>	<b>41</b>
3.1 Epidemiology.....	41
3.2 Clinical Presentation .....	41
3.3 Pathophysiology.....	42
3.3.1 The NMJ in MG .....	42
3.3.2 AChR Antibodies.....	42
3.3.3 MuSK Antibodies.....	43
3.3.4 LRP4 Antibodies .....	44
3.3.5 Agrin Antibodies.....	44
3.3.6 Titin Antibodies .....	44
3.3.7 K <sub>v</sub> 1.4 Antibodies .....	45
3.3.8 Ryanodine Receptor Antibodies .....	45
3.3.9 Collagen Q Antibodies.....	45
3.3.10 Cortactin Antibodies.....	45
3.4 MG Subgroups.....	46
3.4.1 Ocular MG Form.....	46
3.4.2 Generalized MG Form .....	46
3.4.2.1 Anti-AChR Antibodies.....	46
3.4.2.1.1 Early-Onset MG.....	46
3.4.2.1.2 Late-Onset MG .....	46
3.4.2.1.3 Thymoma-associated MG.....	46
3.4.2.2 Anti-MuSK MG .....	47
3.4.3 LRP4-associated MG.....	47
3.4.4 Seronegative MG .....	47
3.5 Diagnosis.....	47
<b>4. Classical Therapeutic Strategies.....</b>	<b>48</b>
4.1 Symptomatic drug therapy.....	48

4.1.1 Cholinesterase Inhibitors.....	48
4.1.2 Immunosuppressive drug treatment .....	48
4.1.2.1 Steroids .....	48
4.1.2.2 Non-steroid immunosuppressive agents .....	49
4.1.2.2.1 Azathioprine .....	49
4.1.2.2.2 Mycophenolate mofetil.....	49
4.1.2.2.3 Cyclosporine.....	49
4.1.2.2.4 Tacrolimus .....	50
4.1.2.2.5 Methotrexate.....	50
4.1.2.2.6 Cyclophosphamide .....	50
4.1.3 Intravenous Immunoglobulins and Plasmapheresis .....	50
4.2 Thymectomy .....	51
<b>5. Innovative Therapeutic Targets .....</b>	<b>51</b>
5.1 Approved New Therapeutics.....	51
5.1.1 Complement Inhibitor: Eculizumab .....	51
5.1.2 Anti-CD20 Antibody: Rituximab .....	52
5.2 Potential Therapeutic Targets.....	52
5.2.1 T-cell Signalling Pathways and Tregs .....	52
5.2.2 Tcell-B cell Interactions .....	54
5.2.3 B cells, C-cell Trophic Factors and Plasma cells.....	54
5.2.4 Fc Receptor Modulation .....	55
5.2.5 Cytokine, Cytokine Receptors and Growth Factors .....	55
5.2.6 Vaccination.....	56
5.2.7 Autologous Stem Cell Transplantation .....	56
<b>6. Conclusions .....</b>	<b>57</b>
<b>7. References .....</b>	<b>58</b>

## **List of Abbreviations and Acronyms**

**Ach** – Acetylcholine

**AChR** – Acetylcholine Receptor

**aHUS** – Atypical Hemolytic Uremic Syndrome

**APC** – Antigen Presenting Cell

**CT** – Computerized Tomography

**DAF** – Decay-Accelerating Factor

**EPP** – Endplate Potential

**gMG** – generalized Myasthenia Gravis

**HLA** – Human Leukocyte Antigen

**IVIg** – Intravenous Immunoglobulin

**LRP4** – low-density lipoprotein receptor-related protein 4

**MAC** – Membrane Attack Complexes

**MG** – Myasthenia Gravis

**MuSK** – Muscle Specific Tyrosine Kinase Receptor

**NMJ** – Neuromuscular Junction

**PNH** – Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria

**RA** – Rheumatoid Arthritis

**RyR** – Ryanodine Receptor

**TFH** – T Follicular Helper cells

**Tregs** – Regulatory T cells

**VGCCs** – Voltage-Gated Calcium ion Channels

**VGSCs** – Voltage-Gated Sodium ion Channels

## **Resumo**

Miastenia Gravis é uma doença neuromuscular autoimune causada por anticorpos contra componentes da junção neuromuscular, principalmente ao recetor de acetilcolina (AChR), levando à sua destruição e comprometendo a transmissão do potencial de ação através das fibras musculares. Os pacientes sofrem de fraqueza muscular flutuante que piora com a atividade e melhora com o repouso.

Esta monografia descreve as diferentes estratégias terapêuticas que foram usadas ao longo dos anos para aliviar os sintomas desta patologia, bem como as abordagens terapêuticas inovadoras. Essas estratégias visam melhorar a transmissão do impulso nervoso ou reduzir a atividade do sistema imunológico com esteroides, imunossupressores, e recentemente com imunomoduladores do sistema imunológico, imunoglobulinas específicas, como o Rituximab e o Eculizumab.

Apesar dos novos avanços na descoberta de novos alvos, a MG continua considerada como uma doença crónica e os sintomas tendem a persistir em muitos pacientes, alguns sendo ou tornando-se refratários à terapêutica implementada ao longo do tempo.

**Palavras-chave:** Autoimune; Recetores Acetilcolina; Anticorpos anti-receptores Acetilcolina; Junção Neuromuscular; Esteróides; Imunossupressores; Rituximab; Eculizumab.

## **Abstract**

Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune neuromuscular disease caused by autoantibodies against components of the neuromuscular junction, mainly to the acetylcholine receptor (AChR), leading to the its destruction and compromising the transmission of the action potential through muscle fibres. Patients suffer from fluctuating, fatigable muscle weakness that worsens with activity and improves with rest.

This monograph describes the different therapeutic strategies that have been used over the years to alleviate MG symptoms as well as innovate therapeutic approaches. These strategies aim either to improve the transmission of the nerve impulse or to lower the immune system with steroids, immunosuppressant drugs and now with immune system modulators, specific immunoglobulins, as Rituximab and Eculizumab.

Despite the new advances in discovering new therapeutic targets, MG remains a chronic disease and symptoms tend to persist in many patients, some being or becoming refractory to the implemented therapeutics over time.

**Keywords:** Autoimmune; Acetylcholine Receptors; Acetylcholine receptor antibodies; Neuromuscular Junction; Steroids; Immunosuppressant drugs; Rituximab; Eculizumab.

## I. Introduction

Myasthenia Gravis (MG) is a rare autoimmune disease characterised by fluctuating muscle weakness and fatigue, resulting from impaired synaptic transmission at the neuromuscular junction (NMJ).<sup>1 2</sup>

Dysfunction at NMJ is caused by autoantibodies that specific target antigens of the postsynaptic muscle end-plate components. In most patients, the autoimmune response is mediated by antibodies against the acetylcholine receptor (AChR). In approximately 5% of those patients, the autoreactive antibodies are directed against a protein known as muscle specific tyrosine kinase (MuSK), which plays an important role in the clustering of AChRs and recently the agrin receptor, low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) has been identified as a novel autoantigenic target in a small proportion of MG patients.<sup>345</sup>

Differences in clinical presentation, age at onset, autoantibody profile, and the presence or absence of thymic pathology allow identification of several MG clinical subtypes. As sensitive and specific diagnostic biomarkers and immunopathogenic factors, those autoantibodies are fundamental for subgrouping patients with MG, and therefore for an optimum diagnosis and treatment.<sup>6</sup>

These subtypes allow patients to benefit from a treatment that is tailored to their disease subgroup, as well as other possible disease biomarkers, such as antibodies against cytoplasmic muscle proteins, despite of the symptomatic and immunosuppressive drug treatment that only manage the disease onset, according to its severity.<sup>7</sup>



## 2. The Neuromuscular Junction

The NMJ is the site of synaptic transmission between motor neurons and muscle fibres (Figure 1).<sup>8,9</sup>

