

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DE PUEBLA

DIRECCIÓN DE POSGRADOS

**Alotrasplante de células madre con acondicionamiento de
intensidad reducida para los pacientes con HPN en la era del
eculizumab: La experiencia mexicana**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Especialidad en Ciencias de Laboratorio Clínico

PRESENTA

Q.C. Araceli CARBALLO MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Guillermo José RUIZ DELGADO

Especialidad en Medicina Interna

Subespecialidad en Hematología



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

A

AGRADECIMIENTOS2

D

DISCUSIÓN12

G

GRÁFICAS14

I

INTRODUCCIÓN3

M

MATERIAL Y MÉTODOS7

R

REFERENCIAS15

RESULTADOS10

AGRADECIMIENTOS

**A los *Doctores Ruiz* por
brindarme la oportunidad
de aprender de ellos...**

**Al *personal de Laboratorios Ruiz*
por ser mis mejores maestros...**

**A mi *familia* por apoyarme y estar
siempre cerca de mí...**

**Al amor de mi vida
Daniel por el inicio de un
camino juntos...**

**A mi gran amiga *Angie*,
juntas lo logramos...**

INTRODUCCIÓN

La hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) se reconoce como una enfermedad progresiva de las células madre hematopoyéticas con mutaciones somáticas adquiridas en el gen PIG-A (fosfatidil-inositol-glucano-A) situados en locus Xp22.1 ⁽¹⁻⁶⁾, que puede ser una expansión clonal no maligna ⁽¹⁾ y en algunos casos son del tipo oligoclonal en lugar de monoclonal⁽⁷⁾. La progenie tiene una capacidad insuficiente en la transferencia de N-acetil glucosamina a fosfatidil inositol, un componente vital de glicosilfosfatidilinositol (GPI) una proteína de anclaje (GPI-AP) ^(1-2, 5, 7-8).

Este es un glicolípido que ancla muchas proteínas a la superficie de la membrana celular. La mutación ocurre en la célula precursora hematopoyética dando lugar a la deficiencia parcial o total de la proteína PIG-A con la consecuente alteración en la síntesis del GPI de anclaje.

En la HPN los eritrocitos son deficientes en el factor acelerador de la degradación de las convertasas del C' (DAF, CD55) que inhibe la activación del complemento, y en el inhibidor de lisis reactiva de membrana (MIRL, CD59), lo que evita las funciones citolíticas del complemento, generando así hemólisis extravascular y hemólisis intravascular, respectivamente. ^(2, 5, 8-10).

El resultado de la pérdida de estas proteínas de la superficie celular es un aumento de la sensibilidad a la destrucción celular mediada por el complemento. En la actualidad se postula que la clona de HPN emerge como defensa a algún factor externo o interno que inhiba la hematopoyesis normal, pero incapaz de inhibir las células hematopoyéticas deficientes en las proteínas ancladas en el PIG ¹¹

Se reconocen dos grandes entidades de HPN, la forma clásica, predominantemente hemolítica y la que se presenta con insuficiencia de la médula ósea provocando la anemia aplásica (AA-PNH) ⁽¹²⁾. En tanto que, las células sanguíneas son deficientes en CD55 y CD59 ⁽¹³⁾.

La principal manifestación clínica es la hemólisis con hemoglobinuria lo que sucede en los pacientes con la forma clásica, porque en aquellos que cursan con AA-HPN esto puede estar ausente debido a un tamaño celular clonal pequeño de HPN ^(1-2, 5).

Las complicaciones que se observan son consecuencia directa de la hemólisis y del consiguiente secuestro de óxido nítrico (NO) por la hemoglobina libre intravascular. La depleción de óxido nítrico produce vasoconstricción periférica, que cursa con disfagia, disfunción eréctil, dolores abdominales, dolor torácico y frecuentemente astenia profunda que impide al paciente el desarrollo de su vida normal. La enfermedad puede aparecer en cualquier edad, dándose una mayor incidencia en la tercera década de la vida; la proporción entre sexos es aproximadamente del 50%¹⁴

Ciertas variantes de la HPN parecen ser más frecuentes en diferentes poblaciones; por ejemplo, en los mestizos mexicanos, las variantes con citopenia comprenden alrededor del 50% de todos los casos con HPN ^(13, 15,16), que no es el caso en poblaciones caucásicas.

