

Trasplante de células hematopoyéticas alogénicas en niños y adolescentes empleando esquema de acondicionamiento no mieloablativo. Experiencia en una sola institución

Dr. Guillermo J. Ruiz-Argüelles¹, Dra. Amelia Morales-Toquero¹, Dr. José David Gómez-Rangel¹, Dra. Briceida López-Martínez²

¹Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla; ²Laboratorios Clínicos de Puebla, Puebla, Pue., México.

Resumen

Introducción. El trasplante de médula ósea es un recurso terapéutico útil en algunos niños.

Material y métodos. Se llevaron a cabo 26 trasplantes de células hematopoyéticas alogénicas en 20 pacientes con edades entre 1 y 18 años. Se empleó el esquema "Mexicano" de acondicionamiento no mieloablativo, en una sola institución. Se incluyeron pacientes con enfermedades hematológicas tanto malignas (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda y leucemia granulocítica crónica) como benignas (anemia aplásica, síndrome de Blackfan-Diamond y talasemia). La mediana de edad de los pacientes fue de 9 años (intervalo 1-18 años).

Resultados. La mediana del tiempo de seguimiento post-trasplante fue de 184 días (intervalo 14 a 1 796 días). En 10 de 26 trasplantes (38%) se observó enfermedad aguda de injerto contra huésped, en tanto que en 4 de 19 trasplantes seguidos por más de 100 días (21%) se observó enfermedad de injerto contra huésped crónica. La mortalidad a 100 días post-trasplante fue de 19% y en 12 pacientes hubo recaída post-trasplante de la enfermedad. La supervivencia a 1 796 días fue de 44%.

Conclusión. En niños y adolescentes, el trasplante de médula ósea empleando acondicionamiento no mieloablativo es exitoso, tiene mínima toxicidad y costo accesible, por lo que parece una opción terapéutica útil para ser empleada en países en desarrollo. Tal vez sea conveniente considerar la reducción de la toxicidad de los esquemas de acondicionamiento para los trasplantes alogénicos de médula ósea en niños.

Palabras clave. Trasplante de médula ósea; niños; no mieloablativo.

Solicitud de sobretiros: Dr. Guillermo J. Ruiz-Argüelles, Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, 8B Sur 3710, C.P. 72530, Puebla, Pue., México.

Fecha de recepción: 10-01-2005.

Fecha de aprobación: 25-05-2005.

Introducción

El trasplante de células totipotenciales hematopoyéticas (CTH) alogénicas obtenidas de la médula ósea, de la sangre periférica o de la sangre placentaria, es una opción terapéutica útil en niños con diversas enfermedades hematológicas, tanto malignas como benignas. Los resultados de este tratamiento han mejorado en los últimos años, lo que se explica tanto por la disponibilidad de mejores medidas de apoyo para los pacientes como por la mayor efectividad del procedimiento para erradicar la enfermedad. A pesar de los avances en el campo del trasplante de médula ósea, los esquemas de acondicionamiento mieloablatoivo tradicionales están asociados con una gran toxicidad y, como resultado, con diversos efectos adversos tanto agudos como crónicos, dependientes principalmente de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y de la toxicidad de los esquemas de preparación o acondicionamiento pre-trasplante.¹⁻³

Los resultados del trasplante de CTH en niños son en general mejores que en adultos, principalmente por la menor incidencia y gravedad tanto de la toxicidad en diversos órganos como de la EICH.^{2,4} Sin embargo, es claro que los niños son más vulnerables a las secuelas tardías, a largo plazo, de los esquemas de acondicionamiento,^{2,5} por lo que los esquemas de preparación pre-trasplante menos tóxicos parecerían ser adecuados en niños y adolescentes, dado que producen menos complicaciones tardías. Recientemente, se han informado los resultados de llevar a cabo trasplantes de CTH empleando esquemas de intensidad reducida en pacientes con enfermedades hematológicas tanto benignas como malignas; los resultados parecen ser similares a los de los trasplantes de CTH hechos con esquemas de acondicionamiento habituales, mieloablatoivos.⁶⁻¹² La mayoría de los trasplantes de CTH empleando esquemas no mieloablatoivos se han hecho en adultos. En este informe se da a conocer nuestra experiencia en una sola institución haciendo trasplantes de CTH en niños y adolescentes, usando un esquema de acondicionamiento no mieloablatoivo

que ha mostrado ser muy útil y accesible en el país.