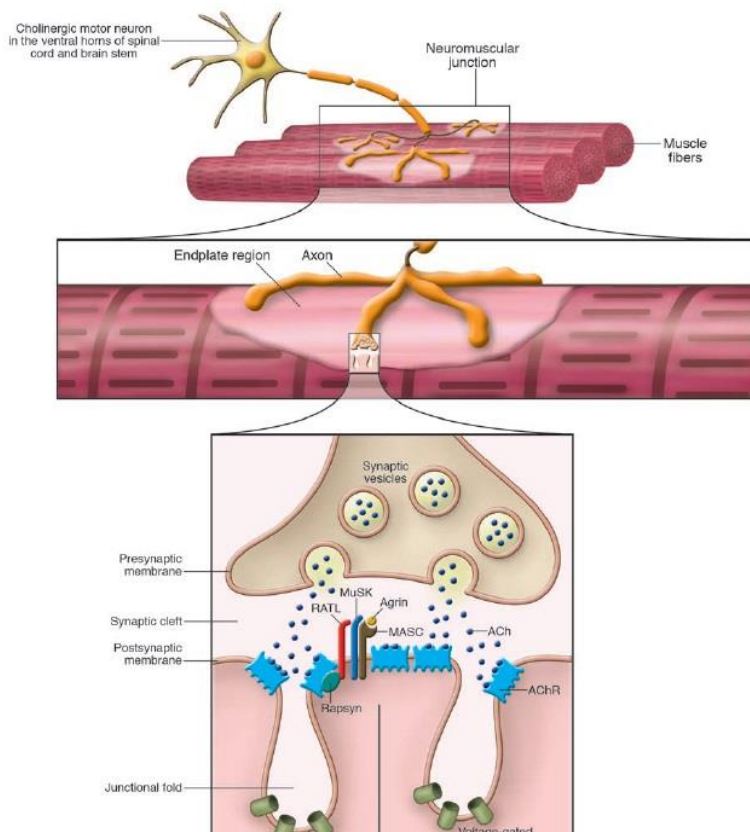


Figure 1 – Structure of the NMJ. Figure adapted.<sup>9</sup>

Electrical signals called action potentials are conducted to skeletal muscles by motor neurons that enter the muscle tissue and divide into numerous branches to innervate individual muscle fibres. These nerve terminals contain vesicles that store the neurotransmitter ACh. These vesicles are distributed through the nerve terminal but are particularly concentrated next to the presynaptic membrane, which is controlled by a transmembrane voltage-gated calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channels (VGCCs). The cell membrane adjacent to the presynaptic terminal, above the synaptic cleft, is called the motor endplate and is characterized by deep junctional folds, where is also present transmembrane voltage-gated sodium ion ( $\text{Na}^+$ ) channels and a range of proteins and proteoglycans (including agrin, rapsyn, low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4), muscle specific tyrosine Kinase (MuSK) and acetylcholine receptors (AChRs)).<sup>8,9</sup>

ACh diffuses across the synaptic cleft to the motor endplate, where it binds to AChRs, causing an initial influx of Na<sup>+</sup> into the muscle fibre. This influx is called endplate potential (EPP) and causes muscle fibre depolarization., which activates the VGSCs in the junctional folds, creating a further influx of Na<sup>+</sup>.<sup>8 9</sup>

In the healthy NMJ, the amplitude of EPPs generated by synaptic transmission exceeds the threshold required to generate an action potential in the muscle. If the EPP falls below the threshold level, the action potential will not be produced. The reduction in this neuromuscular transmission is the electrophysiological defect that results in MG symptoms and the electrophysiological findings seen in the clinical diagnostic laboratory.<sup>89</sup>

### **3. Myasthenia Gravis**

#### **3.1 Epidemiology**

Autoimmune MG has a reported prevalence of 40-180 per million people and an annual incidence of 4-12 per million people.<sup>10 11</sup>

The prevalence is most likely to be due to improved diagnosis and treatment of MG, and an increasing longevity of the population in general.<sup>11</sup>

AChR-associated MG has a bimodal age pattern of incidence, with a peak in young adults aged about 30 years and then a steady increase in incidence with increasing age older than 50 years.<sup>12</sup> The incidence peak in young adults is mainly because of the high frequency in women, although the late-onset MG is slightly more frequent in men.<sup>11</sup>

Epidemiological data suggest that LRP4-associated MG is half as frequent as the MuSK form of the disease. MuSK-associated MG incidence is estimated at 0-3 patients per million per year, with a prevalence of 2-9 per million people, and is more common in Southern than northern Europe.<sup>13</sup>

Genetic predisposition and external factors linked to infections or diet are potential explanations for some geographical variation in this disease and its subtypes.

#### **3.2 Clinical Presentation**

Muscle weakness involving susceptible muscle groups is a major symptom and sign in MG. The combination of weakness localisation, variation in weakness over time, and

exercise-induced weakness usually gives strong clues to the diagnosis of the disease for all subgroups.<sup>8 14 15</sup>

Patients often note that their weakness fluctuates from day to day or even from hour to hour, worsens with activity, and improves with rest. Patients can have varying degrees of ptosis, diplopia, dysarthria, dysphagia, dyspnea, facial weakness, or fatigable limb or axial weakness. Ocular weakness, presenting as fluctuating ptosis and/or diplopia, is the most common initial presentation of MG, occurring in approximately 85% of patients.<sup>16</sup> Disease progression to generalised weakness usually occurs within 2 years of disease onset. Weakness of facial muscles is quite common and many patients with MG have detectable weakness of eyelid closure with or without lower facial weakness when examined carefully.

The course of MG is variable. Many patients experience intermittent worsening of symptoms triggered by infections, emotional stress, surgeries, or medications, particularly during the first year of the disease. Progression to maximum severity typically occurs within the first 2 years of onset.<sup>16</sup> Spontaneous long-lasting remissions are uncommon, but have been reported in 10-20% of patients.<sup>16</sup>

### **3.3 Pathophysiology**

#### **3.3.1 The NMJ in MG**

In MG, loss of functional AChRs results in a decrease in EPP amplitudes that fall below the threshold required for muscle fibre action potential generation during repetitive nerve depolarisations, resulting in neuromuscular transmission failure.

#### **3.3.2 AChR Antibodies**

The pathogenic role of anti-AChR antibodies in MG has been clearly shown and three main mechanisms underlie the loss of functional AChRs.<sup>17</sup>

The most important might be the complement-mediated lysis of the muscle endplate resulting in morphological damage to the postsynaptic muscle membrane. This causes a simplification and a distortion of the normal folded pattern of the postsynaptic membrane, which not only has impact on AChRs but also results in a reduction in the number of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, increasing the muscle fibre action potential threshold.<sup>18</sup>

The complement cascade system plays an important role in both innate and antibody-mediated immunity. It acts to defend the host against infection by recognizing and eliminating microorganisms and forms a link between innate and adaptive immunity by enhancing antibody responses. It is also involved in the removal of immune complexes and dead or modified self-cells, which its activation is sequential and carefully regulated by surface membrane regulators such as CD55 (decay-accelerating factor (DAF)) and CD59 (protectin).<sup>19 20</sup>

The classical pathway is activated in anti-AChR<sup>+</sup> MG, resulting in the formation of membrane attack complexes (MACs). These MACs, complement proteins C3 and C9, which are intermediates in MAC formation, and IgG deposits in postsynaptic endplate damaging their components and compromising the neuron transmission.<sup>21</sup>

Second, accelerated internalisation and degradation of AChRs caused by cross-linkage of AChRs by divalent antibodies results in loss of AChRs.<sup>22</sup>

Finally, direct blockade of AChRs by antibodies attached to acetylcholine binding sites might be important in some patients.<sup>23</sup>

Pathogenic anti-AChR antibodies are high-affinity IgG1 and IgG3, whose synthesis requires that activated CD4<sup>+</sup> T cells interact with B cells. This interaction might reflect the role of thymus in anti-AChR antibodies formation, which has AChRs in its muscle cells.

### **3.3.3 MuSK Antibodies**

Muscle-specific tyrosine kinase (MuSK) is a transmembrane endplate polypeptide involved in a signalling pathway that is responsible for the AChR clustering and maintenance of the normal functional integrity of the NMJ.

MuSK antibodies are mainly IgG4, which can neither activate complement nor induce antigen internalization, but rather can cause MG by direct inhibition of protein function.<sup>24</sup>

The main effector mechanism of the antibody is thought to be interference with MuSK-LRP4 binding, with consequent dispersal of AChR clusters.<sup>25</sup>

Few studies have evaluated lymphocyte responses in MuSK<sup>+</sup> MG. When compared with controls, patients had an increased frequency of CD4<sup>+</sup> T cells with an inflammatory phenotype and a reduced rate of IL-10-producing B regulatory (B10) cells.<sup>26</sup> In addition, MuSK-specific T cell repertoire was found to be restricted in patients sharing the human

leukocyte antigen (HLA) DQ5, suggesting that DQ5 alleles play a role in antigen presentation.<sup>27</sup>

Another study indicated that MuSK IgG4 may interfere with the binding between collagen-Q and MuSK.<sup>28</sup>

### **3.3.4 LRP4 Antibodies**

LRP4 is a low-density lipoprotein related receptor protein 4 which was recently identified as the long-sought postsynaptic receptor for nerve derived agrin and, consequently, as an activator of MuSK.<sup>29</sup>

LRP4 antibodies, predominantly IgG1, inhibit the agrin-Lrp4 interaction and the agrin-induced AChR clustering.<sup>30 31</sup>

Blocking of agrin signalling is certainly one of the most plausible pathological mechanisms for Lrp4 antibodies.<sup>32</sup> Indeed, impaired agrin signalling leads to less stable neuromuscular junctions, with more dispersed and un-clustered AChRs.