El diagnóstico de HPN debe considerarse en todo paciente con citopenia de causa no determinada, en los casos de anemia aplásica/ hipoplasia medular, en los enfermos con fenómenos trombóticos y en las anemias hemolíticas de causa no bien definida. Tradicionalmente, el diagnóstico se fundamentaba en la prueba de **Ham** mediante la identificación de los hematíes sensibles al complemento por incubación de éstos a 37°C frente al propio suero del paciente acidificado y frente a un suero control homólogo también acidificado. Se considera positivo cuando se observa hemólisis en ambos casos, como consecuencia de la activación del complemento por el efecto del pH.

La prueba de la **sucrosa** tiene acción lítica preferentemente en los hematíes HPN-III y es positiva cuando éstos son >5%. La prueba de **inulina**, al ser un potente activador del complemento, puede identificar hematíes HPN, aunque solamente exista una subpoblación tipo II. (17-18)

Actualmente, la citometría de flujo es el principal método de elección para la identificación de células deficitarias en GPI, ya que es de utilidad en el diagnóstico, clasificación y monitorización de pacientes con diferentes formas clínicas de hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), pudiendo identificar distintos tipos celulares de acuerdo con la expresión de proteínas ancladas a través de GPI. (19-22)

TIPO I: SIN deficiencias de proteínas asociadas a GPI.

TIPO II: Con deficiencia PARCIAL de proteínas asociadas a GPI.

TIPO III: Con deficiencia TOTAL de proteínas asociadas a GPI.

El único tratamiento curativo para pacientes con HPN es el trasplante alogénico de células madre (5-6, 12); a pesar del tratamiento con corticosteroides, como la prednisona, el uso de la terapia androgénica, reemplazos de hierro continuos, la aplicación de eculizumab como un anticuerpo monoclonal humanizado contra la activación de C5 en la cascada del complemento alternativa e incluso esplenectomía, tan alto como 35% de los pacientes mueren dentro de 5 años del diagnóstico (23-25).

Eculizumab ha demostrado ser útil sólo en el tratamiento de pacientes con HPN con la variante hemolítica de la enfermedad (26), que es la menos frecuente en México (12, 13, 15, 16); es un fármaco caro, con un precio estimado de unos \$400,000.00 dólares al año por paciente, no erradica los clones con HPN y sí produce un aumento significativo de la esperanza y calidad de vida de los pacientes, siendo un fármaco con un buen perfil de seguridad y en general bien tolerado. (5-10, 12, 26).

Por otra parte, el costo promedio de los primeros 100 días después de un trasplante alogénico de células madres con acondicionamiento de intensidad reducida (RIST) en México es de \$20,000 dólares ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

A continuación se presentan los resultados de seis pacientes con HPN, tratados con el método de RIST en dos instituciones diferentes en México y con estos, se nos permiten discutir esta opción terapéutica actual frente a la era moderna de eculizumab como otra alternativa en el tratamiento de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

MATERIAL Y MÉTODOS:

a. Los pacientes y donantes:

Pacientes con hipoplasia consecutiva (menos del 10% de celularidad en la biopsia de médula ósea), una de las formas de HPN, aloinjertados en el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla (Puebla, México) y en el Hospital Universitario de Nuevo León (Monterrey, México), fueron prospectivamente seleccionados en el estudio. La **Tabla 1** muestra algunas de las características más destacadas de cada paciente. Entre 1983 y 1997 el diagnóstico de HPN se basó en la anomalía de las pruebas para HPN clásico: prueba de HAM, la hemólisis por la inulina y la hemólisis de la sucrosa; sin embargo estos sistemas son dependientes de la concentración de los hematíes con defecto HPN y su sensibilidad a la lisis por el complemento.⁽¹⁸⁾ Después de 1997, el diagnóstico se basa en la expresión de los antígenos CD55 y CD59, probado por citometría de flujo en los glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas, mientras que después de 2012, el diagnóstico se basó en la variante de aerolisina fluoresceinado (FLAER) a través de ensayos para detectar los granulocitos y monocitos que carecen de la expresión de estructuras unidas a GPI ⁽¹²⁾. Todos los pacientes tenían una puntuación de Karnofsky del 100% cuando se realizó el procedimiento. El donante era un hermano HLA idéntico en todos los casos (6/6). El proceso de selección para el tratamiento se inició con previa aprobación de la junta de revisión institucional y el consentimiento por escrito que se obtuvo de todos los individuos.