Material y métodos

a) Pacientes y donadores: se incluyeron de manera prospectiva en este estudio todos los pacientes sometidos a trasplante alogénico en el Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla entre enero de 1999 y noviembre de 2004, con edades entre 1 y 18 años. Se hizo la tipificación serológica de los antígenos clase I (HLA A y B) hasta 2002; después de esta fecha se empleó biología molecular. Los antígenos HLA clase II (DR) fueron estudiados siempre por biología molecular. En todos los casos el donador fue un hermano, fuera HLA-compatible, con un solo antígeno desigual (5/6) o HLA idéntico (6/6). Todos los pacientes debían tener una puntuación en la escala de Karnofsky de 100% al realizar el trasplante. Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la Institución así como el consentimiento informado y escrito de todos los pacientes a través de los padres o tutores.

b) Movilización de las CTH y aféresis: se administró al donador durante los días -5 a +2 filgrastim (G-CSF) a razón de 10 mg/kg/día. Los procedimientos de aféresis se realizaron en los días 0, +1 y +2 con una máquina *Haemonetics M-50 plus* (*Haemonetics Corporation, Braintree MA*) o una máquina *Baxter C-3000 Plus* (*Baxter Healthcare, Deerfield IL*) empleando el protocolo de aféresis Spin-Nebraska.⁹ El objetivo fue procesar de 5 000-7 000 mL de sangre/m² en cada una de las aféresis, con el objetivo de obtener un mínimo de 5×10^8 células mononucleares ó $2-6 \times 10^6$ células CD34 viables/kg del receptor. La cuantificación del total de glóbulos blancos, células mononucleares y células con antígeno CD34 se hizo por citometría de flujo,^{13,14} en un aparato EPICS Elite ESP (*Coulter Electronics, Hialeah, FL*) usando el anticuerpo monoclonal anti-CD34 HPCA-2¹⁵ (*Becton Dickinson, San José CA*).

c) Acondicionamiento y trasplante: se empleó el método "Mexicano" de acondicionamiento no mie-

loablativo;⁹ el método es una modificación de los esquemas de acondicionamiento de baja intensidad usados en Houston por Giralt y col.,¹⁰ y en Jerusalén por Slavin y col.:¹ se usa busulfán oral 4 mg/kg en los días -6 y -5; ciclofosfamida intravenosa (IV) 350 mg/m² en los días -4, -3 y -2; fludarabina IV 30 mg/m² en los días -4, -3 y -2; ciclosporina A oral (CyA) 5 mg/kg iniciando el día -1 y metotrexato IV 5 mg/m² administrado los días +1, +3, +5 y +11. La CyA oral se continúa hasta el día +180, con ajustes de acuerdo a los niveles en sangre, y luego se disminuye de manera paulatina por 30-60 días más. En caso de aparición de datos de EICH, la disminución de CyA se hace por períodos más largos. Se administró en todos los pacientes ondansetron (0.15 mg/kg/dosis cada 12 horas durante dos días después de la quimioterapia IV), ciprofloxacina (250 mg dos veces al día) e itraconazol (100 mg dos veces al día); los antibióticos y antimicóticos se emplearon hasta que los pacientes recuperaron más de 500 granulocitos/ μ L. Los productos de aféresis se inyectaron a los pacientes los días 0, +1 y +2, de acuerdo con la cantidad de células CD34 viables obtenidas para trasplantar un total de 2-6 x 10⁶ células CD34 viables/kg del receptor (*vide supra*).

