



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRAN

**COMPORTAMIENTO DE LINFOCITOS CD19 POSTERIOR A LA APLICACIÓN
DE DOSIS ÚNICA DE RITUXIMAB EN PACIENTES CON RECHAZO HUMORAL
Y SU ASOCIACIÓN CON DESENLACES CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA

DRA ITZEL ANAHI MARTINEZ JUÁREZ

PROFESOR TITULAR

DR JOSE RICARDO CORREA ROTTER

TUTORES

DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO

DRA. LLUVIA AURORA MARINO VAZQUEZ

Ciudad de México, julio 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme y darme la sabiduría necesaria para desempeñarme en todas las áreas de mi vida. Por darme padres que me han formado con valores humanos como el respeto, la humildad y el amor a mi prójimo que permite enriquecer mi pensamiento y brindar esperanza y fe a las personas que comparten mi camino.

A mis hermanos por brindarme aliento e incentivar me para seguir adelante sin importar que tan lejos quiera llegar.

A mis pacientes que me han brindado la oportunidad de aprender Medicina y que pese a la enfermedad que padezcan me dan su confianza y cariño.

A mis profesores que me dieron conocimientos científicos sólidos y lograron inculcar la pasión que emana perseverancia por buscar siempre el bienestar de los pacientes.

A mis compañeros médicos de los que siempre se aprende algo nuevo, con los que compartí gran parte de mi vida intentando que el equipo siempre saliera adelante.

A las personas que me apoyaron a mantener a los pacientes en las mejores condiciones y me regalaron una sonrisa en los pasillos de mi segunda casa, enfermeras, camilleros, técnicos, policías y personal de limpieza.

Gracias a todos los que han formado parte de este maravilloso camino.

COMPORTAMIENTO DE LINFOCITOS CD19 POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE DOSIS ÚNICA DE RITUXIMAB EN PACIENTES CON RECHAZO HUMORAL Y SU ASOCIACIÓN CON DESENLACES CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS



DR. RICARDO CORREA ROTTER
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

TUTORES DE TESIS



DR. LUIS EDUARDO MORALES BUENROSTRO
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DRA. LLUVIA AURORA MARINO VAZQUEZ
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA Y METABOLISMO MINERAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



DR SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES
DIRECTOR DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
"DR. SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

ÍNDICE:

RESUMEN.....	5
1.- MARCO TEÓRICO.....	7
2.- JUSTIFICACIÓN.....	21
3.- OBJETIVOS.....	22
4.- HIPÓTESIS.....	23
5.- PACIENTES Y MÉTODOS.....	24
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
7.- RESULTADOS	31
8.- DISCUSIÓN.....	46
9.- CONCLUSIONES.....	50
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

Introducción: Rituximab (RTX) es una opción terapéutica importante para el tratamiento del rechazo activo mediado por anticuerpos (RAMA). RTX puede mantener la depleción de linfocitos CD19+ (CD19) hasta por un año en receptores de trasplante renal (TR). Las dosis utilizadas hasta ahora son muy variables. El objetivo de este estudio es determinar la efectividad de la aplicación de una dosis única de 500 mg de RTX sobre la depleción de CD19, la duración del efecto a lo largo de un año y su impacto sobre diferentes desenlaces clínicos en receptores de TR con RAMA.

Métodos: Estudio de cohorte prospectiva. Se incluyeron 122 pacientes con TR y RAMA (Banff 2013), que recibieron una dosis única de 500mg de RTX como parte de su tratamiento entre 2012 y 2018 en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los linfocitos CD19 fueron medidos basalmente, a los 15, 30, 90, 180, 270 y 360 días después de la administración de RTX. Se determinó el porcentaje de pacientes que se encontraban depletados a lo largo de los 12 meses del seguimiento. Se utilizaron 3 definiciones de depleción de CD19 (<2, <5 y <10 células/ μ L) y se correlacionó con desenlaces clínicos e histológicos.

Resultados: La edad promedio fue de 35 años, el 56% fueron mujeres, 93% primer trasplante, 71% donantes vivos, 75% recibieron plasmaféresis e inmunoglobulina, 21% recibieron bortezomib. La mediana de seguimiento fue de 5.5 años. Una dosis única de 500 mg de RTX mantuvo la depleción de CD19 <10 células/ μ L en el 80% de los pacientes a un año de seguimiento. La depleción <10 células/ μ L a los 12 meses después de la aplicación de RTX se asoció con mejor

sobrevida del paciente y/o del injerto ($p=0.047$). La depleción de CD19 a un mes de seguimiento fue asociada con menor fibrosis intersticial y atrofia tubular (FIAT) $p=0.01$, en la biopsia de control y con menor proteinuria ($p=0.05$), en el último seguimiento del paciente.

Conclusión: Una dosis única de 500 mg de RTX mantiene la depleción de CD19 en el 80% de los pacientes con TR y RAMA a un año de su aplicación. Una depleción de CD19 <10 células/ μL al mes está asociada con mejoría en la proteinuria y FIAT en el seguimiento de los pacientes. Mantener ese grado de depleción a los 12 meses mejora la sobrevida del paciente y/o del injerto.

1. MARCO TEORICO

1.1 Introducción

El trasplante renal (TR) es tratamiento de elección para un elevado porcentaje de los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) en etapa avanzada y que requieren terapia de sustitución renal (TSR). Un TR exitoso se asocia a mejoría en la sobrevida, calidad de vida y sin lugar a dudas, importante disminución de los costos en salud en comparación con cualquier modalidad de diálisis(1). Se estima que la sobrevida del injerto renal al primer año del trasplante es mayor al 90%, y disminuye progresivamente. Esta reducción se debe en más del 60% de los casos a pérdida del injerto debido a rechazo humoral, es decir, un rechazo activo mediado por anticuerpos (RAMA)(2). Actualmente, un problema relevante en el tratamiento del RAMA es la falta de un tratamiento estándar y bien validado con estudios clínicos controlados o basados en evidencia científica. Por lo anterior, el mismo se basa en recomendaciones de expertos que sugieren utilizar la combinación de una o más medidas tendientes a evitar la producción y daño ocasionado por anticuerpos como el uso de plasmaféresis, inmunoglobulina IGIV, rituximab (RTX), bortezomib y eculizumab(3). La duración del efecto de la plasmaféresis e gamaglobulina endovenosa, es menor de 30 días, semejante al efecto del eculizumab. Hasta ahora, se desconoce la duración del efecto de bortezomib, mientras que el efecto más prolongado lo obtenemos con el uso de RTX. Sin embargo, a pesar de que la depleción de linfocitos B pudiera durar hasta 12 meses, sabemos que las diferencias étnicas influyen en la acción de múltiples

fármacos, por lo tanto, es necesario conocer la duración del efecto de una dosis única de 500 mg de RTX, en población mexicana y como impacta en el pronóstico del injerto.

1.2 Epidemiología de la enfermedad renal crónica y trasplante renal

La ERC, en todos sus estadios, se presenta con una prevalencia a nivel mundial de 10.4% para hombres y 11.8% para las mujeres. Es decir, casi 850 millones de personas en el mundo presentan algún grado de afección renal, de estos casos solo 5.3 y 10.5 millones de personas con ERC requieren diálisis o trasplante(4).

En México las tasas de incidencia y prevalencia de ERC son de las más altas en el mundo y se carece de acceso universal a TSR. Datos del “Institute for Health Metrics and Evaluation” de los Estados Unidos de América (IHME) indican que la diabetes mellitus y la hipertensión arterial son las principales causas de ERC en México, lo que lleva a un aumento significativo de las muertes asociadas a ERC en nuestro país(5). Datos publicados por el Instituto Nacional de Salud Pública de México mostraban al momento de dicha publicación una incidencia de pacientes con ERC en nuestro país de 377 casos por millón de habitantes (pmh) y una prevalencia de 1,142 casos pmh. De estos, más de 450 pacientes pmh se encontraban recibiendo alguna modalidad de TSR. Esto coloca a la ERC como la segunda y cuarta causa de años de vida sana perdidos para hombres y mujeres, respectivamente(6).

El TR es tratamiento de elección para un elevado porcentaje de pacientes con ERC en etapa avanzada y que requieren TSR. Las tasas de TR más elevadas corresponden a Croacia con 59 TR pmh, Países Bajos y Estados Unidos con 56 TR pmh cada uno, España con 54, Noruega con 53 y Escocia y Reino Unido con 51, respectivamente. En América Latina las tasas más elevadas son de Puerto Rico con alrededor de 50 pmh, Uruguay y Argentina con 32 y 31 TR pmh, respectivamente. La tasa de TR pmh en México para 2016 fue de 24.7(7).

En México, para 2017 se realizaron 3,156 TR (un aumento del 4% en relación al 2015), la mayoría de donante vivo (922 provinieron de donantes fallecidos). En el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) el programa de TR se inició formalmente en 1971, previamente se habían realizado dos trasplantes en 1967 y 1968. Desde entonces hasta marzo de 2017, se han realizado 1,357 TR en nuestra institución(8).

1.3 Rechazo activo mediado por anticuerpos

Se estima que la supervivencia del injerto renal al primer año del trasplante es mayor a 90%, y disminuye progresivamente. Las pérdidas de injerto se deben en más del 60% de los casos a daño agudo y crónico mediado por anticuerpos(2).

Desde que se establece un consenso y se definen los criterios diagnósticos y de clasificación de RAMA, sabemos que ésta forma de rechazo activo tiene una incidencia que va del 5 al 20% en pacientes no sensibilizados y del 40-60% en aquellos que se encuentran sensibilizados(2)(3). Además, el pronóstico de los

pacientes con RAMA es más sombrío comparado con el rechazo celular. Los episodios de RAMA son causados por la presencia de anticuerpos anti-HLA dirigido contra especificidades antigénicas del donante por lo que se les llama anticuerpos donante específico (ADES) y de aquellos pacientes que lo padecen, quienes muestran una disminución mayor al 50% de los ADES posterior al tratamiento, tendrán un mejor pronóstico(9).

Hasta la fecha no hay ningún tratamiento estándar para el RAMA, únicamente recomendaciones de expertos que sugieren agentes cuya acción sería la siguiente: 1) Eliminar la presencia de anticuerpos circulantes mediante plasmaféresis o inmunoadsorción. 2) Inactivar los anticuerpos remanentes con el uso de gamaglobulina endovenosa. 3) Evitar la diferenciación y maduración de células B mediante uso de RTX. 4) Tratar de eliminar las células plasmáticas con la aplicación de bortezomib. 5) Inhibición del complemento con el uso de eculizumab(3).

1.4 Rituximab

1.4.1 Aspectos biológicos del rituximab. Los anticuerpos monoclonales empezaron a ser una posibilidad terapéutica para el cáncer con el desarrollo de la tecnología de hibridoma por Kohler y Milstein in 1975(10). La Inmortalización de células derivadas de ratones inmunizados con selección subsecuente de clonas celulares para la producción de anticuerpos específicos fue la base de la fabricación de anticuerpos monoclonales(11).

El RTX es un anticuerpo monoclonal quimérico (30-35% murino, 65-70% humano), dirigido contra el marcador de superficie celular CD20, presente en los linfocitos B al igual que el marcador de superficie CD19. El peso molecular de RTX es de 145 a 540 Kd y está constituido por 1328 aminoácidos(12). Como es una Inmunoglobulina G de isotipo Ig G1, la vida media del RTX es de 3 semanas(13). Tiene un grupo de N glucosilación en el aminoácido Asparagina 297 de sus dos cadenas pesadas y está conformado por una región variable murina y una región constante humana lo que expresa su naturaleza quimérica. Fue aprobado en 1997 por la FDA para el tratamiento de leucemias (14, 15).

En la figura 1.1 se muestran los diferentes tipos de anticuerpos monoclonales nombrados de acuerdo a su porcentaje de origen murino y humano(10).