b. Movilización de células madre hematopoyéticas y aféresis:

El factor estimulante de colonias de granulocitos o **G-CSF** (10 µg/kg/día) fue administrado a los hermanos donantes en día - 5 a + 2. De uno a tres procedimientos de aféresis fueron programados por hacer en los días 0, 1 y 2 por medio de una máquina Haemonetics V-50 PLUS (Haemonetics Corporation,

Braintree MA), una máquina Baxter C-3000 PLUS (Baxter Healthcare, Deerfield IL), un AMICUS (Baxter Healthcare, Deerfield IL) o una COBE- espectros (Gambro, Lakewood CO) utilizando el Protocolo-Nebraska para el centrifugado ⁽²⁷⁾. El punto final de la colección era el procesamiento de 5000 - 7000 ml de sangre/m² en cada uno de los tres procedimientos de aféresis, con el fin de obtener al menos 5×10^8 células mononucleares y / o 1×10^6 células CD34 viables /Kg de peso del receptor.

c. Protocolo de acondicionamiento y aloinjerto:

El método mexicano de acondicionado con intensidad reducida fue empleado en todos los casos, como se describe a continuación ⁽²¹⁻²³⁾: busulfán oral, 4 mg/Kg fue administrado el día - 6 y - 5; ciclofosfamida i.v. 350 mg/m² en el día - 4, - 3 y - 2; Fludarabina i.v, 30 mg/m² en el día -4, -3 y -2; ciclosporina A oral (CyA) 5 mg /Kg se inició / en el día - 1 y metotrexato i.v. 5 mg/m² fue aplicado el día + 1, + 3, + 5 y + 11. CyA oral se continuó hasta el día 180, de acuerdo con los ajustes para obtener los niveles de CyA en suero de 150 a 275 ng/ml; posteriormente, fue disminuida de manera gradual en un lapso de 30-60 días.

Si se presentaban datos de enfermedad injerto contra el huésped (EICH), la disminución de la dosis de CyA se indicaba durante períodos más largos. Ondansetrón (1 mg i.v. cada hora durante 4 h después de la quimioterapia i.v.), una quinolona oral y un azol se utilizaron en todos los pacientes después de cada recomendación en su centro de atención; se utilizaron antibióticos y antimicóticos hasta más de 500 granulocitos/ul presentes. Los productos de la aféresis de células madre en sangre periférica (CMSP) se vuelven a infundir en los días 0 a 2. Infusiones de linfocitos del donante se utilizaron 100 días después de los aloinjertos sólo si existía evidencia de EICH y si había datos de actividad leucémica o recaída.

d) Análisis de los productos de aféresis:

La enumeración de los leucocitos totales, mononucleares (MNC) y de las células CD34 positivas se realizó por citometría de flujo ⁽²⁷⁻²⁹⁾ en un aparato EPICS Elite ESP (Coulter Electronics, Hialeah, FL), utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD34 HPCA-2 (Becton Dickinson, San José CA). No se han realizado procedimientos de purga.

e) Estudios de biología molecular:

Para determinar el grado de quimerismo post-trasplante, en los casos con diferencia en el sexo entre donante y receptor, se empleó la técnica de hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) para la enumeración de cromosomas sexuales X, Y⁽²⁷⁻²⁹⁾; en los casos con incompatibilidad de sistema ABO se utilizó un enfoque basado en la citometría de flujo; mientras que se analizaron también marcadores polimórficos de repeticiones cortas en tándem (STRs) ⁽²⁷⁻²⁹⁾ en ausencia de los desajustes mencionados anteriormente.

Los estudios de biología molecular se realizaron al momento del diagnóstico, a los 30 días del trasplante, cada 3 y 6 meses después. La supervivencia global (OS) se calculó de acuerdo con Kaplan y Meier ⁽³⁰⁾.