d) Estudios de biología molecular: para seguir la cinética del quimerismo post-trasplante, se investigaron los cromosomas X y Y,¹⁶⁻¹⁸ en casos de disparidad de sexo, por medio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH); en los otros casos, los estudios de quimerismo se hicieron investigando microsatélites/polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP).¹⁶⁻¹⁸ Los marcadores moleculares de las enfermedades subyacentes (BCR/ABL, PML/RARa y AML1/ETO) se investigaron por reacción en cadena de la polimerasa/transcriptasa reversa (RT-PCR).¹⁸ Estos estudios, se hicieron 15, 30 y 60 días después del trasplante y cada dos a seis meses después del día 60.¹⁸

Resultados

Se hicieron 26 trasplantes en 20 pacientes. Seis niños fueron trasplantados dos veces. Se incluyeron 11 pacientes con leucemia aguda linfoblástica

(LAL), dos pacientes con leucemia granulocítica crónica Ph1 (+), dos con leucemias bifenotípicas (una de ellas con Ph1), dos con leucemia aguda mieloblástica, una hipoplasia medular grave, una talasemia beta homocigota y uno con síndrome de Blackfan-Diamond. La mediana de edad de los pacientes fue de nueve años (intervalo 1-18 años). El cuadro 1 muestra las características más sobresalientes de los pacientes.

Seis pacientes (casos 2, 4, 6, 8, 11 y 14) fueron trasplantados dos veces usando el mismo esquema de acondicionamiento y de trasplante. Cuatro de los seis pacientes trasplantados dos veces tenían LAL multirrecaída; de ellos, sólo uno se encuentra vivo después del segundo trasplante; este paciente (caso 14) se trasplantó del cordón umbilical de su hermano, estuvo en remisión, posteriormente tuvo una nueva recaída y fue trasplantado una vez más y un año después con células hematopoyéticas del mismo hermano de cuyo cordón umbilical se trasplantó la primera vez. El paciente del caso 2, con un estado homocigoto para talasemia beta, se trasplantó también dos veces: la primera vez con células hematopoyéticas del cordón umbilical de su hermana heterocigota para talasemia beta y la segunda vez, 1 600 días después, con células hematopoyéticas periféricas también de la hermana; rechazando dos veces el trasplante, como se ha descrito con frecuencia para los pacientes con hemoglobinopatías o talasemias multitransfundidos; el paciente se encuentra vivo y se planea hacerle un tercer trasplante con un número mayor de células hematopoyéticas.

Para todo el grupo, la mediana del tiempo de recuperación post-trasplante para alcanzar más de 0.5 x 10⁹/L de neutrófilos absolutos fue de 13 días (intervalo 0 a 29), en tanto que el tiempo de recuperación de plaquetas hasta más de 20 por 10⁹/L fue de 13 días (intervalo 0 a 41). La mediana del número de paquetes de eritrocitos transfundidos fue de 4 (intervalo 0 a 36) y la mediana de sesiones de transfusión de plaquetas fue de 0 (intervalo 0 a 9). En 23 trasplantes (88%) el procedimiento se pudo hacer de manera com-

Cuadro 1. Características principales de los 20 pacientes incluidos en el estudio