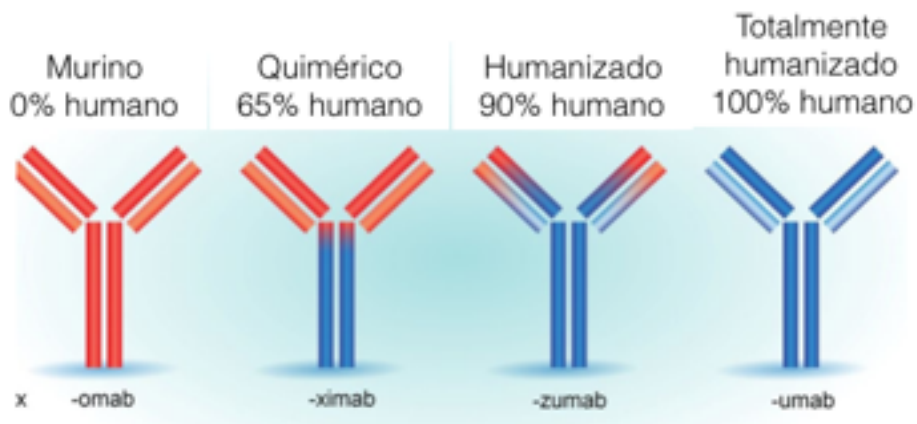


Figura 1.1 Tipos de anticuerpos monoclonales

1.4.2 Mecanismo de acción del rituximab.

El 90% de las células B expresan CD20 y CD19¹². Existen diferentes estirpes celulares de linfocitos B que se nombran de acuerdo a su maduración, las cuales

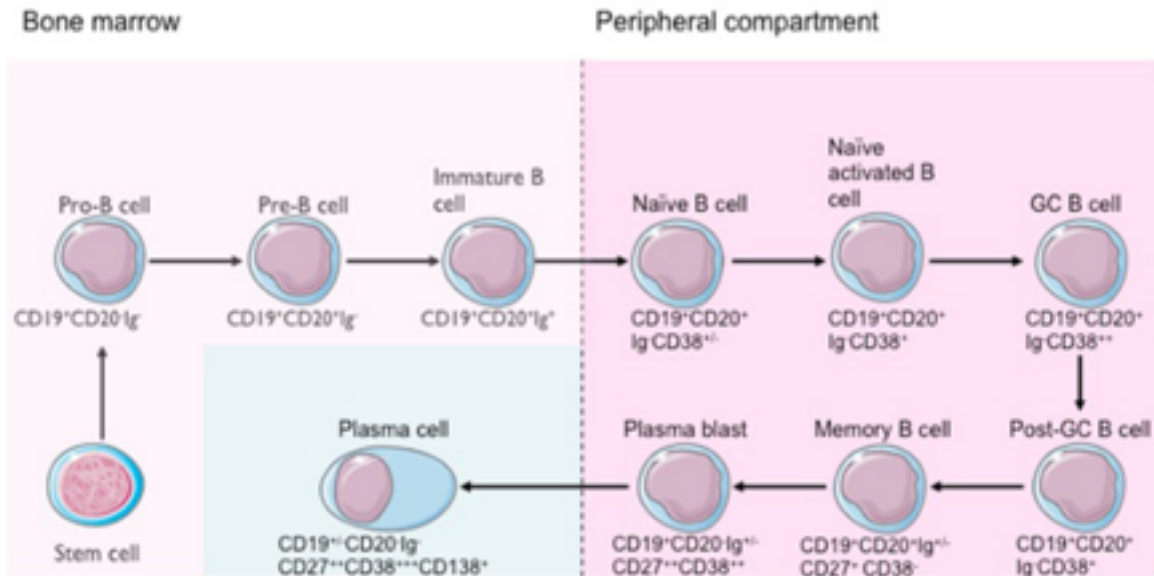


Figura 1.2: Estirpes celulares de Linfocitos B.

se muestran en la figura 1.2 (16). La expresión de CD20 inicia desde las células pre B y dura hasta la célula plasmática precursora, y se pierde en aquellas con larga vida(17).

El RTX se une a la porción de aminoácidos en el CD20: 170-173 y 182-185 recordando que la estructura molecular de CD20 consta de 297 aminoácidos siendo una proteína transmembrana(18).

Su mecanismo de acción es diverso e incluye la citotoxicidad para los linfocitos B mediada por anticuerpos, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) e inducción de apoptosis(19-23). Su acción en horas está determinado por la depleción por CDC y fagocitosis de células B por expresión de FC reconocido por monocitos (Figura 1.3)(13, 24).

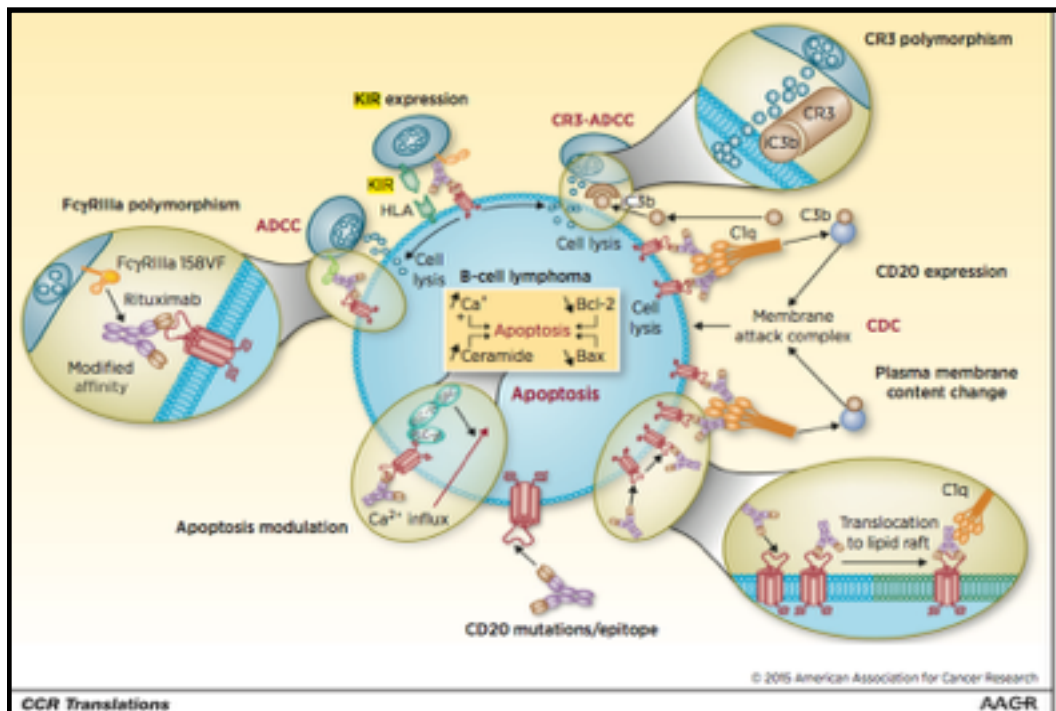


Figura 1.3: Mecanismos de acción de Rituximab.

Es difícil definir si el comportamiento del RTX en receptores de TR será igual al descrito en pacientes con enfermedades inmunológicas, ya que probablemente estos pacientes tengan mayor número de linfocitos B productores de autoanticuerpos y por lo tanto la dosis requerida para la saturación de receptores sea mayor a la habitual para un paciente sin enfermedad autoinmune. Un segundo punto es que el uso de inmunosupresores citotóxicos del paciente con TR podría disminuir de manera más efectiva el número de linfocitos CD19+ (CD19) y con esto requerir una menor dosis de RTX para lograr la depleción de esta población celular y con mayor tiempo de latencia hasta la repoblación, comparado con las enfermedades autoinmunes(25).

La duración de su actividad terapéutica es de 2-3 meses considerando una concentración de 25 mg/dl en suero como el blanco empírico; dosis requerida para la saturación de receptores. RTX persiste en la circulación de 3 a 6 meses(26-28). Sin embargo, en pacientes con lupus la farmacocinética del RTX es altamente variable y su vida media en pacientes con ERC puede ser de tan solo 12 días(29).

1.4.3 Uso clínico del rituximab. A pesar del sentido biológico del mecanismo de acción del RTX, los estudios clínicos han mostrado resultados contradictorios en el tratamiento de los eventos de RAMA y en su uso para desensibilización o como terapia de inducción, probablemente debido a la heterogeneidad de los pacientes incluidos, la falta de suficientes estudios prospectivos y controlados o por el hecho de que la información proviene fundamentalmente de estudios observacionales con un número pequeño de pacientes(30).

El estudio Ritux-ERAH un ensayo clínico, controlado, aleatorizado, doble ciego, realizado en 38 pacientes con seguimiento a un año demostró que no existió diferencia entre el uso de RTX 375mg/m² al día 1 y 15, aunado a la terapia estándar (5 sesiones de plasmaféresis + IGIV 100mg/Kg x 5) en valores de creatinina sérica, ni marcadores histológicos de daño renal o activación de complemento en RAMA(31).

Sin embargo, un estudio retrospectivo de Parajuli et al. demostró en una población de 78 pacientes, que el uso concomitante de RTX 375mg/m² con una terapia estándar de tratamiento, en este caso IgG IV 200mg/kg cada 2 semanas por 3 dosis, tuvo un impacto positivo en la sobrevida del injerto a un año de su administración(32).

Es muy importante entender el comportamiento y efecto clínico del RTX, ya que en países subdesarrollados el costo de RTX puede impedir que se utilice una dosis completa de 375mg/m² en una o mas ocasiones. A este respecto, existen varios estudios en pacientes trasplantados que muestren la duración de la depleción de CD19 durante el primer año de aplicación y que describiremos enseguida.

Un estudio sueco realizado en el 2006 en 49 pacientes que recibieron RTX como inducción o terapia contra RAMA demostró que la mediana de depleción de CD19 fue de 12 meses con una dosis única de RTX de 375mg/m². La figura 1.4 muestra el comportamiento de depleción de CD19 a lo largo del tiempo en dicho estudio(33).

Genberg et al.

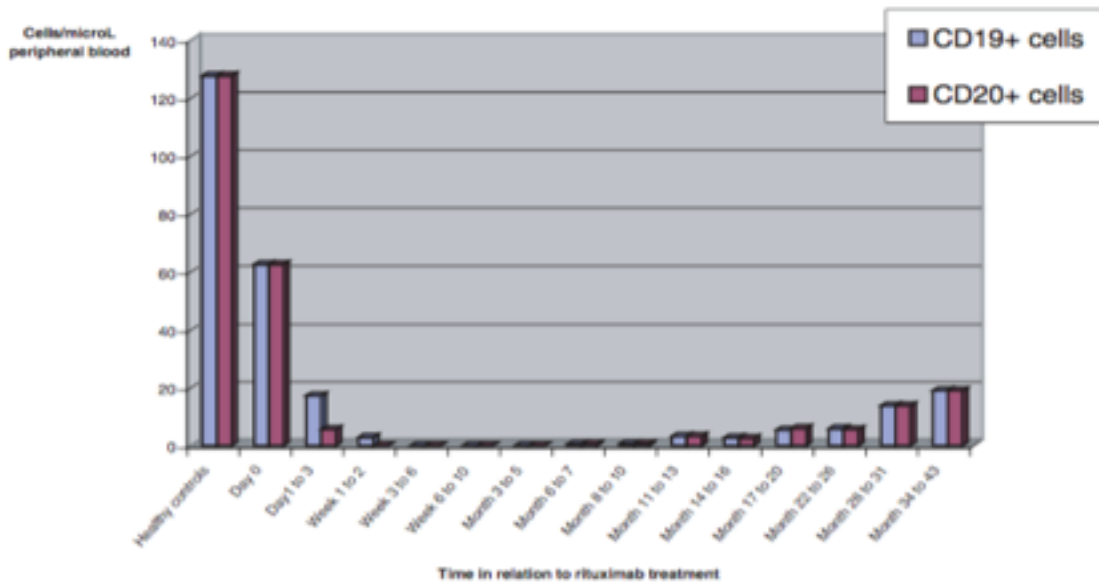


Figura 1.4: Comportamiento de depleción de CD19.

Otro estudio en Stanford, publicó la efectividad de agregar RTX 375mg/m² al tratamiento estándar de RAMA (bolos de metilprednisolona y timoglobulina) en 20

niños con RAMA, con una mediana de depleción de 12 meses, así como una creatinina sérica más baja y mejor puntuación histológica de RAMA(34).

Por último, el mismo grupo de Zarkhina publicó en 2011 el comportamiento de diferentes subpoblaciones de CD19 en 35 niños y adultos que recibieron terapia para RAMA con metilprednisolona como terapia estándar versus la adición de RTX 375mg/m²; encontrando que la mediana de depleción de CD19 fue de 12 meses para niños y 15 meses para adultos y que la reducción en la proporción de células Naïve y de memoria se presentaba con mayor frecuencia en pacientes con RAMA o infección activa comparada con población sin rechazo(35).