However, other pathophysiological mechanisms of Lrp4 antibodies such as blocking the Lrp4-MuSK interaction or a role for complement, which is implied by the involvement of the IgG1 autoantibodies, cannot be excluded.

### **3.3.5 Agrin Antibodies**

Agrin Antibodies can be detected in a minority of patients with MG, either with or without antibodies against AChR, MuSK or LRP4. Agrin antibodies have been detected only in patients with MG, suggesting that these antibodies are specific to the disease.<sup>33 34 35</sup>

Agrin is a heparan sulphate proteoglycan released from the motor nerve terminal. It regulates the formation, maintenance and regeneration of the neuromuscular junction, and interference with agrin function leads to insufficient neuromuscular transmission. To date, no directly pathogenic effect of agrin antibodies has been established, although such antibodies inhibit MuSK phosphorylation and AChR clustering in vitro.<sup>33</sup>

### **3.3.6 Titin Antibodies**

Antibodies against titin can be detected in 20-30% of MG patients with AChR antibodies, mostly in patients with thymoma-associated disease or late-onset MG.<sup>6 36</sup> Titin is located intracellularly and is essential for muscle contractility.<sup>37</sup> Given its intracellular location, titin antibodies should not interfere with muscle function. Nevertheless, their

presence indicates a more severe form of MG with mild myopathy and a need for immunosuppressive treatment. Moreover, antibodies against titin are a sensitive marker of thymoma in patients with myasthenia gravis whose symptom onset occurs before the age of 50 years.<sup>6 36</sup>

### **3.3.7 K<sub>v</sub>1.4 Antibodies**

Antibodies against the  $\alpha$  subunit of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel K<sub>v</sub>1.4 in skeletal muscle are detected in 10-20% of patients with MG.<sup>38 39</sup> K<sub>v</sub>1.4 channels are widely expressed in the CNS, where they are concentrated in axonal membranes and near axons, and are also present in the endocardium. In MG K<sub>v</sub>1.4 antibodies seem to cross-react with voltage-gated K<sup>+</sup> channels in the heart muscle.<sup>38 39</sup> *In vivo*, antibody binding to K<sub>v</sub>1.4 in MG has not been confirmed.

### **3.3.8 Ryanodine Receptor Antibodies**

Antibodies against ryanodine receptor (RyR) are present in 70% of AChR-MG patients with thymoma and in 14% of patients with late-onset AChR-MG.<sup>40</sup> The RyR is the Ca<sup>2+</sup> channel in sarcoplasmic reticulum.<sup>41</sup> It opens upon depolarization of the sarcolemma and participates in muscle contraction through release of calcium from sarcolemma into the cytoplasm.<sup>41</sup> The presence of anti-RyR Abs indicates severe MG, though the pathogenic role of these has not been established yet.<sup>41</sup>

### **3.3.9 Collagen Q Antibodies**

Collagen Q, only found in the NMJ, is a protein that concentrates and anchors acetylcholinesterase at the NMJ, where it is localized in the extracellular matrix and is, thus, accessible to antibodies. Antibodies against collagen Q were recently detected in the serum of 3% of patients with MG and some of them without other antibodies found. As mutations in collagen Q can lead to myasthenic syndromes, anti-collagen Q antibodies might be pathogenic.<sup>42</sup> However the interference with anticholinesterase therapies, remains to be proved.<sup>6</sup>

### **3.3.10 Cortactin Antibodies**

Cortactin is a cytosolic actin-binding protein present in the skeletal muscle that promotes actin assembly.<sup>43</sup> It is also a signalling protein involved in AChR clustering mediated by agrin-MuSK complex.<sup>43</sup> They were recently identified in 20% MG patients

without MuSK or AChR antibodies and in 5% of MG patients with AChR antibodies. Their presence were also detected in patients with various autoimmune disorders.<sup>6</sup>

### **3.4 MG Subgroups**

According to MG clinical presentation and immunopathogenic biomarkers, patients can be stratified into subgroups assigning each patient to one subgroup and only.

The criteria for this subgrouping include clinical symptoms, group of muscles affected, age of onset, thymic pathology and autoantibodies.

#### **3.4.1 Ocular MG Form**

In 15% of patients with MG, ocular symptoms are the only detected during the disease course. Patients with purely ocular form are at risk of developing generalised MG (gMG), especially in the first 2 years. One-half of these patients with ocular MG have detectable anti-AChR antibodies, and the other half have antibodies only detected by cell-based assays, not identified in the classical assay.

#### **3.4.2 Generalized MG Form**

##### **3.4.2.1 Anti-AChR Antibodies**

###### **3.4.2.1.1 Early-Onset MG**

Patients with early-onset have their first symptom before 50 years old, with AChR Abs in their serum. The histology of thymus in this group is predominantly follicular hyperplasia that is found mainly in women and this group usually responds to thymectomy as a first-line of treatment when the disease onset is stabilized.

Early-onset MG has an association with HLA-DR3, HLA-B8 and other autoimmune risk genes localized in the major MHC.<sup>44</sup>

###### **3.4.2.1.2 Late-Onset MG**

This MG form is more frequent in men after 50 years old and serum anti-AChR Abs are present. There is no HLA associations and thymic dysfunction is too evident. Most patients show generalized and severe symptoms such as bulbar involvement.<sup>45</sup>

###### **3.4.2.1.3 Thymoma-associated MG**

Thymoma-associated MG is a paraneoplastic disease, recorded in 10-15% of all patients with MG. All diagnosed patients have anti-AChR antibodies and generalised disease.<sup>46</sup>

Other autoantibodies such as anti-ryanodine antibodies, anti-titin antibodies or anti-striated muscle antibodies are frequently found in those patients. Consequently, their detection allows a more precise diagnose of a thymoma.<sup>47</sup>

### **3.4.2.2 Anti-MuSK MG**

The presence of anti-MuSK antibodies is usually associated with more severe and generalized muscle weakness and atrophy, with a predominant involvement of cranial and bulbar muscles, more frequent among women. Moreover, respiratory weakness is more likely in anti-MuSK-MG than other subtypes.<sup>48</sup>

The patients in this subgroup do not respond to thymectomy, indicating that thymic dysfunction is absent. There is also an HLA association with HLA-DQ5, not seen in other MG subgroups.<sup>49 50</sup>

### **3.4.3 LRP4-associated MG**

LRP4 antibodies were discovered in a subgroup of patients seronegative for AChR and MuSK antibodies, with an ocular or generalized mild MG, more frequently present in women patients.<sup>30</sup>

### **3.4.4 Seronegative MG**

Some patients have low-affinity antibodies or low concentration of antibodies to AChR, MuSK or LRP4 antigen targets that are not detected by classical immune-assays.<sup>51</sup>

Although is also possible that those patients have serum antibodies against yet undefined antigens in the NMJ.<sup>52</sup>

## **3.5 Diagnosis**

Clinical presentation, symptoms such as diplopia, ptosis, bulbar disorders, weakness and fatigue, is relevant for a confident diagnosis but in some cases complementary exams, electrophysiological and immunological tests are needed due to the variability of pathophysiology of MG.<sup>53</sup>

Currently, immunological assays for antibodies detection are imperative to properly diagnose the MG form for each patient.

In patients with anti-AChR<sup>+</sup> antibodies, presenting a generalized form of MG, CT scan is important to mislead the presence or absence of a thymoma.



## **4. Classical Therapeutic Strategies**

### **4.1 Symptomatic drug therapy**

Due to the heterogeneity of patients' presentation and severity, treating MG choosing an optimal strategy, implies considering the subgroup division.

The classical treatments include molecules for symptoms managing and drugs targeting the auto-immune mechanisms of MG, which could be a short-term or long-term management of the disease.

#### **4.1.1 Cholinesterase Inhibitors**

As a first-line treatment of MG, inhibition of acetylcholinesterase at the NMJ, increase the half-life of acetylcholine and optimize its potential to interact with AChR.<sup>54</sup>

Pyridostigmine 60 mg is the most commonly used drug, which daily intake must be divided during the day (for example, every 6 hours). In some cases, the drug intake precedes meals especially in patients who have dysphagia and other muscle weakness that might compromise their daily-routine.