Núm. de paciente	Edad	Sexo	Enfermedad	Estado post-TMO	Supervivencia	EICH-a	EICH-c
1	14	M	LAM-M2	M	330	NO	NO
2	1	M	Talasemia beta	V	1 599	NO	NO
2*	4	M	Talasemia beta	V	866	NO	NO
3	10	M	LAL-2REM	M	103	NO	NO
4	4	M	LAL-2REM	V	1 796	I	NO
4*	4	M	LAL-3REM	M	53	NO	-
5	12	F	LAL-2REM	M	107	NO	NO
6	9	M	LAL-2REM	V	1 503	NO	NO
6*	10	M	LAL-3REM	M	190	NO	NO
7	4	M	Hipoplasia	M	411	II	Limitada
8	17	M	LAL-2REM	V	1 043	NO	NO
8*	18	M	LAL-3REM	M	47	IV	-
9	6	F	Blackfan-Diamond	M	85	II	-
10	13	F	LAL-2REM	M	134	NO	NO
11	9	M	LAH-1REM	V	983	NO	NO
11*	10	M	LAH-2REM	M	19	NO	-
12	4	M	LAL-1REC	M	110	IV	Limitada
13	13	M	LAL-1REC-REF	M	14	II	-
14	3	M	LAL-1REM	V	359	NO	NO
14*	4	M	LAL-2REM	V	21	NO	-
15	18	M	LGC-Ph1+	V	469	I	Limitada
16	10	F	LGC-Ph1+	M	201	IV	Extensa
17	6	F	LAL-1REC	V	560	No	No
18	3	F	LAL-2REM	V	178	II	No
19	5	F	LAH-Ph1+ -REF	V	160	I	No
20	9	M	LAM-AMLI/ETO	V	71	No	-

post-TMO: post-trasplante hematopoyético. La supervivencia se expresa en días post-trasplante. EICH-a: enfermedad de injerto contra huésped aguda; EICH-c: enfermedad de injerto contra huésped crónica

*Se refiere al segundo trasplante; LAM: leucemia aguda mieloblástica; LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAH: leucemia aguda híbrida; REM: remisión; REC: recaída; REF: refractaria; Ph1+: cromosoma Philadelphia; M: muerto; V: vivo

En la columna de EICH-c, los pacientes en quienes aparece el guión (-) han sido seguidos por menos de 100 días, por lo que no es posible evaluar en ellos la EICH-c

pletamente extrahospitalaria. La mediana del tiempo de seguimiento post-trasplante es de 184 días (intervalo 14 a 1 796). En 10 de 26 trasplantes (38%) se observó enfermedad aguda de injerto contra huésped, en tanto que en 4 de 19 trasplantes seguidos por más de 100 días (21%) se observó enfermedad injerto contra huésped crónica; siete pacientes han sido seguidos por menos de 100 días. En cinco pacientes no hubo toma de injerto. Trece de los 20 pacientes han fallecido; cinco murieron en los primeros 100 días

posteriores al trasplante; de los fallecidos, tres murieron como consecuencia de enfermedad de injerto contra huésped crónica y los demás durante recaídas de las enfermedades que motivaron el trasplante. De acuerdo a Kaplan y Meier, la mediana de supervivencia del grupo es de 380 días, en tanto que la supervivencia a 1 796 días es de 44% (Fig. 1). La supervivencia de los pacientes con enfermedades benignas no fue diferente que aquella de los pacientes trasplantados por enfermedades malignas ($P > 0.5$). En todos los pacien-