1.4.4 Dosis y administración de Rituximab

La presentación comercial del RTX es de 100mg en 10ml ó 500mg en 50ml, se debe de reconstituir con solución salina a 1mg/ml o 4mg/ml. Debe permanecer 24 horas a una temperatura.

Los esquemas varían desde una aplicación semanal con dosis total de 4 dosis de 375mg/m² versus 1 aplicación de 1g cada 15 días, 2 dosis ó incluso dosis única de 500mg de RTX, con seguimiento de niveles de depleción CD19(36-38).

Las mujeres alcanzan concentraciones más elevadas. El anticuerpo tiene un volumen de distribución pequeño y usa un modelo de 2 compartimentos. No es eliminado por hemodiálisis ni mediante diálisis peritoneal(39, 40). No debe de realizarse al paciente que recibe RTX una sesión de plasmaféresis en las 48 hrs posteriores a su administración, ya que puede barrer hasta 65% del mismo a nivel plasmático(41). No se sugiere ajuste de dosis, sin embargo, se ha observado que

su vida media puede disminuir hasta 10 veces más en pacientes con síndrome nefrótico debido a pérdidas por orina(42).

El RTX se ha indicado o prescrito hasta en 20% de las enfermedades nefrológicas de carácter inmunológico existentes(43, 44). Se le ha descrito también una función como un modulador de podocitos, similar a la ciclosporina, efecto adjudicado a la probable disminución de B7 por disminución de TH17 y por la estabilización de SMPDL3b(45, 46).

1.4.5 Eventos adversos asociados con el uso de rituximab. Durante la infusión, los pacientes ha presentado un riesgo elevado, de entre 25-60% de presentar efectos adversos. Entre mayor numero de células B, mayor riesgo de síndromes de liberación de citocinas(47, 48). La incidencia de efectos fatales es de 0.1%y se presenta principalmente en ancianos con comorbilidades cardíacas y pulmonares(26, 49). En los estudios GEMRITUX (GM) y LUNAR (LEG) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de efectos adversos (50, 51).

La trombocitopenia y la neutropenia de inicio tardío se presentan con más frecuencia después de la segunda aplicación (entre el día 30 y 180), son de los efectos adversos más frecuentes y parece ser un efecto mediado inmunológicamente que se relaciona con la repoblación de células B, tal vez con arresto en maduración mieloide(52-54).

Las infecciones más temidas son la reactivación del virus de hepatitis B y la reactivación del virus JC que puede ocasionar leucoencefalopatía multifocal progresiva(55), misma que se ha observado en pacientes con lupus eritematoso

generalizado, vasculitis y trasplante cardiaco, por lo que las precauciones se extienden hasta pacientes trasplantados renales. Se sugiere uso de profilaxis antiviral durante 7 días antes y 12 semanas posteriores a la dosis de RTX, con lo que se logra evitar reactivación hasta en el 25% de los casos(56, 57).

La incidencia de infección por pneumocystis jirovecci es menor al 0.1% y la presencia de vasculitis representa un factor de riesgo para su desarrollo(58). Respecto a la tuberculosis, RTX no incrementa el riesgo de su reactivación y no es necesario hacer tamizaje para búsqueda de tuberculosis latente(59, 60).

La hipogamaglobulinemia ha sido reportada en el 30—50% de los casos, con manifestaciones pulmonares en su gran mayoría (IgG <7g/l)(61, 62).

En cuanto a infecciones en general, en pacientes trasplantados la información es limitada y parece no existir diferencia en su incidencia, sin embargo, cuando ocurren pueden ser fatales en el grupo de RTX(63). Otros efectos adversos descritos son neumonía organizada (enfermedad intersticial pulmonar) que puede presentarse días a meses post infusión(64).

Para minimizar los riesgos durante la infusión, la duración de la primera administración se debe comenzar a 50 ml/hr y escalar para un total de 4-5 horas de infusión(65).

1.4.6 Mecanismos de resistencia al rituximab. Existen casos en los que el RTX no depleta de manera eficiente las células CD19 y esto puede deberse a lo siguiente:

- a) Anticuerpos humanos anti-quimera, que han sido relacionados con baja eficiencia del fármaco. La baja concentración del fármaco acompañada de la falta de depleción de CD19 es ocasionada por anticuerpos y el efecto se observa aproximadamente a los dos meses de iniciado el tratamiento(67).
- b) Polimorfismos de FcγRIIIa (receptor de la región constante de IgG en macrófagos y natural killer), que interfieren en la citotoxicidad mediada por anticuerpos contra linfocitos B. Sin embargo, su relevancia dependerá de la enfermedad que este siendo tratada(68). Por ejemplo, un cambio de fragmento G por C predice respuesta del linfoma al RTX(69).
- c) Si el complemento se encuentra reducido por consumo, el RTX no realizará su efecto citotóxico en linfocitos B. Algunos autores proponen la reposición con plasma fresco congelado(70).
- d) La gamaglobulina endovenosa es usualmente coadministrada con RTX para el tratamiento de RAMA. La gamaglobulina endovenosa incrementa el catabolismo de las Ig Gs (incluyendo RTX) y este efecto puede reducir la eficacia de la depleción de CD20(30).
- e) La internalización del antígeno de superficie CD20 reduce la eficacia del RTX y la resistencia se relaciona directamente con el grado de internalización(71).

1.4.7 La depleción de linfocitos B y eficacia clínica. La depleción de células B dura hasta 12 meses en células periféricas y se ha descrito hasta 30 meses después de una administración de RTX. La degradación de los anticuerpos ocurre

por una degradación inespecífica de las células de Kuppfer principalmente en el hígado(72-74).

La duración de su efecto clínico suele valorarse por la duración de la depleción de los linfocitos B (CD19+/CD20+), medida mediante cuantificación por citometría de flujo de la cantidad de CD19. La depleción celular se ha descrito como presente hasta por 6 a 9 meses en >80% de los pacientes con dosis única o hasta cuatro dosis semanales de RTX(75). La depleción de CD19 ha sido medida principalmente en estudios de artritis reumatoide sin observarse diferencia entre dosis alta y baja de RTX, definida la primera como 1 gr en la semana 1 y 3, siendo las dosis bajas cuando se utiliza 50% de la dosis(25).

La asociación entre depleción de CD19 y respuesta al tratamiento es difícil de demostrar principalmente es estudios de patologías autoinmunes como lo es lupus eritematoso, vasculitis y en otras como el trasplante renal. Estos modelos autoinmunes cuestionan la depleción de CD19 como un marcador pronóstico principalmente en inflamación activa. En trasplantes, se argumenta que la depleción periférica no refleja la concentración de linfocitos B en el injerto. Sin embargo, en pacientes con artritis reumatoide se ha demostrado que la depleción de linfocitos T con RTX muestra asociación en el grado de respuesta clínica(76).

2. JUSTIFICACIÓN

En trasplante renal, tanto de donador vivo como de donador fallecido, la principal causa de pérdida del injerto es el RAMA y el principal reto en la actualidad es poder evitarlo o en su caso, hacer un diagnóstico oportuno con tratamiento temprano, para prolongar la sobrevida del injerto.

De las estrategias de tratamiento para RAMA, la que tiene un efecto más prolongado es el uso de RTX; sin embargo, a pesar de que su acción depletores de linfocitos B pudiera durar hasta 12 meses, sabemos que las diferencias raciales y/o étnicas influyen en la acción de muchos fármacos, por lo que es necesario conocer la duración del efecto del RTX con dosis única de 500 mg en población mexicana. Adicionalmente, se evaluará el efecto de la depleción sobre diferentes desenlaces.

Por lo anterior, el conocer la efectividad de RTX para depletar los linfocitos B, así como la duración de la depleción postratamiento y su impacto sobre diferentes desenlaces, nos ayudará a identificar intervalos ideales de tratamiento que mantengan la depleción de células B y así evitar la formación de células plasmáticas y la síntesis de anticuerpos.

3. OBJETIVOS

Objetivo Primario:

- Determinar la efectividad de la aplicación de una dosis única de 500 mg de RTX sobre la depleción de CD19, la duración del efecto a lo largo de un año y su impacto sobre el desenlace compuesto de muerte del paciente y/o evolución funcional del injerto.

Secundarios:

- Determinar el corte de depleción de CD19 que predice con mayor sensibilidad y especificidad los desenlaces clínicos e histopatológicos.
- Describir la respuesta observada en marcadores bioquímicos como creatinina sérica y albúmina urinaria acordes a la depleción de CD19.
- Describir la respuesta observada en marcadores histopatológicos de respuesta como disminución del grado de glomerulitis, capilaritis peritubular o fibrosis intersticial y atrofia tubular (FIAT) respecto a la depleción de CD19.
- Describir la incidencia de infecciones y hospitalizaciones en el seguimiento de los pacientes sometidos a tratamiento con RTX acorde a la depleción de CD19.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1: Una dosis única de 500 mg de RTX es suficiente para causar depleción sostenida de CD19 a un año de seguimiento.

Hipótesis 2: Los pacientes con depleción sostenida tendrán mejor sobrevida del paciente e injerto.

Hipótesis 3: Los pacientes con depleción sostenida tendrán una frecuencia más elevada de infecciones y hospitalizaciones por infecciones.

5. PACIENTES Y METODOS

a) Diseño: Estudio de cohorte prospectivo, descriptivo y observacional.

b) Universo de estudio: Receptores de trasplante renal con diagnóstico de RAMA que recibieron tratamiento con RTX en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

c) Tamaño de la muestra: Se incluyeron todos los receptores de TR con diagnóstico de RAMA que recibieron RTX entre 2012 y 2018 y que cumplieron los criterios de inclusión.

Ante la falta de información al respecto, no se tienen datos para hacer un cálculo del tamaño de muestra en base a cifras concretas, por lo tanto, se considera una muestra no probabilística de pacientes consecutivos y se incluirán todos los pacientes que sean tratados hasta el cierre del reclutamiento.

De cualquier forma, se hizo un cálculo con fórmula de proporciones para un solo grupo (no hay contraste de hipótesis), para una población hipotética ($N=9999$) y esperando una efectiva depleción de CD19 (<10 células/ μL) en al menos 50% de los sujetos, con un poder del 80% y un nivel de confianza del 95%, lo que nos da una $n=26$ pacientes.

Para efectuar una correlación entre el tiempo que permanecen depletados los linfocitos B en meses y la respuesta al tratamiento (delta de creatinina sérica entre la medida postratamiento respecto a la basal antes del rechazo, para ver el daño que dejó el rechazo), tomando una correlación estimada en 0.3, nos da un tamaño de muestra de 67 sujetos tratados con RTX.

d) Lugar de realización: Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

e) Periodo de estudio: El reclutamiento de pacientes se realizó en el período comprendido del 1° de enero de 2012 al 31 de enero de 2018. La recolección de información relacionada con su seguimiento se completó hasta el 30 de junio de 2018.

f) Duración de la participación en el estudio: Todos los pacientes tuvieron seguimiento a un año con cuantificación de CD19 a partir de la aplicación de RTX. Los datos de función renal, pérdida del injerto y muerte del paciente se capturaron hasta la fecha de último seguimiento.

g) Criterios de selección de los pacientes:

I) Criterios de inclusión

- Pacientes de 18 a 60 años de edad.
- Ambos sexos
- Que aceptasen participar en el estudio y firmen el consentimiento informado aprobado por el comité institucional de investigación biomédica en humanos.
- Pacientes diagnosticados con rechazo mediado por anticuerpos y que recibieran tratamiento con 500 mg de RTX.

II) Criterios de exclusión

- Receptores de trasplante multiorgánico.

- Antecedente de trasplante de órgano extrarenal.

III) Criterios de eliminación

- Información incompleta en el expediente.
- Que el paciente no tuviera la medición basal y una más durante el seguimiento a un año.

h) Variables incluidas en el estudio:

Demográficas: Edad y género del donante y receptor.

Características basales y del trasplante: Causa de ERC, comorbilidades, tipo de trasplante, haplotipos compartidos con el donante, panel reactivo de anticuerpos en %, MFI (mean fluorescence intensity) preTR, terapia de inducción.

Tratamiento del RAMA: tipo de tratamiento, medicamentos adyuvantes.