RESULTADOS

Seis individuos con HPN fueron aloinjertados, todos ellos con la variante citopénica de la enfermedad; dos de ellos eran mujeres, (**ver tabla 1**). El diagnóstico de HPN se hizo en 5 de los 6 casos por medio de la expresión de CD55 y CD59 probado por citometría de flujo en glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas. En un caso, el diagnóstico se basó en la prueba clásica de HAM, la hemólisis por inulina y la hemólisis por sucrosa, mientras que en un caso, el diagnóstico fue confirmado a través del ensayo FLAER basado en citometría de flujo, para detectar por fluorescencia los granulocitos y los monocitos carentes de la expresión de estructuras unidas a GPI ⁽¹³⁾. La media de la edad de los pacientes fue de 37 años (intervalo de 25 a 48 años). La mediana de tiempo desde el diagnóstico hasta el aloinjerto fue de 140 días (intervalo de 48 a 469 días). Los pacientes recibieron una media de $5,4 \times 10^6$ /Kg células CD34 (+) del trasplante alogénico, usando de 1 a 3 procedimientos de aféresis (mediana 1). El tiempo medio para alcanzar por encima de $0,5 \times 10^9$ granulocitos/L fue de 21 días, intervalo de 0-45, mientras que la mediana del tiempo para alcanzar una cifra de plaquetas por encima de 20×10^9 /L fue de 17 días, intervalo de 0-45 días. Cinco pacientes sobreviven en un período de 330-3150 días (mediana 1437) después de la RIST.

Número de paciente	1	2	3	4	5	6
Género	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Hombre	Hombre
Edad en años	36	36	44	25	38	48
Células CD34 x 10^6 /Kg	5.0	10.8	7.1	5.4	5.35	4.9
Días con recuento de granulocitos >500	19	45	18	35	24	14
Días con recuento de plaquetas >20,000	19	45	10	32	16	14
Aloinjertados	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
EICH	No	No	Sí	No	No	No
EICH crónica	Sí	No	No	No	Sí	No
Situación actual	Vive	Vive	Vive	Vive	Fallecido	Vive
Días transcurridos con RIST	3150	2874	1734	1140	330	365

TABLA 1: Principales características de los seis pacientes con HPN, aloinjertados de un hermano HLA idéntico. EICH = la enfermedad injerto contra huésped. EICH crónica = enfermedad crónica de injerto contra huésped. RIST = Trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida.

La supervivencia global de 3150 días es del 83,3%, mientras que no se ha alcanzado la mediana de supervivencia, está por encima de 3.150 días, **ver figura 1**. La enfermedad injerto contra huésped aguda (EICH) se definió como aquella que se produce antes de los 100 días; un paciente desarrolló EICH aguda (grado I), mientras que 2 de 6 (33%) han desarrollado EICH crónica. En un caso, la EICH crónica fue fatal a pesar de la inmunosupresión intensiva. Un paciente (número 5) murió 330 días después de la RIST, como resultado de EICH crónica; otro (número 1) desarrolló una leucemia de células peludas derivado del donante, 1.179 días después del aloinjerto ⁽³¹⁾. La mortalidad de 100 días fue del 0%, mientras que la mortalidad relacionada con el trasplante fue de 16,6%; en los seis pacientes se completó en su totalidad el procedimiento de forma ambulatoria.

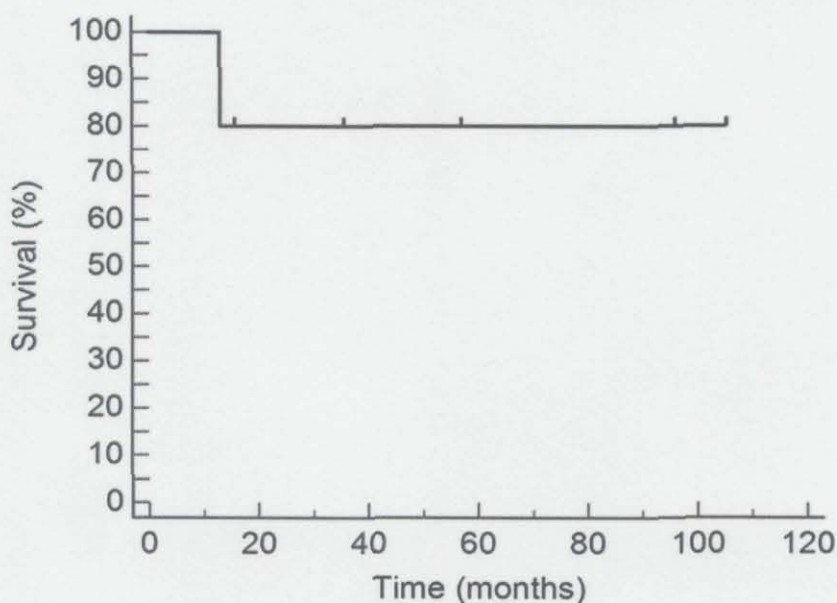


FIGURA 1. Supervivencia global de los seis pacientes con variante hipoplásica de HPN, aloinjerto de hermanos HLA idénticos. NOTA: Las marcas denotan pacientes vivos.