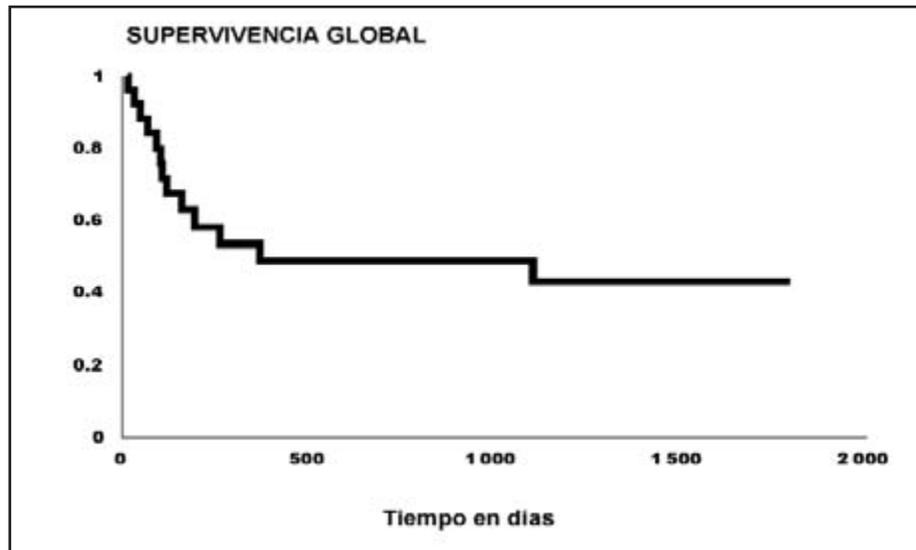


Figura 1. Curva de supervivencia global post-trasplante de acuerdo a Kaplan y Meier de los 20 pacientes pediátricos que recibieron 26 trasplantes de células hematopoyéticas alogénicas.

tes quienes fueron vigilados por más de 100 días se demostró quimerismo post-trasplante completo, con más de 90% de células del donador. Al analizar a los pacientes por subgrupos de enfermedades encontramos que los niños con LAL fueron quienes tuvieron los resultados más malos; en ellos se observaron siete recaídas (63%), siendo la supervivencia a 60 meses de 27%.

Discusión

Desde que los niños trasplantados de médula ósea están sobreviviendo por períodos más largos, los efectos adversos tardíos están siendo más aparentes. Entre éstos se han señalado anomalías tiroideas, fallas gonadales, deficiencia de la hormona del crecimiento, cataratas, etc.;^{2-5,7} éstos son más frecuentes en niños quienes recibieron regímenes de radiación corporal total durante el acondicionamiento pre-trasplante. Además son bien conocidas otras complicaciones como disfunción neurológica, disfunción pulmonar crónica, alteraciones dentales, cardíacas, oftalmológicas y óseas;^{2-5,7} adicionalmente, existe el riesgo de desarrollar neoplasias malignas secundarias, especialmente en pacientes sometidos a acondicionamiento con regímenes de radiación corporal total. Todos estos efectos a largo plazo

son considerablemente menos frecuentes y menos graves cuando se emplean esquemas de acondicionamientos de toxicidad reducida, ya que el daño tanto al sistema hematopoyético como al sistema inmune y otros órganos de la economía es considerablemente menor.¹⁷⁻²⁹

En los últimos años, se han hecho cambios en los abordajes terapéuticos de pacientes mexicanos con diversas enfermedades hematológicas, para hacerlos más accesibles y simplificados y, en consecuencia, para beneficiar a un mayor número de individuos. En el campo específico del trasplante de CTH alogénicas obtenidas de la sangre periférica, hemos realizado varias modificaciones a los métodos que han dado como resultado que un mayor número de pacientes puedan trasplantarse ahora en el país.¹⁷⁻²⁹ Las características sobresalientes del esquema de acondicionamiento no mieloablativo que desarrollamos en México son: 1. Los costos son notablemente menores que los de los trasplantes convencionales;¹⁷⁻²⁹ 2. Los trasplantes se pueden hacer de manera ambulatoria;^{8,9,19} 3. Los pacientes trasplantados con nuestro método casi nunca tienen complicaciones por citomegalovirus;^{18,27} 4. Los trasplantes pueden hacerse sin transfusiones de eritrocitos ni

de plaquetas,²³ y sin emplear factores de crecimiento ni inmunoglobulinas endovenosas^{8,9,19,29} y, dado que es factible que el paciente recupere hematopoyesis endógena, es posible hacerle a un mismo paciente varios trasplantes, lo que resulta imposible en los trasplantes convencionales, ya que en estos últimos, si no hay prendimiento del injerto, el paciente fallece en hipoplasia medular iatrogénica.^{8,9,19,29}

Los resultados halagüeños obtenidos en México usando el esquema "Mexicano" de acondicionamiento, se han comenzado a reproducir ya en otros países de Latinoamérica con limitaciones económicas similares a las de nuestro país.^{29,30}