Desenlaces primarios: Muerte del paciente, pérdida del injerto, hospitalizaciones postratamiento, infecciones postratamiento, duración de la depleción de CD19.

i) Definición operacional de variables:

RAMA.- se definirá según los criterios de BANFF del 2013.

Paciente tratado con RTX.- será todo paciente que reciba una dosis única de 500 mg de RTX. Se excluyeron los pacientes que recibieron otras dosis.

Creatinina sérica basal.- creatinina sérica que presentaba el paciente antes del rechazo (sin disfunción).

Delta de creatinina sérica postratamiento.- Será la diferencia entre la creatinina sérica postratamiento del rechazo y la que presentaba el paciente antes del rechazo (sin disfunción).

Delta de creatinina sérica a 1 año postratamiento.- Será la diferencia entre la creatinina sérica a 1 año postratamiento del rechazo y la que presentaba el paciente antes del rechazo (sin disfunción).

Depleción de Células B: En este estudio, utilizaremos 3 definiciones de depleción:

1) ≤ 10 células CD19+/ μl a las dos semanas de la aplicación de RTX. Un número ≥ 10 células CD19+/ μl se considerará como repoblación.

2) ≤ 5 células CD19+/ μl a las dos semanas de la aplicación de RTX. Un número ≥ 5 células CD19+/ μl se considerará como repoblación.

3) ≤ 2 células CD19+/ μl a las dos semanas de la aplicación de RTX. Un número ≥ 2 células CD19+/ μl se considerará como repoblación.

Pérdida del Injerto: Se definió como tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) $< 15\text{ml}/\text{min}$ (KDIGO G5).

j) Procedimientos: Se invitó a participar a todo paciente con RAMA que tuviera programada aplicación de RTX y se comprometiera a realizar por lo menos dos mediciones séricas de niveles de CD19, siendo la medición basal la primera de ellas. Se tomaría la siguiente muestra de acuerdo a sus citas programadas y posteriormente se recolectarían los datos hasta la fecha de último seguimiento.

Estudios de laboratorio iniciales. Se buscaba que todos los pacientes tuvieran BH, QS y niveles de CD19 antes de la aplicación de RTX

Medición de linfocitos CD19+ mediante citometría de flujo: Las células mononucleares (CMN) se aislaron a partir de sangre total anticoagulada con EDTA mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Las células mononucleares se obtuvieron de la interface, se lavaron con solución de fosfatos (PBS1x) y se midió viabilidad celular mediante azul tripán. La expresión de los marcadores celulares seleccionados para el análisis de células B se realizó mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. Alícuotas de 2×10^5 células se fijaron en p-formaldehído a 4% y se incubaron con buffer de permeabilización (BD Perm/Wash™; BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Las células fueron resuspendidas en solución de fosfatos con albúmina sérica bovina al 0.2% y 0.2% de azida de sodio. Se utilizó anticuerpos monoclonales PE-anti CD19 humano y PE/CY5-anti CD20 humano (BioLegend, San Diego, CA, USA) para marcaje, se incubaron a 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, posterior al lavado y a la resuspensión en buffer MACS, se realizó el análisis utilizando el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para el estudio de las células marcadas se analizaron 30,000 eventos, de acuerdo al tamaño y complejidad de las células considerando la fluorescencia emitida. Los valores obtenidos se muestran como gráficas bidimensionales de puntos, y analizados con BD FACStation software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

Análisis histopatológico de la biopsia renal percutánea. Los cilindros obtenidos del procedimiento de biopsia renal fueron fijados con formaldehído al 4% para el análisis de microscopía de luz. Se realizaron cortes secuenciales de 3-

µm para la tinción histológica con hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff, plata metenamina de Jones y tinción tricrómica de Masson. Para estudiar el depósito de complejos inmunes, se realizó inmunofluorescencia utilizando anticuerpos de conejo anti-humano IgG, IgM, IgA, C3c y C1q en tejido fijado en formalina de 4-µm de grosor. Además, se realizó inmunohistoquímica para C4d. Las lecturas de las biopsias fueron realizadas por la nefropatóloga de nuestra unidad hospitalaria. Todas las biopsias fueron clasificadas según Banff 2013.

k) Riesgos del estudio:

Biopsia renal percutánea. El estudio no influirá en la decisión ni programación de biopsia renal percutánea de ninguno de los pacientes. De acuerdo a estadísticas del INCMNSZ, el riesgo de complicaciones mayores (definidas como aquellas que requieren de intervención como transfusión, cateterismo, cirugía) en un procedimiento de biopsia renal percutánea en riñón nativo es menor al 2% en general, y menor del 1% en pacientes que no cuentan con factores de riesgo para el procedimiento.

Muestreo para estudios de laboratorio. Cada medición de CD19 requería un procedimiento de venopunción previo a la biopsia renal, obteniendo una muestra de 4cc de sangre por toma misma que se coloca en un tubo con EDTA. Los riesgos propios de este procedimiento son hematoma, sangrado, infección en sitio de punción, los cuales tienen una incidencia muy baja.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva según la distribución de las variables. Las variables categóricas se muestran como frecuencias y proporciones y las variables continuas con distribución normal se presentan como medias +/- DE y las de distribución anormal, con mediana e intervalo intercuartil. Para la comparación de las variables categóricas entre dos grupos, se utilizó Chi2 mientras que para variables continuas se utilizó T de Student o U de Mann-Whitney según aplicaba. Tratando de encontrar un punto de corte de CD19 que mejor predijera diferentes desenlaces se utilizó curvas ROC. Para el análisis de sobrevida del paciente se utilizó método de Kaplan-Meier y las curvas se compararon con Log-Rank. Se consideró como significativa una $p < 0.05$. El análisis se realizó con el programa estadísticos SPSS v21.

7. RESULTADOS

7.1 Características demográficas

Se incluyeron en el estudio 122 pacientes que cumplieron con todos los criterios de selección. La media de edad al momento del evento de rechazo fue de 35 ± 13 años, el 56.6% (69 casos) fueron mujeres. En 114 pacientes (93.4%) fue su primer trasplante, con 87 casos (71.3%) de donante vivo.

La etiología de ERC era en su mayor parte desconocida 64 casos (52.5%), seguida de lupus eritematoso en 12 (9.8%). Al ser pacientes jóvenes, 47 de ellos (38.5%) no tenían otra comorbilidad, únicamente fueron 3 los pacientes con ERC secundaria a diabetes.

La mediana de tiempo en años desde del trasplante al episodio de rechazo fue de 3.7 años, la indicación de biopsia renal percutánea (BRP) en 69 pacientes (56.6%) fue por elevación de creatinina sérica con una media de 1.7 ± 0.67 mg/dl, seguido de la aparición de ADES *de novo* en 27 casos (22.1%).

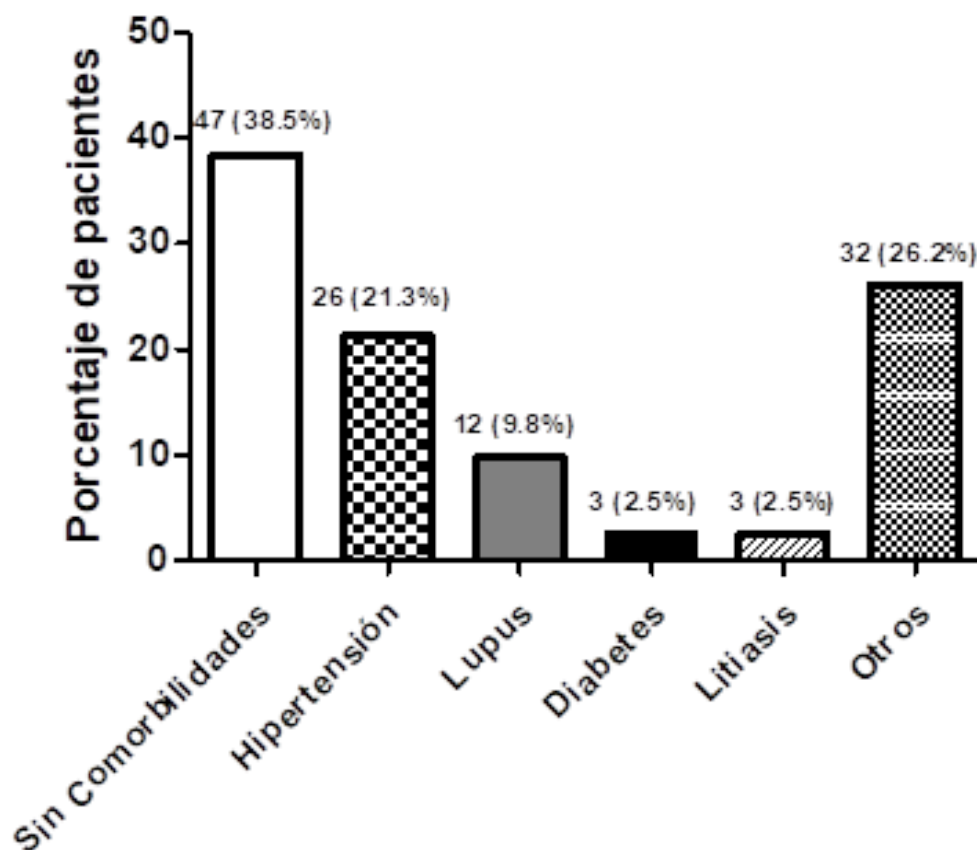
Tabla 7.1.- Características basales

Tabla 7.1.- Características basales		
CARACTERÍSTICA		n = 122 (100%)
Edad	Al momento del rechazo	35 ± 13 años
Género	Femenino	69 (56.6%)
Número de trasplante renal	Primer trasplante	114 (93.4%)
Causa de enfermedad renal	Desconocida	64 (52.5%)
	Lupus	12 (9.8%)
Comorbilidades	Sin comorbilidades	47 (38%)
	Diabetes Mellitus	3 (2.5%)
Tipo de Donante	Vivo	87 (71.3%)
Haplotipos	Cero	60 (49.2%)
	Uno	58 (47.5%)
	Dos	4 (3.3%)
Género del donante (n=93)	Masculino	51 (54.8%)
Panel reactivo de anticuerpos	<30%	44 (75%)
Terapia de Inducción (n=63)	Timoglobulina	29/63 (46.0%)
	Basiliximab	26/63 (41.3%),
	Sin inducción	8/63 (12.7%)
Indicación de Biopsia	Incremento de creatinina sérica	69 (56.6%)
	ADES <i>de novo</i>	27 (22.1%)
Antecedentes inmunológicos	Historia de rechazo previo	69 (56.6%)

En la tabla 7.1 se muestran las características basales de la población del estudio, es decir, al momento de la administración del RTX.

En la figura 7.1 se muestran las comorbilidades de los pacientes trasplantados con RAMA, siendo la hipertensión arterial la comorbilidad más frecuente en el 21% de los casos (n=26). Dentro de otras enfermedades relacionadas a ERC terminal en el TR se consideró: hiperuricemia, dislipidemia, obesidad, enfermedad renal poliquística.

Figura 7.1.- Enfermedades relacionadas a ERC terminal en eITR



7.2 Tratamiento y desenlaces principales

Todos los pacientes recibieron dosis única de 500mg de RTX y 3 bolos de metilprednisolona 12mg/kg. El 74.6% de los pacientes recibieron plasmaféresis y

gamaglobulina endovenosa, 21.3% de los pacientes recibieron Bortezomib. La mediana de días entre el diagnóstico de RAMA y la administración del RTX fue de 50 días. La tabla 7.2 muestra la terapéutica empleada y los desenlaces de los pacientes trasplantados.