Patients with anti-MuSK antibodies often respond poorly to cholinesterase inhibitors, indicating that this strategy is not advised.<sup>13</sup>

#### **4.1.2 Immunosuppressive drug treatment**

Nearly, all MG patients with early-onset, late-onset, thymoma and MuSK<sup>+</sup> require immunosuppressive therapy to avoid autoantibody production and its effects.

In LRP4<sup>+</sup> MG, the disease is relatively mild and immunosuppression is not always needed.

For ocular MG form, immunosuppression can both improve symptoms (ptosis and diplopia) and prevent generalized weakness.<sup>55</sup>

##### **4.1.2.1 Steroids**

Corticosteroid treatment was the first widely used immunosuppressive therapy introduced in MG.

By decreasing inflammation and reducing the activity of the immune system, steroids are adjuvant treatment in patient who do not meet treatment objectives with pyridostigmine alone.<sup>56</sup>

The current guidelines approaching corticosteroid therapy suggest a initial high dose of 0.75-1.00 mg/kg daily of prednisone or prednisolone until reaching the outcome expected. After that point, consecutive low doses are administered to establish a as low as possible dose with no symptoms detected.<sup>56</sup> It can be expected that a patient could continue low doses for many years.

#### **4.1.2.2 Non-steroid immunosuppressive agents**

These class of drugs are used in combination with corticosteroids, known as steroid-sparing immunosuppressants.

##### **4.1.2.2.1 Azathioprine**

Azathioprine is a purine analogue that inhibits nucleic acid synthesis, and thereby interfering with T and B cells proliferation.

Although this therapy is a first-line of treatment and effective in almost all patients with MG, with 2-3 mg/kg day as the suggested dose, it has two cons: delayed effect, usually seen after 6-15 months, and low thiopurine methyltransferase activity increases the risk of toxic effects. So, thiopurine methyltransferase phenotype or genotype might be tested before starting treatment.<sup>57</sup>

##### **4.1.2.2.2 Mycophenolate mofetil**

Mycophenolate mofetil is a prodrug that selectively inhibits activity of guanosine nucleotide synthesis in activated T and B cells.<sup>58 59</sup>

Most guidelines recommend the drug for mild to moderate MG if the initial immunosuppressive therapy fails, with a clinical response time of approximately 11 weeks.<sup>59</sup>

Although, there are some concerns about the increasing risk of lymphoproliferative disease and blood counts should be monitored.<sup>60 61</sup>

##### **4.1.2.2.3 Cyclosporine**

Cyclosporine, the first immunosuppressant drug shown to be effective in the treatment of generalized MG and thymoma-associated MG, interferes with calcineurin signalling, suppresses cytokine secretion including interleukin-2 and interferon- $\gamma$ , and interferes with T-helper cell activation.<sup>62</sup>

The initial dose of cyclosporine is 3 mg/kg/day, usually split in 2 intakes.

#### **4.1.2.2.4 Tacrolimus**

Tacrolimus is a macrolide antibiotic, similar to cyclosporine in its biological activity, also used in combination with corticosteroids.<sup>63</sup>

#### **4.1.2.2.5 Methotrexate**

Methotrexate is a folate antimetabolite that inhibits dihydrofolate reductase, which has an immunomodulatory effect, and as data suggests its efficacy is similar to azathioprine.<sup>64</sup>

Although their similarities, methotrexate is used not only as a second-line treatment but also there is limited data of clinical trials about drug effectiveness.<sup>65</sup>

#### **4.1.2.2.6 Cyclophosphamide**

Cyclophosphamide is an alkylating agent that modifies the guanine base of DNA, conferring cytotoxic effects and consequently suppressing B and T cells proliferation.

This therapy option remains for severe and refractory onset of the disease. However, owing to a poor tolerability profile and the advent of new alternative immunotherapy, cyclophosphamide is rarely used for MG.<sup>66 67</sup>

### **4.1.3 Intravenous Immunoglobulins and Plasmapheresis**

Intravenous Immunoglobulins and Plasmapheresis are used for acute severe exacerbations in generalized MG, to optimize clinical outcome before surgery or for short-term immunotherapy in case of an incident of MG crisis.<sup>68 69</sup>

Both therapies can be used separated with effectively improve strength in patients with severe MG. Although, sometimes they need to be implanted together for a maximum response.<sup>69</sup>

Nevertheless, Plasmapheresis is the treatment choice in MG crisis because of the faster onset of action.

There is also a remarkable response from Plasmapheresis of patients with MuSK<sup>+</sup> once they were refractory to all therapeutics.<sup>13</sup>

Currently, a specific system of apheresis consisting on selective Immunoabsorption of the anti-AChR antibodies is under development with a demonstrated more safety profile and without replacement fluid need in comparison with plasmapheresis.<sup>70</sup>

## 4.2 Thymectomy

The role of the thymus in MG has provided a justification for this medical procedure. Patients with early-onset showing thymic hyperplasia or patients with a thymoma, a malignant tumour, responded to the treatment.<sup>71 72</sup>

Anti-AChR antibodies, as markers of early-onset or thymoma are present in patients serum, indicate a beneficial outcome to this group of patients.

However, patients with thymoma have more severe disease so, removal of the tumour could not lead to total remission or even improvement.<sup>72</sup>

Thus, patients who are routed to this procedure should be in a stable condition. Intravenous immunoglobulin or plasmapheresis therapy before surgery will improve symptoms and minimize the risk of complications.<sup>69</sup>

## 5. Innovative Therapeutic Targets

### 5.1 Approved New Therapeutics

#### 5.1.1 Complement Inhibitor: Eculizumab

Eculizumab is a humanized monoclonal antibody that specifically binds to complement protein C5 preventing its cleavage into C5a and C5b.<sup>73 74</sup>

Once complement is activated only by anti-AChR antibodies, Eculizumab appears to be a possible strategy for patients with generalized MG who were refractory to other treatments.<sup>75</sup>

Its efficacy and safety have already been evaluated in two clinical trials with refractory anti-AChR<sup>+</sup> gMG patients.<sup>76 74</sup>

Thus, by focusing on the innate immune system, terminal complement inhibition by Eculizumab represent a new approved approach for managing patients with severe and refractory gMG.

To be noted that Eculizumab had already been authorized for treatment of Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH) and Atypical Hemolytic uremic Syndrome ( aHUS).<sup>778</sup>

### **5.1.2 Anti-CD20 Antibody: Rituximab**

Rituximab is a monoclonal antibody against transmembrane-protein CD20 presented in B lymphocytes.<sup>79</sup>

This transmembrane protein CD20 participates in activation and differentiation of B cells, depleting them through different ways: cell mediated lysis through binding of macrophages or natural killer cells to Fc-receptor, complement activation of the membrane attack complex and induction of cell apoptosis by changing lipid membrane in B cells.<sup>80 81</sup>

Originally, Rituximab was used to treat B-cell malignancies, such as non-Hodgkin's lymphoma and several autoimmune diseases including rheumatoid arthritis, systemic erythematous lupus and pemphigus vulgaris.<sup>82</sup>

Several clinical trials and case reports suggested that Rituximab could be an effective treatment to AChR<sup>+</sup> or MuSK<sup>+</sup> patients with generalized and severe disease form who do not respond to other treatments.<sup>83</sup>

## **5.2 Potential Therapeutic Targets**

Acquiring knowledge about the immunopathogenesis of the MG, will allow to identify specific immune targets crucial to the development and maintenance of the disease with a more focused treatment and fewer adverse events.

### **5.2.1 T-cell Signalling Pathways and Tregs**

Targeting T-cell co-stimulatory and co-inhibitory pathways has become a major therapeutic strategy in the immunotherapy of autoimmune diseases, transplantation and cancer.<sup>84</sup> T-cell responsiveness is determined by the recognition of a specific complex of peptide-major histocompatibility complex by the T-cell receptor in combination with engagement of co-signalling pathways that promote or inhibit T-cell activation, thereby improving T-cell response.<sup>85</sup> CD28 (T cell-specific surface glycoprotein CD28) is the primary co-stimulatory molecule for CD4<sup>+</sup> helper T cells and binds the CD80 and CD86 ligands that are expressed on antigen presenting cells (APCs), including B cells.<sup>86</sup> CD28 co-stimulation increases T-cell responses in naïve cells by increasing cytokine production, mainly IL-2, which binds to CD25 on T cells and promotes proliferation. CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte protein 4) is a co-inhibitory molecule expressed on CD4<sup>+</sup> T cells upon activation, which also binds CD80 and CD86, and plays a critical role in the down-regulation of antigen-activated immune responses.<sup>86</sup>

This pathway can be blocked using an immunoglobulin fusion protein, CTLA-4-Ig (abatacept), which binds to CD80/CD86 and blocks both activating (CD28) and inhibitory signals (CTLA-4). Abatacept has been tested clinically and has been shown to be effective and safe, and is currently used for treatment of rheumatoid arthritis (RA).<sup>87</sup>

However, co-stimulation blockade with abatacept has different effects, depending on the type of T cell response.