DISCUSIÓN

Con una prevalencia estimada de 1.3 casos por millón, la HPN puede ocurrir a cualquier edad pero es más frecuente en adultos entre 30 y 50 años de edad ⁽¹⁻²⁾. Hay datos que sugieren que la HPN se ha subestimado ⁽¹³⁾ y que los nuevos métodos para identificar clones con HPN se han traducido en un mayor reconocimiento de la enfermedad ^(1-2, 13). El tratamiento de HPN también ha cambiado a lo largo de tiempo: Prednisona, andrógenos, sustitución con hierro, esplenectomía, eculizumab y trasplante de células madre se han utilizado ^(5-6, 12-13, 23-25), siendo este último el único tratamiento curativo de la enfermedad ^(5-6, 12).

Aspectos económicos del tratamiento de enfermedades hematológicas son críticos, especialmente en los países en desarrollo; hemos estado particularmente interesados en el análisis de los aspectos de costo-beneficio del tratamiento de enfermedades hematológicas en México. En esta línea, hemos demostrado que el trasplante de células madre, que emplea nuestro "enfoque mexicano" tiene una mejor relación costo-beneficio que el tratamiento con nuevos fármacos en la leucemia mieloide crónica ⁽³⁰⁻³¹⁾ y en el mieloma múltiple ⁽³²⁻³⁴⁾. Dado que el costo promedio de un aloinjerto de células madre en nuestra experiencia es de 20, 000 dólares en los primeros 100 días ^(27-29, 32-33), y el precio estimado del tratamiento de la HPN con eculizumab es de alrededor de 400, 000 dólares al año por paciente ^(5, 12), con estos datos podemos afirmar que 20 pacientes con HPN se podrían aloinjertar en nuestro país con la cantidad de dinero empleado en el tratamiento de un paciente a lo largo de un año.

Eculizumab ha demostrado ser útil en el tratamiento de las variantes hemolíticas de HPN ⁽²⁴⁾, que son los menos frecuentes en México ⁽¹²⁻¹⁵⁾. Todos los pacientes que presentamos aquí tenían la variante hipoplásica de la enfermedad, que es interesantemente, el más frecuente en nuestro país ^(13,15, 16). También es importante mencionar que las variantes hemolíticas de la HPN no están relacionadas con los buenos resultados del aloinjerto ⁽⁵⁻⁶⁾; en consecuencia, es posible, que sólo a las variantes de hipoplasia de la enfermedad se les deba ofrecer un trasplante de médula ósea, una observación que puede ser crítica en lugares en los que predominan las variantes hipoplásicas.

Nuestros resultados de los pacientes aloinjertados, con HPN con la variante hipoplásica de la enfermedad empleando RIST, son similares a nuestros propios resultados de pacientes aloinjertados con anemia aplástica severa con el mismo régimen de acondicionamiento ⁽³⁵⁾. La supervivencia del 83% a largo plazo de estos pacientes con HPN hipoplásica puede apoyar la elección de este enfoque terapéutico, mientras que el costo promedio de cada procedimiento permite la práctica de esta variante de tratamiento, incluso en circunstancias de desventaja económica. El problema más difícil que todavía existe es para identificar a los pacientes con HPN que se beneficiarían del aloinjerto; la disponibilidad de un donante adecuado es crítico, ya que los resultados de la utilización de donantes no emparentados son peores que quiénes emplean el trasplante de hermanos HLA idénticos ⁽⁵⁻⁶⁾.

En resumen, hemos demostrado que los pacientes con HPN hipoplásica pueden aloinjertarse con seguridad usando RIST, que los resultados a largo plazo son adecuados y que la relación costo-beneficio de este tratamiento es razonable. Se necesitan estudios adicionales para confirmar la utilidad de RIST en el tratamiento de las variantes de hipoplasia de la HPN.