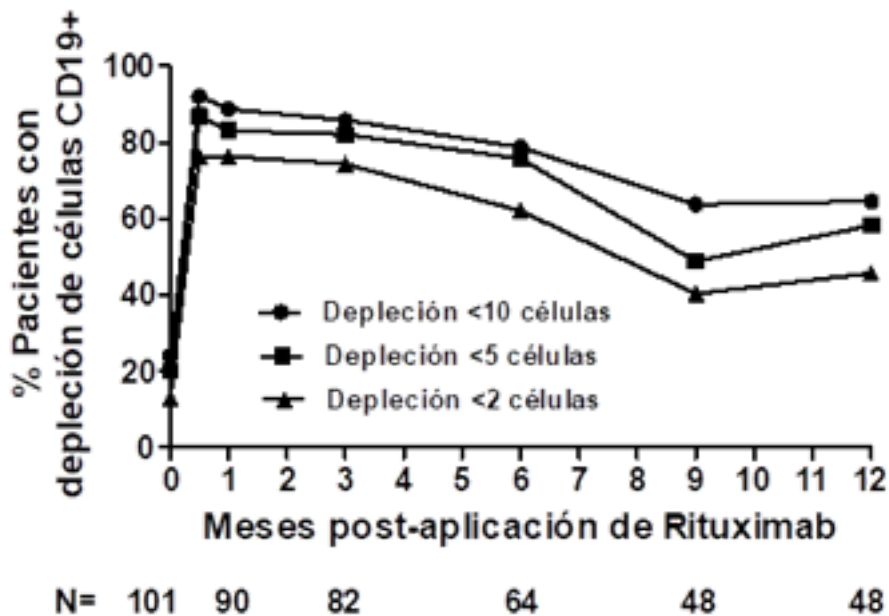
Los pacientes tuvieron una mediana de seguimiento de 21 meses. La sobrevida del injerto posterior a presentar el rechazo tuvo una mediana de 5.5 años.

Tabla 7.2.- Tratamiento y desenlaces principales		
Variable		n = 122 (100%)
Tratamiento	Plasmaféresis + gamaglobulina endovenosa+ Rituximab	91 (74.6%)
	Bortezomib	26 (21.3%)
Desenlaces Primarios	Pérdida del Injerto	17 (13.9%)
	Muerte del paciente	3 (2.5%)
Complicaciones post-Rituximab	Infección	52 (42.6%)
	Hospitalizaciones	22 (18.0%)

7.3 Depleción de CD19

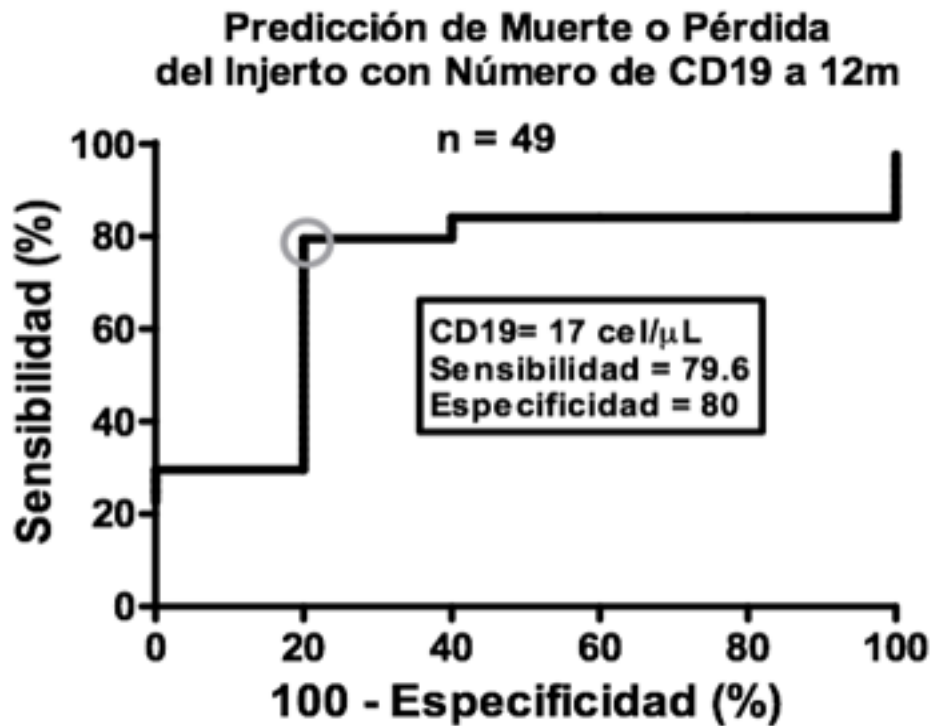
Para medir depleción de CD19 posterior a la aplicación de RTX, utilizamos 3 diferentes definiciones: <10, <5 y <2 células CD19+/ μ l. Como era esperado, hubo una pequeña variación en la proporción de pacientes que alcanzaron la depleción de CD19 acorde a la definición, como se muestra en la figura 7.2. Se observa que entre el 80 y 90% de los sujetos, dependiendo la definición, alcanzaron depleción desde los primeros 15 días posterior a la aplicación de RTX y esta proporción se mantiene depletada hasta los 6 meses, después de lo cual se reduce la proporción de sujetos con depleción de CD19. Se observa que más del 50% de los sujetos permanecen con depleción 12 meses después de la aplicación de RTX.

Figura 7.2 Pacientes con depleción de células CD19+ durante 12 meses acorde a las 3 definiciones de depleción.



Debido a esta variabilidad en la definición de depleción de CD19 posterior a la aplicación de RTX, realizamos una curva ROC para tratar de identificar un punto de corte en el número de CD19/ μ l que mejor predijera el desenlace compuesto de muerte del paciente y/o pérdida del injerto. Como se puede ver en la figura 7.3, encontramos que el mejor punto de corte es 17 CD19/ μ l, que alcanza una sensibilidad del 79.6% y especificidad del 80%.

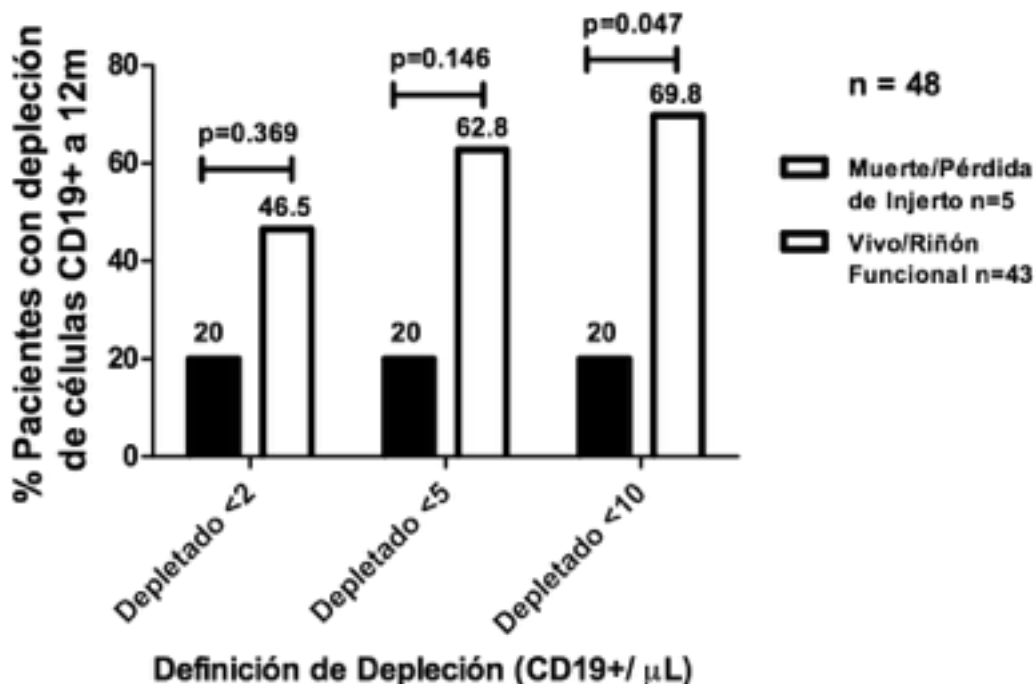
Figura 7.3 Curva ROC para identificar el punto de corte de depleción de células CD19+/ μ l que mejor predice el desenlace compuesto de muerte del paciente y/o pérdida del injerto.



7.4 Depleción de CD19 y sobrevida del injerto y del paciente

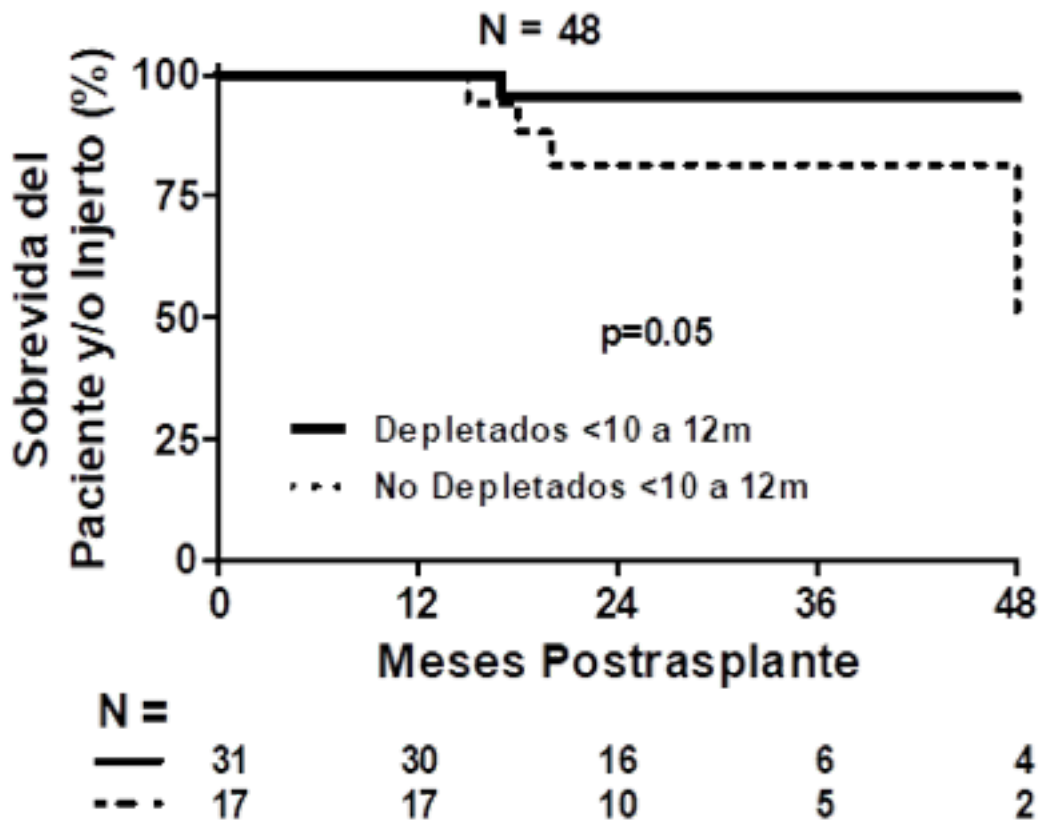
Se hizo un análisis de los 48 casos con medición de CD19 a los 12 meses de evolución post aplicación de RTX para ver si la depleción de células CD19 acorde a las 3 definiciones tenía asociación con el desenlace compuesto de muerte y/o pérdida del injerto. Como se puede ver en la figura 7.4, en el grupo de pacientes vivos y con injerto funcional había mayor proporción de pacientes depletados de CD19, aunque por el bajo número de desenlaces solo fue significativo con la definición de depleción <10 células CD19+/ μ l. $p=0.047$

Figura 7.4 Asociación de la depleción de CD19 (acorde a las 3 definiciones) y el desenlace compuesto de muerte del paciente y/o pérdida del injerto.



Este mismo desenlace compuesto lo analizamos por método de Kaplan-Meier para observar la velocidad de aparición del desenlace y encontramos mayor número de eventos en los no depletados. Se observa como se separan las curvas a los 12 meses post RTX mostrando una diferencia importante de los 24 a 48 meses de seguimiento (ver figura 7.5).