There is evidence that AChR-associated MG is primarily mediated by Th1 T-cell responses, although there is recent evidence of the involvement of IL-17-producing T cells as well.<sup>88 89</sup>

There is additional evidence that CTLA-4 expression on T cells may be altered in MG. Furthermore, a recent genome-wide association study in patients with AChR-positive MG identified an association signal at the CTLA-4 gene, suggesting that aberrant cellular mechanisms involving CTLA-4 may predispose to MG and that therapies targeting this pathway should be considered.<sup>44</sup>

Upon activation, T cells express another co-stimulatory molecule referred to as the inducible T cell co-stimulator protein (ICOS), which, upon binding to ICOS-ligand on APCs, it regulates T and B cells activation.<sup>90</sup> ICOS inhibition can improve autoimmunity in diseases in which antibodies are produced, suggesting a useful strategy for MG.

Another co-stimulatory molecule responsible for T cell activation is OX40, which binds to OX40L on the APC and enhances cytokine production, proliferation and T cells survival.<sup>91</sup> There is also accumulating evidence that OX40-OX40L pathway controls Tregs suppressive abilities. Thus, targeting this pathway could be further investigated.<sup>92</sup>

In autoimmune diseases, lack of functional Tregs may be the cause, and a subset of T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, are important in maintenance of immune homeostasis against self-antigens.<sup>93</sup> Tregs have been implicated in preventing autoantibody production and dysfunction or deficiencies of Tregs have been demonstrated in MG, suggesting a possible target.<sup>94</sup>

### 5.2.2 Tcell-B cell Interactions

CD40 is expressed on APCs, as macrophages and dendritic cells, as well as B cells.<sup>95</sup> CD154 or CD40L, the ligand for CD40, is expressed on activated T cells, so targeting CD154 can decrease B cells activation and consequently a decrease in the AChR-specific humoral response.<sup>96</sup>

There is evidence that both Th1 and Th17 cells are involved and necessary for the AChR-specific B-cell responses in MG associated with anti-AChR antibodies.<sup>97</sup> In MuSK-positive MG, where interaction between T-cells and antibody-producing B cells is not yet well characterized, the possible explanation for B cell depletion is that anti-MuSK antibody-producing plasmablasts are eliminated and so targeting CD40 might be effective in MuSK MG as CD40 signalling is necessary for B-cell differentiation into plasmablasts.<sup>95</sup>

Also, T follicular helper (TFH) cells, which provide B cells help during an autoimmune response, are an emergent target, as there is evidence that the dysfunction of TFH cells are potentially involved in this autoimmunity pathway.<sup>98</sup>

### 5.2.3 B cells, C-cell Trophic Factors and Plasma cells

Targeting B cells may provide benefit not only by reducing antibody-producing cells but also by modulating other B-cell functions, including antigen presentation and cytokine production. Recently a subset of B cells, regulatory B cells or B10 cells, have been characterized based on their production of IL-10 and suppressing B-cell responses.<sup>99</sup> It has been shown that MG patients might have reduced B cells in circulation, correlating with disease severity and patients responding to B cell depletion with Rituximab exhibit a faster re-population of B10 cells, suggesting a potential mechanism.<sup>100</sup>

BAFF is a survival factor for B cells and are important in their proliferation and differentiation.<sup>101</sup> Studies have shown that BAFF serum levels are elevated in patients with AChR<sup>+</sup> and MuSK<sup>+</sup> MG, and those levels may be specially increased in patients with active AChR<sup>+</sup>.<sup>102 103</sup> Belimumab, a human monoclonal antibody targeting BAFF binds to soluble BAFF rather than membrane-bound BAFF on B cells, reducing B-cell activation and differentiation into antibody-producing plasma cells.<sup>104</sup>

Bortezomib is a proteasome activity inhibitor in plasma cells, disrupting proteolytic pathways and consequently leading to protein accumulation within plasma cells and causing cell death. In experimental MG, bortezomib reduced AChR antibodies, resulting in a clinical improvement.<sup>105</sup>

#### 5.2.4 Fc Receptor Modulation

Fc receptors are indispensable in the humoral and cellular immune response through their interactions with IgG and have become a viable target for treatment of autoimmune disease. Antibodies of IgG isotype interact with immune system via Fcγ receptors expressed on immune cells, including B cells.<sup>106</sup> These interactions provide both positive and negative regulatory signals, modulating the immune response. Positive signalling occurs by FcγRs, which have different affinities for IgG Fc based on IgG isotype. Negative signals are mediated through the inhibitory FcγRIIb expressed on B cells, which upon engagement suppress B-cell activation.<sup>106</sup>

Intravenous Immunoglobulins have an effect on Fc receptors, and consequently the therapeutic effect may be affected by glycosylation of Fc core, enhancing efficacy in autoimmune disease.<sup>107</sup> The effect of IVIg in MG has been attributed to IgG Fc domains, through interaction with Fcγ receptors.<sup>108</sup>

Thus, targeting FcR-IgG interactions might be a strategy to lower endogenous IgG.

Another promising approach is the design of biospecific ligands targeting the inhibitory FcγRIIb and B-cell receptor.<sup>109</sup>

#### 5.2.5 Cytokine, Cytokine Receptors and Growth Factors

There is evidence that both Th1 and Th2 cytokines are involved in the pathogenesis of MG with differences between each MG subgroup. Targeting Th1 cytokines such as IL-12 and tumour necrosis factor-α have produced promising results in experimental models but, owing to safety concerns, have been difficult to apply in clinic. As suggested in evidences, Th17 immune reactions are important in MG, and cytokines such as IL-17 and IL-6 may represent attractive therapeutic targets. Several human monoclonal antibodies against IL-17 and IL-6 are in development, including brodalumab, ixekizumab and secukinumab. In MG, IL-6 appears to be a promoter of B-cell differentiation and proliferation and also induction of B-cell maturation into antibody-producing plasma cells.<sup>110</sup>

GM-CSF is a cytokine acting as an important hematopoietic growth factor and immune modulator that affects different circulating immune cells. Its effects on dendritic cell maturation and the enhancement of Treg function have been studied in various autoimmune models.<sup>111</sup> GM-CSF has been shown to enhance the *in vitro* suppressive function of isolated Tregs from patients with MG, possibly by up-regulating FOXP3



expression in these cells.<sup>112</sup> In a patient with severe MG, treatment with GM-CSF increased FOXP3 expression in Tregs and improved Treg-mediated suppression of T-cell proliferation followed by polyclonal or AChR-specific stimulation.<sup>113</sup> Despite of that, clinical trials to assess safety of GM-CSF are needed in order to expand its use.

### **5.2.6 Vaccination**

The idea of immune system tolerance to AChR by administering AChR peptides orally or nasally has been investigated in experimental MG models.<sup>114 115</sup>

DNA vaccinations have also been proposed but, as peptide vaccines, there is a primary concern about potential exacerbation of anti-AChR immune response. Recently, immunization with AChR cytoplasmic domains has been proposed as a promising antigen-specific therapeutic approach.<sup>116</sup>

### **5.2.7 Autologous Stem Cell Transplantation**

The strategy of autologous stem cell transplantation as a therapeutic approach for refractory MG, tried in other autoimmune diseases, is based on the idea that the transplanted immune cells will be re-established and without immune reaction.<sup>117</sup>

## **6. Conclusions**

The current strategies in Myasthenia Gravis consists in generalized immunosuppression and symptomatic treatment, rather than specific targeting of potential antigen-presenting molecules.

The development of new targeted therapies, according to immunopathogenesis of MG, might help to improve quality of life in patients who suffer from side effects associated with chronic use of currently used drugs as it might be an option for people who are refractory to those therapies.

In fact, disease heterogeneity in MG suggests that future therapeutic approaches should be tailored to each MG subgroup.

In the coming years, through all the innovation in science and technology, it is expected more clinical trials aiming new molecules as well as more therapeutic options approved in the pharmaceutical market.