GRÁFICAS:

Número de paciente	1	2	3	4	5	6
Género	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Hombre	Hombre
Edad en años	36	36	44	25	38	48
Células CD34 x 10 ⁶ /Kg	5.0	10.8	7.1	5.4	5.35	4.9
Días con recuento de granulocitos >500	19	45	18	35	24	14
Días con recuento de plaquetas >20,000	19	45	10	32	16	14
Aloinjertados	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
EICH	No	No	Sí	No	No	No
EICH crónica	Sí	No	No	No	Sí	No
Situación actual	Vive	Vive	Vive	Vive	Fallecido	Vive
Días transcurridos con RIST	3150	2874	1734	1140	330	365

TABLA 2: Principales características de los seis pacientes con HPN, aloinjertados de un hermano HLA idéntico. EICH = la enfermedad injerto contra huésped. EICH crónica = enfermedad crónica de injerto contra huésped. RIST = Trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida.

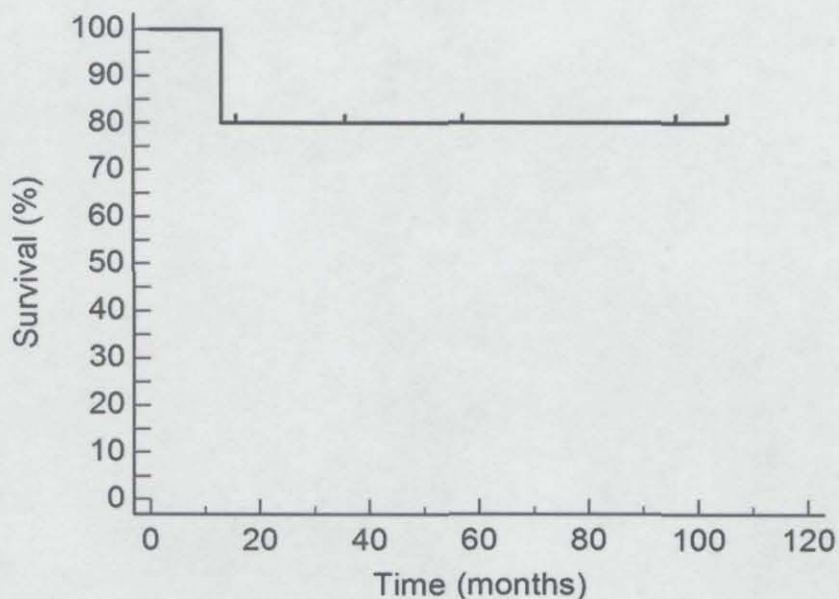


FIGURA 1. Supervivencia global de los seis pacientes con variante hipoplásica de HPN, aloinjertados de hermanos HLA idénticos. NOTA: Las marcas denotan pacientes vivos.

REFERENCIAS:

- 1) Parker CJ, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106 (12):3699-709
- 2) Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol*. 2012; 19 (3):141-8
- 3) Endo M, Beatty PG, Vreeke TM, Wittwer C, Singh SP, Parker CJ. Syngeneic bone marrow transplantation without conditioning in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: in vivo evidence that the mutant stem cells have a survival advantage. *Blood*. 1996; 88(2):742-50
- 4) Ditschkowski M, Trensche R, Kummer G, Elmaagacil AH, Beelen DW. Allogeneic CD34-enriched peripheral blood stem cell transplantation in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 32(6):633-5
- 5) Brodsky RA. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2010;95(6):855-6
- 6) Santarone S, Bacigalupo A, Risitano AM, Tagliaferri E, Di Bartolomeo E, Iori AP, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2012; 95(6):983-8

- 7) Risitano AM, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics*. 2008; 2(2):205-22
- 8) Lee JW, Jang JH, Kim JS, Yoon SS, Lee JH, Kim YK, et al. Clinical signs and symptoms associated with increased risk for thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from a Korean Registry. *Int J Hematol*. 2013; 97(6):749-57
- 9) Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007; 72(3):167-77
- 10) Preis M, Lowrey CH. Laboratory test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 2014;89(3):339-41
- 11) Sánchez Segura M, González García RM, Marsán Suárez V, Macías Abraham C. Asociación entre el estrés y las enfermedades infecciosas, autoinmunes, neoplásicas y cardiovasculares. *Rev. Biomed*. 2006; 22 (3). Disponible:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402892006000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- 12) Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, Blaise D, de Souza CA, Vigouroux S, et al. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2012;97(11):1666-73
- 13) Ruiz-Argüelles GJ, Hernández-Reyes J, González-Ramírez MP, Martagón-Herrera NA, Rosales-Durón AD, Ruiz-Delgado GJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in México: a 30-year, single institution experience. *Rev Invest Clin*. 2014; 66(1):12-6

14) Villegas A, Urbano A, Arrizabalaga B, Colado E, Gaya A, González A. Guía clínica HPN Consenso español para diagnóstico y tratamiento de Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. Actualización 2014.