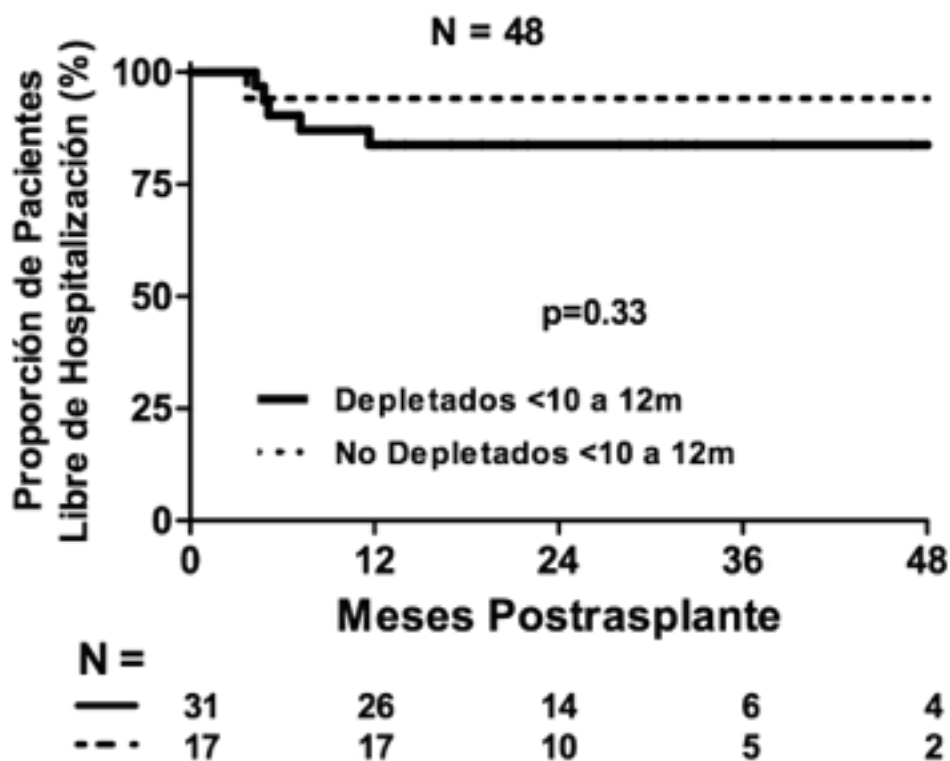
Figura 7.5 Sobrevida del paciente y sobrevida del injerto acorde a la presencia de depleción de CD19 a los 12 meses post aplicación de rituximab.



7.5 Hospitalizaciones

Se realizaron tablas de contingencia y curvas de sobrevivencia de Kaplan Meier para determinar la asociación de internamientos y depleción de CD19 donde observamos que todos los pacientes con depleción de CD19 en <17 células/ μ l, <10 células/ μ l, <5 células/ μ l, <2 células/ μ l tienen mayor número de internamientos. En la figura 7.6 se observa como se separan las curvas de los sujetos con sin depleción <10 células/ μ l después de los 12 meses de la aplicación del RTX, aunque no alcanza diferencia estadística.

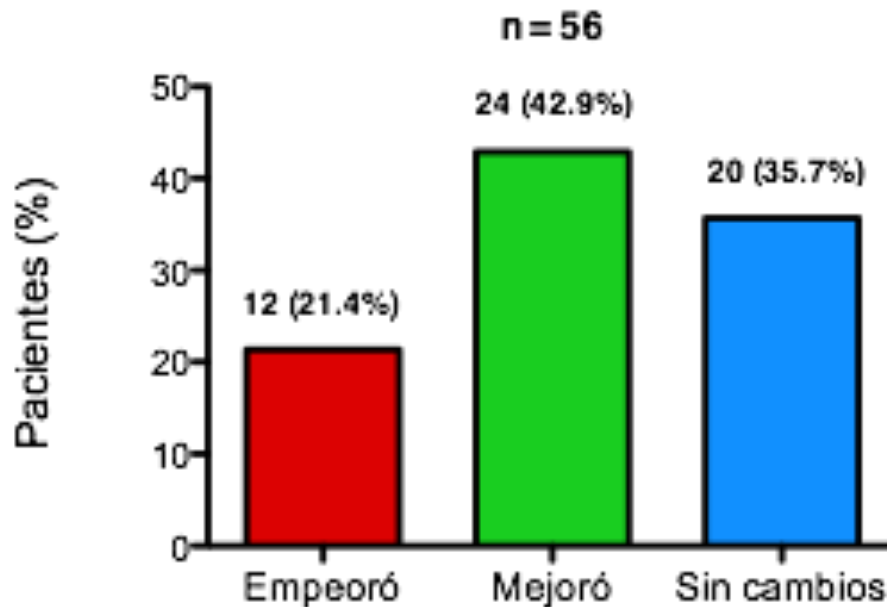
Figura 7.6 Hospitalizaciones acorde a la presencia de depleción de <10 células/ μ l a los 12 meses posterior a la aplicación del RTX.



7.6 Cambios histológicos en la biopsia de control postratamiento

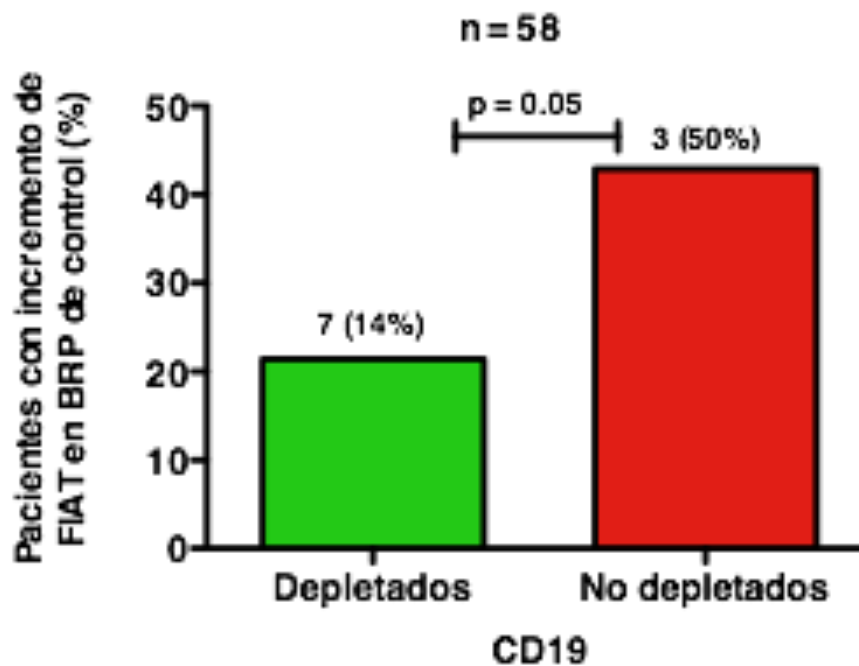
Respecto al cambio en el valor de glomerulitis más capilaritis peritubular, en 56 pacientes que tuvieron biopsia antes y después de la aplicación de RTX, se observó que el 21.4% (n=12) de los pacientes empeoraron su calificación, el 35.7% (n=20) no tuvo cambios y el 42.9% (n=24) mejoraron su puntaje (ver figura 7.7). No hubo asociación de este cambio en el daño endotelial con la depleción de CD19 en sus 3 definiciones.

Figura 7.7 Cambio en el valor de glomerulitis más capilaritis peritubular en la biopsia post-RTX comparada con la biopsia pre-RTX.



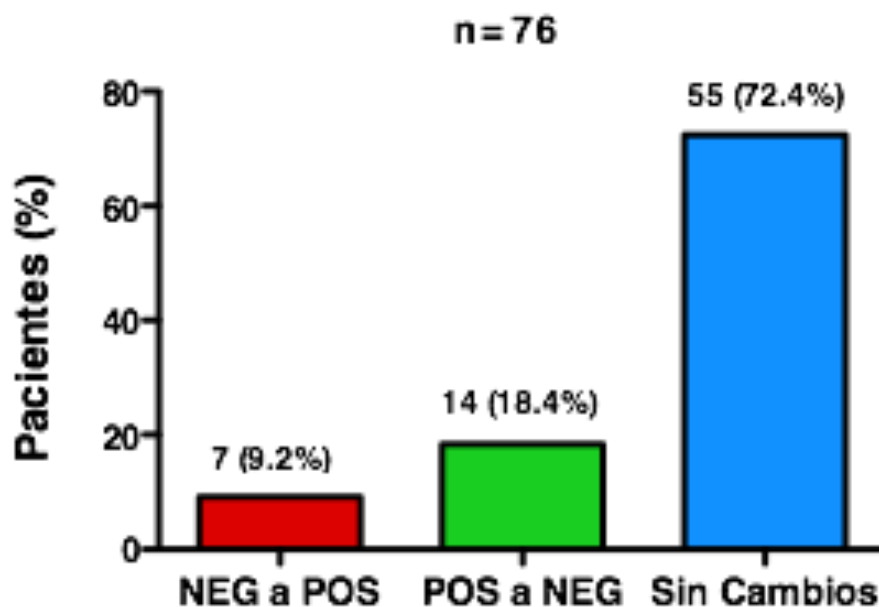
Respecto al impacto histológico determinado por cambios crónicos, el 17% de los pacientes presentaron incremento en el porcentaje de FIAT en la BRP de control post RTX. Se buscó la asociación entre el tiempo y el grado de depleción de CD19 con el porcentaje de FIAT en la biopsia de control, determinando que en la medición de CD19 del primer mes posterior a la aplicación de RTX, una mayor proporción de pacientes del grupo no depletado tenían incremento en porcentaje de FIAT de la BRP de control comparado con el grupo que estaba depletado, $p=0.05$ (ver figura 7.8).

Figura 7.8 Cambio en el porcentaje de FIAT según depleción <10 células CD19+/ μ l al mes post aplicación de RTX



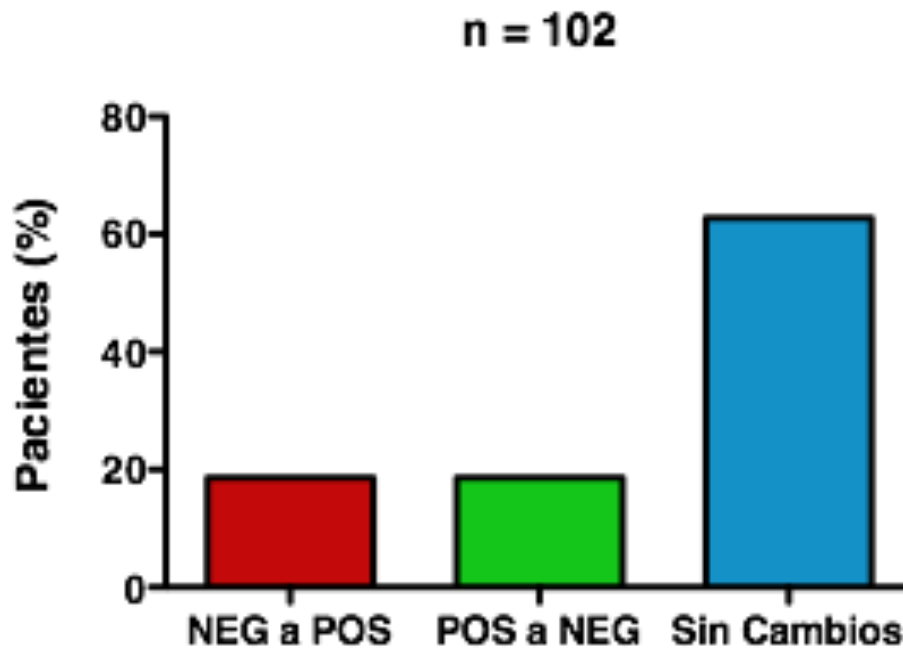
En 109 pacientes se reportó el resultado de C4d en la biopsia basal donde se realizó el diagnóstico de RAMA y de ellos, el 25% tuvo un reporte de C4d positivo. En 76 pacientes de estos 109, se les realizó una biopsia posterior al tratamiento con RTX y en 18.4% (n=14) el C4d pasó de positivo a ser negativo, mientras que en 9.2% (n=7) el C4d cambió de negativo a positivo, y el resto de los pacientes 72.4% (55) no tuvo cambio en el resultado de C4d por inmunohistoquímica (figura 7.9). No hubo asociación entre depleción de CD19 y estatus de C4d en la biopsia del diagnóstico de RAMA o el cambio de estatus del C4d en la biopsia de control.

Figura 7.9 Cambio en el estatus del C4d en la biopsia post-RTX comparada con la biopsia del diagnóstico de RAMA.



Respecto a la inflamación intersticial, no existió asociación con la depleción de CD19. Se observa que 19 pacientes (18.6%) cambiaron de no tener inflamación a tenerla (NEG a POS), el mismo número de pacientes pasó de ser positivos a ser negativos y 64 sujetos (62.8%) no tuvieron cambio respecto a la biopsia de control (Figura 7.10).

Figura 7.10 Cambio en inflamación intersticial en la biopsia post-RTX comparada con la biopsia del diagnóstico de RAMA.