## 7. References

1. BERRIH-AKNIN, S., FRENKIAN-CUVELIER, M. and EYMARD, B. - **Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis.** *J. Autoimmun.*, 48–49 (2014) 143–148.
2. GILHUS, N. E., SKEIE, G. O., ROMI, F., LAZARIDIS, K., ZISIMOPOULOU, P. and TZARTOS, S. - **Myasthenia gravis - Autoantibody characteristics and their implications for therapy.** *Nat. Rev. Neurol.*, 12 (2016) 259–268.
3. BURDEN, S. J., YUMOTO, N. and ZHANG, W. - **The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease.** *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5 (2013).
4. EVOLI, A., ALBOINI, P. E., DAMATO, V., IORIO, R., PROVENZANO, C., BARTOCCIONI, E. and MARINO, M. - **Myasthenia gravis with antibodies to MuSK: An update.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1412 (2018) 82–89.
5. VERSCHUUREN, J. J. G. M., HUIJBERS, M. G., PLOMP, J. J., NIKS, E. H., MOLENAAR, P. C., MARTINEZ-MARTINEZ, P., GOMEZ, A. M., DE BAETS, M. H. and LOSEN, M. - **Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4.** *Autoimmun. Rev.*, 12 (2013) 918–923.
6. ZISIMOPOULOU, P., BRENNER, T., TRAKAS, N. and TZARTOS, S. J. - **Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens.** *Autoimmun. Rev.*, 12 (2013) 924–930.
7. GILHUS, N. E. and VERSCHUUREN, J. J. - **Myasthenia gravis: Subgroup classification and therapeutic strategies.** *Lancet Neurol.*, 14 (2015) 1023–1036.
8. QUEROL, L. and ILLA, I. - **Myasthenia gravis and the neuromuscular junction.** *Curr. Opin. Neurol.*, 26 (2013) 459–465.
9. CONTI-FINE, B. - **Myasthenia gravis: past, present, and future.** *J. Clin. Invest.*, 116 (2006) 2843–2854.
10. PHILLIPS, L. H. - **The epidemiology of myasthenia gravis.** *Semin. Neurol.*, 24 (2004) 17–20.

11. CARR, A., CARDWELL, C., MCCARRON, P. and MCCONVILLE, J. - **A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis.** BMC Neurol., 10 (2010) 1–9.
12. ANNE, T., JONE, F. and GILHUS, E. - **Seropositive myasthenia gravis: A nationwide epidemiologic study.** Neurology, (2009) 150–151 doi:10.1038/nrneuro.2016.30 .World.
13. GUPTILL, J. T., SANDERS, D. B. and EVOLI, A. - **Anti-MuSK antibody Myasthenia gravis: Clinical findings and response to treatment in two large cohorts.** Muscle and Nerve, 44 (2011) 36–40.
14. MERIGGIOLI, M. N. and SANDERS, D. B. - **Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity.** Lancet Neurol., 8 (2009) 475–490.
15. SKEIE, G. O., APOSTOLSKI, S., EVOLI, A., GILHUS, N. E., ILLA, I., HARMS, L., HILTON-JONES, D. and EATON, L. - **Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders.** (2010) 893–902 doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03019.x.
16. GROB, D., BRUNNER, N., NAMBA, T. and PAGALA, M. - **Lifetime course of myasthenia gravis.** Muscle and Nerve 37 (2008) 141–149.
17. DRACHMAN, D. B., ADAMS, R. N., STANLEY, E. F. and PESTRONK, A. - **Mechanisms of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis.** J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 43 (1980) 601–610.
18. RUFF, R. L. and LENNON, V. A. - **How myasthenia gravis alters the safety factor for neuromuscular transmission.** J. Neuroimmunol., 201–202 (2008) 13–20.
19. COL-, I., CAMPUS, H., HOSPITAL, H., CANE, D. and KINGDOM, U. - **First of Two Parts.** English J., 344 (2005) 1058–1066.
20. ZIPFEL, P. F. and SKERKA, C. - **Complement regulators and inhibitory proteins.** Nat. Rev. Immunol., 9 (2009) 729–740.
21. HOWARD, J. F. - **Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction.** Ann. N. Y. Acad. Sci., 1412 (2018) 113–128.
22. HEINEMANN, S., BEVAN, S. and KULLBERG, R. - **Modulation of acetylcholine receptor by antibody against the receptor.** 74 (1977) 3090–3094.

23. BURGESS, J., HALL, Z. and VINCENT, A. - **Myasthenia Gravis plasma immunoglobulin reduces miniature endplate potentials at human endplates in vitro.** (1990) 407–413.
24. KONECZNY, I., STEVENS, J. A. A., ROSA, A. DE, HUDA, S., HUIJBERS, M. G., VINCENT, A., RICCIARDI, R., MARTINEZ-MARTINEZ, P. and LOSEN, M. - **IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients** *Silv e.* (2016) 1–12 doi:10.1016/j.jaut.2016.11.005.
25. HUIJBERS, M. G., ZHANG, W., KLOOSTER, R., NIKS, E. H., FRIESE, M. B. and STRAASHEIJM, K. R. - **MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4.** *J. Neurosci.* (2013) 20783–20788.
26. GUPTILL, J. T., YI, J. S., SANDERS, D. B., GUIDON, A. C., JUEL, V. C., MASSEY, J. M., HOWARD, J. F., EVOLI, A. and WEINHOLD, K. J. - **Characterization of B cells in muscle-specific kinase antibody myasthenia gravis.** (2015) 1–10 doi:10.1212/NXI.0000000000000077.
27. MARINO, M., TERESA, M., DI, G., SCUDERI, F., LA, F., TRAKAS, N., PROVENZANO, C., ZISIMOPOULOU, P., RIA, F., TZARTOS, S. J., EVOLI, A. and BARTOCCIONI, E. - **T cell repertoire in DQ5-positive MuSK-positive myasthenia gravis patients.** *J. Autoimmun.*, (2013) 1–9 doi:10.1016/j.jaut.2013.12.007.
28. KAWAKAMI, Y. - **Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK.** (2011).
29. KIM, N., STIEGLER, A. L., CAMERON, T. O., HALLOCK, P. T., GOMEZ, A. M., HUANG, J. H., HUBBARD, S. R., DUSTIN, M. L. and BURDEN, S. J. - **Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK.** *Cell*, 135 (2008) 334–342.
30. HIGUCHI O, HAMUO J, MOTOMURA M, ET AL. - **Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis.** *Ann Neurol*, 69 (2011) 418–422.
31. ZHANG, B., - **Autoantibodies to Lipoprotein-Related Protein 4 in Patients With Double-Seronegative Myasthenia Gravis.** (2015) doi:10.1001/archneurol.2011.2393.

32. KUMMER, T. T., MISGELD, T. and SANES, J. R. - **Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost.** (2006) 74–82 doi:10.1016/j.conb.2005.12.003.
33. GASPERI, C., MELMS, A., SCHOSER, B. and GASPERI, C. - **Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis.** (2014) doi:10.1212/WNL.0000000000000478.
34. ZHANG, B., SHEN, C., BEALMEAR, B., RAGHEB, S. and XIONG, W. - **Autoantibodies to Agrin in Myasthenia Gravis Patients.** 9 (2014) 4–9.
35. WITZEMANN, V., GIORGIO, P. and YAMPOLSKY, P. - **The neuromuscular junction: Selective remodeling of synaptic regulators at the nerve / muscle interface.** 0 (2012).
36. SZCZUDLIK, P., SZYLUK, B., LIPOWSKA, M., RYNIOWICZ, B. and KUBISZEWSKA, J. - **Antititin antibody in early- and late-onset myasthenia gravis.** (2014) 1–5 doi:10.1111/ane.12271.
37. POWERS K, SCHAPPACHER-TILP G, JINHA A, LEONARD T, NISHIKAWA K, H. W. - **Titin force is enhanced in actively stretched skeletal muscle.** (2017) doi:10.1242/jeb.153502.
38. SUZUKI, S. - **Autoimmune Targets of Heart and Skeletal Muscles in Myasthenia Gravis.** 66 (2015) 1334–1338.
39. ROMI, F. - **Anti-voltage-gated potassium channel Kv1 . 4 antibodies in myasthenia gravis.** J. Neurol. 259, (2012) 1312–1316 doi:10.1007/s00415-011-6344-y.
40. SKEIE, G. O. - **Ryanodine Receptor antibodies in Myasthenia Gravis: Epitope mapping and effect on calcium release in vitro.** Muscle Nerve, 27 (2003) 81–89.
41. ROMI, F., SKEIE, G. O., GILHUS, N. E. & AARLI, J. A. - **Striational Antibodies in Myasthenia Gravis.** Arch. Neurol, 62 (2015) 442–446.
42. ZOLTOWSKA, M., BELAYA, K., LEITE, M., PATRICK, W., VINCENT, A. and BEESON, D. - **Collagen Q – A potential target for autoantibodies in myasthenia gravis.** J. Neurol. Sci., 348 (2015) 241–244.
43. GALLARDO, E. - **Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis.** Autoimmun. Rev., 13 (2014) 1003–1007.
44. RENTON, A. E. - **A Genome-Wide Association Study of Myasthenia Gravis.** JAMA Neurol, 72 (2015) 396–404.