15) Ruiz-Argüelles GJ, Morales-Aceves R, Labardini J, Kraus-Weisman A.: Hemoglobinuria paroxística nocturna. Experiencia de 30 años en el Instituto Nacional de la Nutrición (México). *Sangre (Barc)* 1981; 26:463-470.

16) Góngora-Biachi R, González-Martínez P, Gonzalez-Llaven J, et al. Clinical spectrum and prognostic factors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Mexico. *Rev Invest Clin* 1994; 46 (supl 1):187.

17) Balcells Gorina A, Prieto Valtueña JM, Alegre Garrido F, Ávila MA, Belouqui O, Betés M (et al). La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales, exploración de los síndromes, cuadro biológico de las enfermedades. 21ª ed. Edit. Masson. Barcelona, España. 2010. P 10.

18) Ruiz Argüelles GJ, Fundamentos de Hematología. 4ª ed. Edit. Médica Panamericana. México, D.F. 2009. P.79.

19) Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, Nelson KL, Chiurazzi PL, Buckley JT, Borowitz MJ. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459–466

20) Borowitz MJ¹, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Clinical Cytometry Society. Cytometry B Clin Cytom. 2010 Jul;78(4):211-30

21) Sutherland DR¹, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry.. Cytometry B Clin Cytom. 2012 Jul;82(4):195-208.

22) Sutherland DR¹, Acton E, Keeney M, Davis BH, Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. Cytometry B Clin Cytom. 2013 Jul 3.

23) Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011; 117(25):6786-92

24) de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112(8):3099-106

25) Sharma V. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pathogenesis, testing and diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013; 11(9):1-11

26) (Hillmen P, Muus P, Röth A, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2013;162:62-73.)

27) Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú OE, Hernández NE.: Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis. *Bone Marrow Transpl* 2000; 25:131-133.

28) Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ: A Mexican way to cope with stem cell transplantation. *Hematology* 2012, 17 (Suppl 1): 195-7

29) Galo-Hooker E, Ruiz-Delgado GJ, Zamora-Ortiz G, Velázquez-Sánchez-de-Cima S, Ruiz-Argüelles GJ.: In pursuit of the graft *versus* myeloma effect: A single institution experience, *Hematology* 2013; 18:89-92

30) Kaplan EL, Meier P.: Nonparametric estimations from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:457-63

31) Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Delgado GJ, Calderón-Meza E, Ruiz-Argüelles A, Garcés-Eisele J.: Donor-derived hairy cell leukemia. *Leukemia Lymph* 2009, 50: 1712-14

32) Ruiz-Argüelles GJ.: Whither the bone marrow transplant. *Hematology* 2010; 15:1-3

33) Ruiz-Argüelles GJ, Tarín-Arzaga LC, González-Carrillo ML, Gutiérrez-Riveroll KI, Rangel-Malo R, Gutiérrez-Aguirre CH, Cantú-Rodríguez OG, Gómez-Almaguer D, Giralt S: Therapeutic choices in patients with Ph1 (+) *chronic myelogenous leukemia living in México in the tyrosine kinase inhibitors (TKI) era: Stem cell transplantation or TKI's ?*. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42:23-28.

34) López-Otero A, Ruiz-Delgado GJ, Ruiz-Argüelles GJ.: A simplified method for stem cell autografting in multiple myeloma: A single institution experience. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44:715-9

35) Gómez-Almaguer D, Vela-Ojeda J, Jaime-Pérez JC, Gutiérrez-Aguirre CH, Cantú-Rodríguez OG, Sobrevilla-Calvo P, Rivas-Vera S, Gómez-Rangel JD, Ruiz-Argüelles GJ.: Allografting in patients with severe aplastic anemia using peripheral blood stem cells and a fludarabine-based conditioning regimen: The Mexican Experience. *Am J Hematol* 2006, 81:157-161.