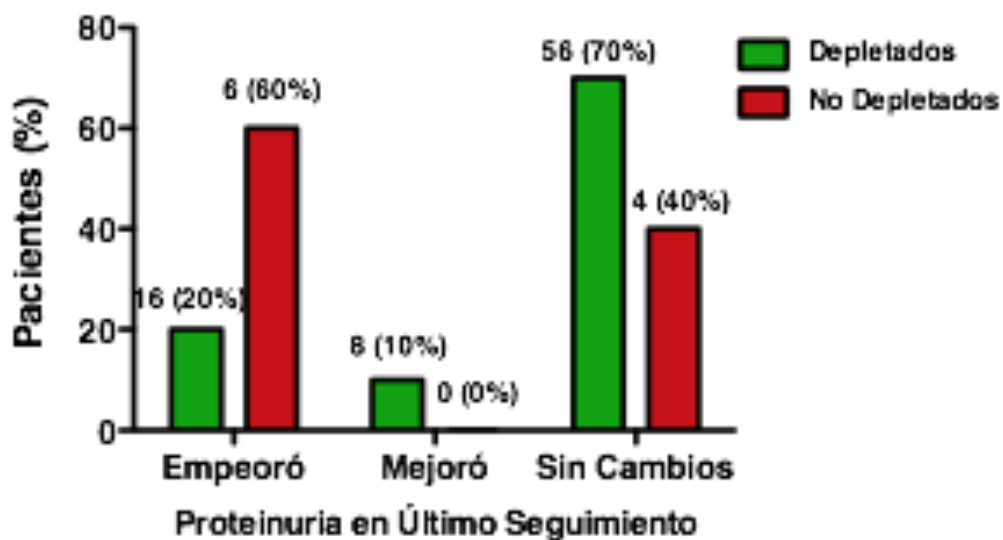


7.7 Comportamiento de la albuminuria y de la creatinina sérica

En la Figura 7.11 se muestra que los pacientes con depleción de CD19 al primer mes post-RTX tienen una menor proporción de pacientes con empeoramiento de la proteinuria al seguimiento comparado con aquellos no depletados en el primer

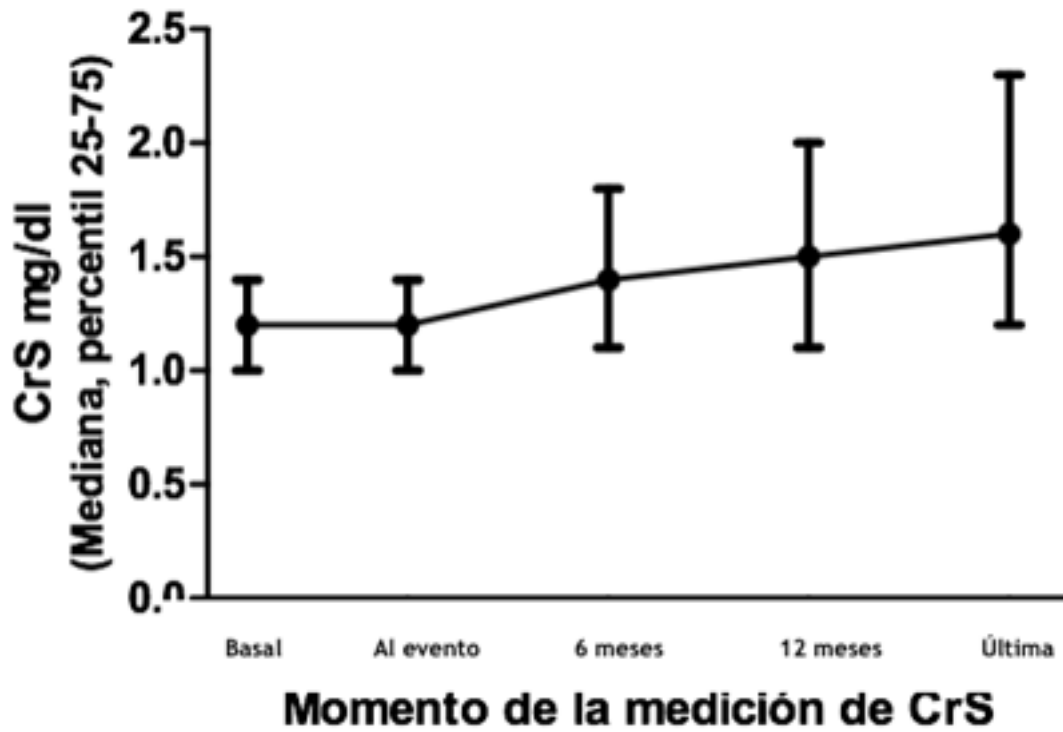
mes (20% vs 60%, $p=0.018$). Se realizó la comparación de niveles de depleción a lo largo de los 12 meses de seguimiento con las diferentes definiciones encontrando únicamente impacto en este grupo descrito.

Figura 7.11 Cambio en la proteinuria en el último seguimiento respecto del momento del diagnóstico de RAMA acorde a la depleción de CD19 al mes posterior a la aplicación de RTX.



Los pacientes fueron monitorizados con creatinina sérica mg/dl en diferentes momentos: basal, al evento de rechazo, a los 6 meses de RTX, a los 12 meses de RTX y en el último seguimiento al mes de junio 2018 o al haber perdido su injerto. Al analizarse la asociación entre depleción de CD19 y creatinina sérica en esta línea del tiempo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa $p=0.34$ (Figure 7.12).

Figura 7.12.- Evolución de la creatinina sérica desde la medición basal (previo al rechazo), al momento del diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos, a los 6, a los 12 meses postratamiento y al último seguimiento.



8. DISCUSIÓN

Uno de los problemas de adoptar el uso de un medicamento que nació con otros fines a otra patología diferente, es el establecer la dosis adecuada. En el caso de rituximab, la dosis originalmente descrita para enfermedades hematológicas es de 375 mg/m² SC en al menos 4 aplicaciones semanales.

La dosis de RTX y duración de depleción de CD19 en diferentes comorbilidades es distinta probablemente debido a que el número de linfocitos B y los anticuerpos que cubren el blanco farmacológico de RTX influyen en la dosis necesaria para la saturación de receptores CD20 y la duración de su efecto. También es importante considerar que el uso de otros inmunosupresores en el paciente trasplantado podría disminuir el número de CD19 y con esto requerir una menor dosis de RTX para la depleción de esta población celular, con una mayor temporalidad para la repoblación comparado con otras enfermedades inmunológicas y oncológicas. En un estudio retrospectivo de 120 pacientes se comparó la duración de depleción de CD19 con mismas dosis del anticuerpo monoclonal (2 gramos ó 4 de 375mg/m²) en diferentes enfermedades inmunológicas, encontrando en vasculitis una mediana de repoblación CD19 de 26 meses versus 9 meses para artritis reumatoide, lo cual nos habla de que incluso entre comorbilidades inmunológicas la farmacodinamia del fármaco es distinta.

Por tal motivo es primordial determinar la farmacodinamia de RTX en el TR. En nuestra cohorte, una dosis única de 500 mg de RTX logró la depleción de CD19 <10 células/ μ L hasta por 12 meses en el 65% de los pacientes, con lo cual

podemos sustentar su uso a esta dosis y que adicionalmente, lo hace más factible para el tipo de población de bajos recursos que atendemos.

Hay que considerar que en el contexto de trasplantes, el hecho de depletar células B y por ende reducir su diferenciación a células plasmáticas, lo hace muy prometedor para su uso en el tratamiento de RAMA así como en los esquemas de desensibilización, sin embargo, los resultados de los estudios en esta área son contradictorios y no se ha podido demostrar de manera contundente su utilidad por lo que no existe una esquema de dosificación recomendado en pacientes con TR(30).

En una búsqueda exhaustiva de estudios que muestren el grado y duración de depleción de CD19 durante el primer año de aplicación de RTX, encontramos un estudio sueco realizado en el 2006 con 49 pacientes con uso RTX como inducción o terapia contra RAMA que demostró que la mediana de depleción de CD19 fue de 12 meses con una dosis única de RTX de 375mg/m²(33). En nuestro estudio, se incluyeron 122 pacientes con RAMA y se demostró que el 65% de los pacientes continúan depletados al año de aplicación de RTX 500mg dosis única, sin embargo, es importante denotar que a 12 meses únicamente se obtuvieron niveles de CD19 en 45 pacientes.

Otro estudio en Stanford publicó la efectividad al agregar RTX 375mg/m² al tratamiento estándar de RAMA (bolos de metilprednisolona y timoglobulina) en 20 niños con una mediana de depleción de 12 meses, así como una creatinina sérica mas baja y mejor score histológico de RAMA(34).

En nuestro estudio todos fueron adultos con mediana de 35 años y se demostró un impacto en la sobrevida del injerto y sobrevida superior en aquellos pacientes que permanecieron depletados en <10 células/ μL con una mediana de seguimiento de 21 meses. Respecto a los desenlaces histológicos, llama la atención que ninguno modificó de manera significativa g glomerulonefritis y ptc pericapilaritis sin embargo solo 56 pacientes de los 122 contaban con una descripción precisa de estos rubros. Respecto al FIAT se observó que aquellos pacientes depletados desde el primer mes post RTX tenían menor progresión a la cronicidad e valores de albuminuria en su último seguimiento, cabe señalar que el promedio de diagnóstico de RAMA a la ministración de RTX fue de 50 días y la biopsia de seguimiento se realizó en promedio 3 meses después del diagnóstico de RAMA. La creatinina sérica no resultó un marcador estadísticamente significativo. En contraste con nuestros datos obtenidos encontramos similitud con un estudio retrospectivo de Parajuli et al. demostró en una población de 78 pacientes que el uso concomitante de RTX 375mg/m² con una terapia estándar (inmunoglobulina 200mg/kg cada 2 semanas, 3 dosis,) de tratamiento de RAMA, tuvo un impacto positivo en la sobrevida del injerto posterior al año de ser utilizado(32).

Sin embargo el estudio Ritux ERAH un ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego realizado en 38 pacientes con seguimiento a un año demostró que a un año no existió diferencia entre el uso de RTX 375mg/m² al día 1 y 15, aunado a la terapia estándar (5 sesiones de plasmaféresis + gamaglobulina endovenosa

100mg/Kg x 5) en valores de creatinina sérica ni marcadores histológicos de daño renal o activación de complemento en RAMA(31).

Estos resultados demuestran la importancia de reportar desenlaces mayores a un año de seguimiento ya que como puede observarse en nuestra gráfica de sobrevida y pérdida del injerto, los eventos se presentan principalmente posterior a los 12 meses con desenlaces significativos. En nuestro estudio únicamente el 70% de los pacientes recibieron el tratamiento completo de plasmaféresis + gamaglobulina endovenosa y sólo el 21% bortezomib. En un subanálisis de la población que recibió este último inhibidor de proteosoma, no mostró diferencia estadísticamente significativa en desenlaces clínicos o histológicos.

Respecto a las hospitalizaciones por infecciones, es claro que existe un mayor riesgo en aquellos que depletaron con cualquier definición de RTX, por lo que será importante implantar seguimientos mas estrechos para captar de manera temprana infecciones que puedan tratarse ambulatoriamente.

Si bien nuestro estudio no es un ensayo clínico, es una cohorte prospectiva y arroja resultados muy importantes en la practica clínica respecto al tratamiento de RAMA con RTX, sugiriendo implementar la dosis de 500mg de RTX con medición de CD19 al mes y posteriormente a los 9 y 12 meses, para identificar pacientes con repoblación temprana utilizando como corte 10-17 células/ μ L. Aunado a esta conducta el seguimiento estrecho del paciente será primordial para lograr un impacto en el numero de hospitalizaciones secundarias a infecciones.

9. CONCLUSIONES

Una dosis única de 500 mg de RTX logró la depleción de CD19 <10 células/ μ L por hasta 12 meses en el 80% de los pacientes. El punto de corte que ofrece la mayor sensibilidad y especificidad para predecir el desenlace compuesto de muerte del paciente y/o pérdida del injerto es <17 células/ μ L.

La repoblación temprana de CD19 se asoció a mayor pérdida del injerto y muerte. La depleción persistente de CD19 <10 células/ μ L a los 12 meses se asoció a mejor supervivencia del injerto y/o del paciente.