45. ROMI, F., AARLI, J. A. and GILHUS, N. E. - **Myasthenia gravis patients with ryanodine receptor antibodies have distinctive clinical features.** *Eur J Neurol*, (2007) 617–620 doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01785.x.
46. MARX, A., FREDERICK, P., SCHALKE, B., SARUHAN-DIRESKENELI, G., MELMS, A. and STRÖBEL, P. - **Autoimmunity Reviews The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis.** (2013) doi:10.1016/j.autrev.2013.03.007.
47. SUZUKI, S., UTSUGISAWA, K., NAGANE, Y. and SUZUKI, N. - **Three Types of Striational Antibodies in Myasthenia Gravis.** *Autoimmune Dis*, 2011 (2011).
48. EVOLI, A., TONALI, P. A., PADUA, L., SCUDERI, F., BATOCCHI, A. P., MARINO, M. and BARTOCCIONI, E. - **Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis.** (2003) 2304–2311 doi:10.1093/brain/awg223.
49. BARTOCCIONI E, SCUDERI F, AUGUGIARO A, - **HLA class II allele analysis in Musk-positive Myasthenia Gravis suggests a role for DQ5HLA.** (2009) 2009–2012.
50. LEITE MI, STROBEL P, JONES M, MICKLEM K, MORITZ R, GOLD R, - **Fewer Thymic Changes in MuSK Antibody-Positive than in MuSK Antibody- Negative MG.** (2005) 444–448 doi:10.1002/ana.20386.
51. LEITE, M. I., JACOB, S., VIEGAS, S., COSSINS, J., CLOVER, L., MORGAN, B. P., BEESON, D., WILLCOX, N. and VINCENT, A. - **IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in ‘ seronegative ’ myasthenia gravis.** (2008) 1940–1952 doi:10.1093/brain/awn092.
52. COSSINS, J., BELAYA, K., ZOLTOWSKA, K., KONECZNY, I., MAXWELL, S., JACOBSON, L., LEITE, M. I., WATERS, P., VINCENT, A. and BEESON, D. - **The search for new antigenic targets in myasthenia gravis.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1275 (2012) 123–128.
53. MERIGGIOLI, M. N. and SANDERS, D. B. - **Myasthenia Gravis : Diagnosis.** (2004).
54. SANDERS, D. B., WOLFE, G. I., BENATAR, M., EVOLI, A., GILHUS, N. E., ILLA, I., KUNTZ, N., MASSEY, J. M., NICOLLE, M. and RICHMAN, D. P. - **International consensus guidance for management of myasthenia gravis Executive summary.** 87 (4) (2016) 419–426.
55. KERTY, E., ELSAIS, A., ARGOV, Z., EVOLI, A. and GILHUS, N. E. - **EFNS / ENS Guidelines for the treatment of ocular myasthenia.** (2014) 687–693 doi:10.1111/ene.12359.

56. PASCUZZI, R. M., COSLETT, H. B. and JOHNS, T. R. - **Long-Term Corticosteroid Treatment of Myasthenia Gravis : Report of 116 Patients.** (1984).
57. WITTE, A. S., CORNBATH, D. R., PARRY, G. J., LISAK, R. P. and SCHATZ, N. J. - **Azathioprine in the Treatment of Myasthenia Gravis.** *Ann Neurol*, 15 (6) (1984) 602–605.
58. STUDY, T. M. - **A trial of mycophenolate mofetil with prednisone as initial immunotherapy in myasthenia gravis.** *Neurology*, 85 (2008) 394–399.
59. SANDERS, D. B. and HART, I. K. - **An international , phase III , randomized trial of mycophenolate mofetil in myasthenia gravis.** *Neurology*, 71 (2008) 400–406.
60. VERNINO, S., SALOMAO, D. R., HABERMANN, T. M. and NEILL, B. P. O. - **Primary CNS lymphoma complicating treatment of myasthenia gravis with mycophenolate mofetil.** (2005) 639–641.
61. DUBAL DB, MUELLER S, RUBEN BS, - **T-cells lymphoproliferative disorder following Mycophenolate treatment for Myasthenia Gravis.** 39 (6) (2009) 849–850.
62. TINDALL RS, ROLLINS JA, PHILLIPS JT, - **Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis.** *N Engl J Med*, 316 (12) (2010) 719–724.
63. NAGANE, Y., UTSUGISAWA, K., OBARA, D. and KONDOH, R. - **Efficacy of Low-Dose FK506 in the Treatment of Myasthenia gravis – A Randomized Pilot Study.** 8505 (2005) 146–150.
64. HECKMANN, J. M., RAWOOT, A., BATEMAN, K., RENISON, R. and BADRI, M. - **A single-blinded trial of methotrexate versus azathioprine as steroid-sparing agents in generalized myasthenia gravis.** *BMC Neurol.*, (2011).
65. PASNOOR, M. - **A randomized controlled trial of methotrexate for patients with generalized myasthenia gravis.** *Neurology*, 87 (1) (2016) 57–64.
66. DE FEO LG, SCHOTTLENDER J, MARTELLI NA, - **Use of Intravenous pulsed Cyclophosphamide in severe, generalized Myasthenia Gravis.** *Muscle Nerve*, 26 (1) (2002) 31–36.
67. DRACHMAN DB, ADAMS RN, HU R, JONES RJ, B. R. - **Rebooting the Immune System with High-Dose Cyclophosphamide for Treatment of Refractory Myasthenia Gravis.** 314 (2008) 305–314.



68. BARTH D, NABAVI NOURI M, NG E, NWE P, B. V. - **Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis.** 76 (2017) 2017–2023.
69. GAJDOS P, CHEVRET S, CLAIR B, - **Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Clinical Study Group.** Ann Neurol, 41 (1997) 789–796.
70. KÖHLER, W., BUCKA, C. and KLINGEL, R. - **A Randomized and Controlled Study Comparing Immunoabsorption and Plasma Exchange in Myasthenic Crisis.** 355 (2011) 347–355.
71. CEA, G., BENATAR, M., RJ, V. and RA, S. - **Thymectomy for non-thymomatous myasthenia gravis ( Review ).** Cochrane Database Syst. Rev., (2013).
72. GRONSETH, G. S. and BAROHN, R. J. - **Practice Parameter: Thymectomy for autoimmune Myasthenia Gravis ( an evidence-based review) Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.** 55 (2000) 7–15.
73. DHILLON, S. - **Eculizumab: A Review in Generalized Myasthenia Gravis.** Drugs, 78 (2018) 367–376.
74. HOWARD, J. F. - **Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study.** Lancet Neurol., 16 (2017) 976–986.
75. SILVESTRI, N. J. and WOLFE, G. I. - **Treatment-Refractory Myasthenia Gravis.** 15 (2014) 255–260.
76. HOWARD, J. F., BAROHN, R. J., CUTTER, G. R., FREIMER, M., JUEL, V. C., MOZAFFAR, T., MELLION, M. L., BENATAR, M. G., FARRUGIA, M. E., WANG, J. J., MALHOTRA, S. S. and KISSEL, J. T. - **A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of eculizumab in patients with refractory generalized myasthenia gravis.** Muscle Nerve, 48 (2013) 76–84.
77. ROTHER, R. P., ROLLINS, S. A., MOJCIK, C. F., BRODSKY, R. A. and BELL, L. - **Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.** 25 (2007) 1256–1265.