La depleción de CD19 en cualquiera de sus definiciones <2 , <5 , <10 y <17 células/ μ L se asoció con mayor número de internamientos asociados a infección.

La depleción de CD19 a los 30 días se asocia mejoría de proteinuria y menos FIAT.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999;341(23):1725-30.
2. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *American journal of transplantation*. 2012;12(2):388-99.
3. Sadaka B, Alloway RR, Woodle ES. Management of antibody-mediated rejection in transplantation. *The Surgical clinics of North America*. 2013;93(6):1451-66.
4. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117-71.
5. Alegre-Diaz J, Herrington W, Lopez-Cervantes M, Gnatiuc L, Ramirez R, Hill M, et al. Diabetes and Cause-Specific Mortality in Mexico City. *N Engl J Med*. 2016;375(20):1961-71.
6. Correa-Rotter R. Renal replacement therapy in the developing world: are we on the right track, or should there be a new paradigm? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(6):1635-6.
7. Morales-Buenrostro LE. Advances and challenges in renal transplantation in Latin America. *Clinical nephrology*. 2016;86 (2016)(13): 96-100.
8. Marino-Vazquez LA, Sanchez-Ugarte R, Morales-Buenrostro LE. [Kidney transplantation: consecutive one thousand transplants at National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubiran in Mexico City]. *Revista de investigacion clinica*. 2011;63 Suppl 1:6-13.
9. Everly MJ, Everly JJ, Arend LJ, Brailey P, Susskind B, Govil A, et al. Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *American journal of transplantation*. 2009;9(5):1063-71.
10. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
11. Clynes R. Antitumor antibodies in the treatment of cancer: Fc receptors link opsonic antibody with cellular immunity. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2006;20(3):585-612.
12. Miranda-Hernandez MP, Lopez-Morales CA, Ramirez-Ibanez ND, Pina-Lara N, Perez NO, Molina-Perez A, et al. Assessment of physicochemical properties of rituximab related to its immunomodulatory activity. *Journal of immunology research*. 2015;2015:910763.
13. Maloney DG. Preclinical and phase I and II trials of rituximab. *Seminars in oncology*. 1999;26(5 Suppl 14):74-8.

14. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*. 1984;63(6):1424-33.
15. Grillo-Lopez AJ, White CA, Varns C, Shen D, Wei A, McClure A, et al. Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Seminars in oncology*. 1999;26(5 Suppl 14):66-73.
16. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015;42(4):607-12.
17. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Current directions in autoimmunity*. 2005;8:140-74.
18. Storz U. Rituximab: how approval history is reflected by a corresponding patent filing strategy. *mAbs*. 2014;6(4):820-37.
19. Gopal AK, Press OW. Clinical applications of anti-CD20 antibodies. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1999;134(5):445-50.
20. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 2002;99(3):1038-43.
21. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology*. 2002;107(2):176-82.
22. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435-45.
23. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, et al. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *Journal of immunology*. 2003;171(3):1581-7.
24. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(8):2825-33.
25. Bredemeier M, de Oliveira FK, Rocha CM. Low- versus high-dose rituximab for rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis care & research*. 2014;66(2):228-35.
26. Kimby E. Tolerability and safety of rituximab (MabThera). *Cancer treatment reviews*. 2005;31(6):456-73.
27. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunology today*. 1994;15(9):450-4.
28. Smith KG, Jones RB, Burns SM, Jayne DR. Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: Remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(9):2970-82.

29. Mok CC. Current role of rituximab in systemic lupus erythematosus. *International journal of rheumatic diseases*. 2015;18(2):154-63.
30. Laws LH, Parker CE, Cherala G, Koguchi Y, Waisman A, Slifka MK, et al. Inflammation Causes Resistance to Anti-CD20-Mediated B Cell Depletion. *American journal of transplantation*. 2016;16(11):3139-49.
31. Sautenet B, Blancho G, Buchler M, Morelon E, Toupance O, Barrou B, et al. One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial. *Transplantation*. 2016;100(2):391-9.
32. Parajuli S, Mandelbrot DA, Muth B, Mohamed M, Garg N, Aziz F, et al. Rituximab and Monitoring Strategies for Late Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation direct*. 2017;3(12):e227.
33. Genberg H, Hansson A, Wernerson A, Wennberg L, Tyden G. Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation. *American journal of transplantation*. 2006;6(10):2418-28.
34. Zarkhin V, Li L, Kambham N, Sigdel T, Salvatierra O, Sarwal MM. A randomized, prospective trial of rituximab for acute rejection in pediatric renal transplantation. *American journal of transplantation*. 2008;8(12):2607-17.
35. Zarkhin V, Lovelace PA, Li L, Hsieh SC, Sarwal MM. Phenotypic evaluation of B-cell subsets after rituximab for treatment of acute renal allograft rejection in pediatric recipients. *Transplantation*. 2011;91(9):1010-8.
36. Vital EM, Rawstron AC, Dass S, Henshaw K, Madden J, Emery P, et al. Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(3):603-8.
37. Ahuja A, Shupe J, Dunn R, Kashgarian M, Kehry MR, Shlomchik MJ. Depletion of B cells in murine lupus: efficacy and resistance. *Journal of immunology*. 2007;179(5):3351-61.
38. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):2993-9.
39. Jillella AP, Dainer PM, Kallab AM, Ustun C. Treatment of a patient with end-stage renal disease with Rituximab: pharmacokinetic evaluation suggests Rituximab is not eliminated by hemodialysis. *American journal of hematology*. 2002;71(3):219-22.
40. Vieira CA, Agarwal A, Book BK, Sidner RA, Bearden CM, Gebel HM, et al. Rituximab for reduction of anti-HLA antibodies in patients awaiting renal transplantation: 1. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *Transplantation*. 2004;77(4):542-8.
41. McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA. Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 2010;8(6):1201-8.
42. Counsilman CE, Jol-van der Zijde CM, Stevens J, Cransberg K, Bredius RG, Sukhai RN. Pharmacokinetics of rituximab in a pediatric patient with

- therapy-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric nephrology*. 2015;30(8):1367-70.
43. Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, Brusegan V, Bontempelli M, Ruggenti P. Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet*. 2002;360(9337):923-4.
 44. Kronbichler A, Windpessl M, Pieringer H, Jayne DRW. Rituximab for immunologic renal disease: What the nephrologist needs to know. *Autoimmunity reviews*. 2017;16(6):633-43.
 45. Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguilon-Prada R, Jauregui AN, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Science translational medicine*. 2011;3(85):85ra46.
 46. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature medicine*. 2008;14(9):931-8.
 47. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO, 3rd, Keystone EC, Fleischmann R, Furst DE, et al. Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *The Journal of rheumatology*. 2010;37(3):558-67.
 48. Ruggenti P, Cravedi P, Chianca A, Perna A, Ruggiero B, Gaspari F, et al. Rituximab in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2012;23(8):1416-25.
 49. Chung CH. Managing premedications and the risk for reactions to infusional monoclonal antibody therapy. *Oncologist*. 2008;13(6):725-32.
 50. Rovin BH, Furie R, Latinis K, Looney RJ, Fervenza FC, Sanchez-Guerrero J, et al. Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(4):1215-26.
 51. Walsh M, Merkel PA, Peh CA, Szpirt W, Guillevin L, Pusey CD, et al. Plasma exchange and glucocorticoid dosing in the treatment of anti-neutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis (PEXIVAS): protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2013;14:73.
 52. Aguiar R, Araujo C, Martins-Coelho G, Isenberg D. Use of Rituximab in Systemic Lupus Erythematosus: A Single Center Experience Over 14 Years. *Arthritis care & research*. 2017;69(2):257-62.
 53. Knight A, Sundstrom Y, Borjesson O, Bruchfeld A, Malmstrom V, Gunnarsson I. Late-onset neutropenia after rituximab in ANCA-associated vasculitis. *Scand J Rheumatol*. 2016;45(5):404-7.
 54. Giezen TJ, Mantel-Teeuwisse AK, ten Berg MJ, Straus SM, Leufkens HG, van Solinge WW, et al. Rituximab-induced thrombocytopenia: a cohort study. *Eur J Haematol*. 2012;89(3):256-66.
 55. Gea-Banacloche JC. Rituximab-associated infections. *Semin Hematol*. 2010;47(2):187-98.
 56. Huang YH, Hsiao LT, Hong YC, Chiou TJ, Yu YB, Gau JP, et al. Randomized controlled trial of entecavir prophylaxis for rituximab-associated hepatitis B virus reactivation in patients with lymphoma and resolved hepatitis B. *Journal of clinical oncology*. 2013;31(22):2765-72.

57. Jones RB. Rituximab in the treatment of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Nephron Clin Pract.* 2014;128(3-4):243-9.
58. Loyaga-Rendon RY, Taylor DO, Koval CE. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a heart transplant recipient following rituximab therapy for antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation.* 2013;13(4):1075-9.
59. Liao TL, Lin CH, Chen YM, Chang CL, Chen HH, Chen DY. Different Risk of Tuberculosis and Efficacy of Isoniazid Prophylaxis in Rheumatoid Arthritis Patients with Biologic Therapy: A Nationwide Retrospective Cohort Study in Taiwan. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153217.
60. Buch MH, Smolen JS, Betteridge N, Breedveld FC, Burmester G, Dorner T, et al. Updated consensus statement on the use of rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases.* 2011;70(6):909-20.
61. Roberts DM, Jones RB, Smith RM, Alberici F, Kumaratne DS, Burns S, et al. Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *J Autoimmun.* 2015;57:60-5.
62. Marco H, Smith RM, Jones RB, Guerry MJ, Catapano F, Burns S, et al. The effect of rituximab therapy on immunoglobulin levels in patients with multisystem autoimmune disease. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:178.
63. Kamar N, Milioto O, Puissant-Lubrano B, Esposito L, Pierre MC, Mohamed AO, et al. Incidence and predictive factors for infectious disease after rituximab therapy in kidney-transplant patients. *American journal of transplantation.* 2010;10(1):89-98.
64. Daoussis D, Melissaropoulos K, Sakellaropoulos G, Antonopoulos I, Markatseli TE, Simopoulou T, et al. A multicenter, open-label, comparative study of B-cell depletion therapy with Rituximab for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2017;46(5):625-31.
65. Larsen JL, Jacobsen S. Rapid infusion with rituximab: short term safety in systemic autoimmune diseases. *Rheumatol Int.* 2013;33(2):529-33.
66. Salar A, Avivi I, Bittner B, Bouabdallah R, Brewster M, Catalani O, et al. Comparison of subcutaneous versus intravenous administration of rituximab as maintenance treatment for follicular lymphoma: results from a two-stage, phase IB study. *Journal of clinical oncology.* 2014;32(17):1782-91.
67. Albert D, Dunham J, Khan S, Stansberry J, Kolasinski S, Tsai D, et al. Variability in the biological response to anti-CD20 B cell depletion in systemic lupus erythaematosus. *Annals of the rheumatic diseases.* 2008;67(12):1724-31.
68. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Journal of clinical oncology.* 2005;23(3):474-81.

69. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *Journal of clinical oncology*. 2003;21(21):3940-7.
70. Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, DiLillo DJ, Lindorfer MA, Hess CE, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of immunology*. 2004;172(5):3280-8.
71. Beers SA, French RR, Chan HT, Lim SH, Jarrett TC, Vidal RM, et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood*. 2010;115(25):5191-201.
72. Golay J, Semenzato G, Rambaldi A, Foa R, Gaidano G, Gamba E, et al. Lessons for the clinic from rituximab pharmacokinetics and pharmacodynamics. *mAbs*. 2013;5(6):826-37.
73. Cartron G, Blasco H, Painteaud G, Watier H, Le Guellec C. Pharmacokinetics of rituximab and its clinical use: thought for the best use? *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007;62(1):43-52.
74. Puisset F, White-Koning M, Kamar N, Huart A, Haberer F, Blasco H, et al. Population pharmacokinetics of rituximab with or without plasmapheresis in kidney patients with antibody-mediated disease. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;76(5):734-40.
75. Cravedi P, Ruggenti P, Sghirlanzoni MC, Remuzzi G. Titrating rituximab to circulating B cells to optimize lymphocytolytic therapy in idiopathic membranous nephropathy. *CJASN*. 2007;2(5):932-7.
76. Melet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(11):2783-90.