78. WONG, E. K. S. and KAVANAGH, D. - **Anticomplement C5 therapy with eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and atypical hemolytic uremic syndrome.** *Transl. Res.*, 165 (2014) 306–320.
79. TANDAN R, HEHIR MK 2ND, WAHEED W, - **Rituximab treatment of Myasthenia Gravis: a systematic review.** 56 (2) (2017) 185–196.
80. HEIDEN, J. A. VANDER - **Dysregulation of B Cell Repertoire Formation in Myasthenia Gravis Patients Revealed through Deep Sequencing.** *J Immunol*, 198(4) (2017) 1460–1473.
81. TEDDER, T. E. and ENGEL, P. - **CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes.** *Immunol Today*, 15 (1994) 450–454.
82. KOSMIDIS, M. L. and DALAKAS, M. C. - **Practical considerations on the use of rituximab in autoimmune neurological disorders.** *Ther Adv Neurol Disord*, 3 (2) (2010) 93–105.
83. HAIN, B., JORDAN, K. and DESCHAUER, M. - **Successful treatment of MuSK antibody.** 33 (4) (2006) 575–580.
84. FELIX, N. J., SURI, A., SALTER-CID, L., NADLER, S. G., GUJRATHI, S., CORBO, M. and ARANDA, R. - **Targeting lymphocyte co-stimulation : From bench to bedside.** 43 (2010) 514–525.
85. JUNG, K. and CHOI, I. - **Emerging Co-signaling Networks in T Cell Immune Regulation.** 13 (2013) 184–193.
86. CHEN, L. and FLIES, D. B. - **Molecular mechanisms of T cell co - stimulation and co - inhibition.** *Nat. Publ. Gr.*, 2 (2013) 227–242.
87. KEATING, G. M. - **Abatacept: A Review of its Use in the Management of Rheumatoid Arthritis.** 73 (2013) 1095–1119.
88. SCHAFFERT H, PELZ A, SAXENA A, - **IL-17-producing CD4(+) T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis.** *Eur J Immunol*, 45 (2015) 1339–1347.
89. GRADOLATTO, A., NAZZAL, D., TRUFFAULT, F. and BISMUTH, J. - **Both Treg cells and Tconv cells are defective in the Myasthenia gravis thymus: Roles of IL-17 and TNF- a.** *J. Autoimmun.*, 52 (2014) 53–63.

90. ROZA I. NURIEVA. **Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS – B7h interaction.** *Immunol Rev*, 115 (2005) 19–25.
91. ISHII, N., TAKAHASHI, T., SOROOSH, P. and SUGAMURA, K. - **OX40-OX40 Ligand Interaction in T-Cell-Mediated Immunity and Immunopathology.** *Advances in Immunology* 105 (Elsevier Inc., 2010).
92. CROFT M, SO T, DUANW, S. P. - **The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease.** *Immunol Rev*, 229 (2009) 173–191.
93. SAKAGUCH, S., - **Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.** *Annu Rev Immunol*, 16 (2004) 73–80.
94. MASUDA, M., MATSUMOTO, M., TANAKA, S., NAKAJIMA, K., YAMADA, N., IDO, N., OHTSUKA, T., NISHIDA, M., HIRANO, T. and UTSUMI, H. - **Clinical implication of peripheral CD4 + CD25 + regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients.** *J. Neuroimmunol.*, 225 (2010) 123–131.
95. ZHANG, B., WU, T., CHEN, M., ZHOU, Y., YI, D. and GUO, R. - **The CD40 / CD40L system : A new therapeutic target for disease.** *Immunol. Lett.*, 153 (2013) 58–61.
96. IM, S., BARCHAN, D., MAITI, P. K. and SOUROUJON, M. C. - **Blockade of CD40 Ligand Suppresses Chronic Experimental Myasthenia Gravis by Down-Regulation of Th1 Differentiation and Up-Regulation of CTLA-4.** *J Immunol*, 66 (2001) 6893–6898.
97. BERRIH-AKNIN, S. and LE, R. - **Myasthenia gravis : A comprehensive review of immune dysregulation and etiological mechanisms.** *J. Autoimmun.*, 52 (2014) 90–100.
98. WINKLER, T. H. and WAISMAN, A. - **With a little help from my old T cell : Memory follicular T helper cells driving autoimmunity ?** *J Immunol*, 66 (2014) 2869–2871.
99. TEDDER, T. F. - **B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset.** *J Immunol*, 194 (2015) 1395–1401.
100. SUN F, LADHA SS, YANG L, - **Interleukin-10 producing-B cells and their association with responsiveness to rituximab in myasthenia gravis.** *Muscle Nerve*, 49 (2014) 487–494.

101. SCHNEIDER, B. P., MACKAY, F., STEINER, V., HOFMANN, K., BODMER, J., HOLLER, N., AMBROSE, C., LAWTON, P., BIXLER, S., ACHA-ORBEA, H., VALMORI, D., ROMERO, P., WERNER-FAVRE, C., ZUBLER, R. H., BROWNING, J. L. and TSCHOPP, J. - **BAFF, a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family, Stimulates B Cell Growth.** 189 (1999) 1747–1756.
102. RAGHEB, S. and LISAK, R. P. - **B-Cell-Activating Factor and Autoimmune Myasthenia Gravis.** *Autoimmune Dis*, 2011 (2011).
103. RAGHEB S, LISAK R, LEWIS R, VAN STAVERN G, GONZALES F, S. and K. - **A Potential Role for B-Cell Activating Factor in the Pathogenesis of Autoimmune Myasthenia Gravis.** *Arch. Neurol*, 65 (2008) 1358–1362.
104. KAO D, LUX A, SCHWAB I, N. F. - **Targeting B cells and autoantibodies in the therapy of autoimmune diseases.** *Semin Immunopathol*, 36 (2014) 289–299.
105. GOMEZ, A. M., VROLIX, K., MOLENAAR, P. C., ESCH, E. VAN DER, DUIMEL, H., VOLL, R. E., MANZ, R. A., DE, M. H. and LOSEN, M. - **Proteasome Inhibition with Bortezomib Depletes Plasma Cells and Autoantibodies in Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis.** 186 (2014) 2503–2513.
106. PINCETIC, A., BOURNAZOS, S., DILILLO, D. J., MAAMARY, J., WANG, T. T., DAHAN, R., FIEBIGER, B. and RAVETCH, J. V. - **Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity.** *Nat Immunol*, 15 (2014) 707–716.
107. KANEKO Y, NIMMERJAHN F, R. J. - **Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation.** 313 (2006) 670–673.
108. NAGELKERKE, S. Q. and KUIJPERS, T. W. - **Immunomodulation by IVIg and the role of Fc-gamma receptors : classic mechanisms of action after all ?** 5 (2015) 674.
109. HORTON, H. M., CHU, S. Y., ORTIZ, E. C., CEMERSKI, S., LEUNG, I. W. L., JACOB, N., ZALEVSKY, J., DESJARLAIS, J. R., STOHL, W., SZYMKOWSKI, D. E., HORTON, H. M., CHU, S. Y., ORTIZ, E. C., PONG, E., CEMERSKI, S., STOHL, W. and SZYMKOWSKI, D. E. - **Antibody-Mediated Coengagement of Fc  $\gamma$  RIIb and B Cell Receptor Complex Suppresses Humoral Immunity in Systemic Lupus Erythematosus.** 186 (2015) 4223–4233.

110. BAO, Y. and CAO, X. - **The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets : A comprehensive review.** J. Autoimmun., 55 (2014) 10–23.
111. BHATTACHARYA P, THIRUPATHI M, ELSHABRAWY HA, A. K. and KUMAR P, P. B. - **GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity.** Cytokine, (2015) doi:10.1016/j.cyto.2015.05.030.
112. THIRUPATHI, M., ROWIN, J., JIANG, Q. L., SHENG, J. R., PRABHAKAR, B. S. and MERIGGIOLI, M. N. - **Functional defect in regulatory T cells in myasthenia gravis.** 1274 (2012) 68–76.
113. ROWIN, J., THIRUPATHI, M., ARHEBAMEN, E., SHENG, J., PRABHAKAR, B. S. and MERIGGIOLI, M. N. - **Granulocyte macrophage colony-stimulation factor treatment of an patient in Myasthenic Crisis: effects on regulatory T cells.** 46 (2012) 449–453.
114. PAAS-ROZNER, M., DAYAN, M., PAAS, Y., CHANGEUX, J. P., WIRGUIN, I., SELA, M. and MOZES, E. - **Oral administration of a dual analog of two myasthenogenic T cell epitopes down-regulates experimental autoimmune myasthenia gravis in mice.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97 (2000) 2168–73.
115. SHI FD, BAI XF, XIAO BG, VAN DER MEIDE PH, L. H. - **Nasal administration of multiple antigens suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis , encephalomyelitis and neuritis.** 155 (1998) 1–12.
116. LUO, J. and LINDSTROM, J. - **Antigen-Specific Immunotherapeutic Vaccine for Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis.** J. Immunol., 193 (2014) 5044–5055.
117. PASSWEG, J. and TYNDALL, A. - **Autologous stem cell transplantation in autoimmune diseases.** 44 (2007) 278–285.