Por otro lado, el primer informe en la literatura mundial con el empleo de esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida para hacer trasplantes hematopoyéticos en niños se realizó por los autores de este informe en 2003, uniendo su experiencia con la de investigadores del Hospital Universitario de Monterrey;²² posteriormente y como era esperado, otros investigadores han confirmado la utilidad de estos esquemas de acondicionamiento en niños.³¹ Los esquemas de acondicionamiento de intensidad reducida se idearon inicialmente para pacientes añosos o debilitados, en quienes no era posible administrar las dosis habituales de quimioterapia o radioterapia de acondicionamiento.^{1,6,10,11} Sin embargo, son los niños quienes más problemas pueden desarrollar a largo plazo como resultado del uso de acondicionamientos tóxicos; estrictamente son los niños a quienes más se debiera proteger de la toxicidad de los esquemas habituales de acondicionamiento pre-trasplante de médula ósea.^{22,31,32} Con esta idea en la mente se hizo un estudio inicial multicéntrico de trasplantes no mieloablativos en niños;²² los datos de este trabajo se refieren a un número mayor de pacientes estudiados, tratados y seguidos en una sola institución en el país. Los resultados son halagüeños y confirman las observaciones hechas inicialmente en el estudio multicéntrico: en 26 trasplantes de CTH hechos en 20 niños y adolescentes, incluidos pacientes con

enfermedades hematológicas, tanto malignas (LAL, leucemia mieloblástica aguda, leucemia híbrida y leucemia granulocítica crónica) como benignas (anemia aplásica, síndrome de Blackfan-Diamond y talasemia beta homocigota), se encontró que la mediana de supervivencia del grupo es de 380 días, en tanto que la supervivencia a 1 796 días es de 44%, resultados similares a los obtenidos por otros investigadores usando esquemas de preparación convencionales.^{2,4,5} Es interesante que los resultados obtenidos en niños con LAL fueron desalentadores, lo que seguramente depende de que esta neoplasia es poco sensible al efecto de injerto contra tumor, mecanismo principal por el que los trasplantes no mieloablativos ejercen su efecto anti-tumoral;²⁹ la mayoría de estos pacientes fueron trasplantados en fases avanzadas de la leucemia (Cuadro 1). Como en experiencias previas,^{18,27} ningún niño tuvo morbilidad por citomegalovirus, sus requerimientos transfusionales fueron muy bajos y en 88% de los casos el procedimiento se pudo completar sin llevar al niño al hospital en ningún momento. Estos datos apoyan la observación de que los trasplantes de células hematopoyéticas hechos con esquemas de intensidad reducida en niños y adolescentes se asocian con resultados favorables y supervivencias comparables y hasta mejores que las obtenidas empleando esquemas habituales o convencionales de acondicionamiento mieloablativo pre-trasplante. Los costos reducidos del método que se ha empleado, en promedio de 15 a 20 000 dólares americanos,^{8,9,19,21,28,29} lo hacen una buena opción para pacientes pediátricos quienes viven en países en desarrollo.^{22,26,29}

En resumen, se ha demostrado que los trasplantes de CTH hechos en niños empleando nuestro esquema de acondicionamiento de intensidad reducida permite una toma de injerto rápida, con efectos tóxicos mínimos, en pacientes con enfermedades hematológicas malignas y benignas, aún en presencia de enfermedad avanzada o multirecaída, y a costos reducidos, accesible a pacientes quienes viven en países en desarrollo.

NON-MYELOABLATIVE STEM CELL TRANSPLANTATION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS: A SINGLE INSTITUTIONAL EXPERIENCE

Introduction. Bone marrow transplantation is a curative option in some children with diverse underlying diseases.

Material and methods. Using the "Mexican" protocol to conduct allogeneic non-myeloablative stem cell transplantation (NST), we have prospectively carried out, in a single institution, 26 allografts in 20 individuals aged 1 to 18 years. Patients with both malignant (acute lymphoblastic leukemia, acute myelogenous leukemia and chronic myelogenous leukemia) and non-malignant (aplastic anemia, Blackfan-Diamond syndrome and homozygous thalassemia) conditions were included. Median age of the patients was 9 years (range 1-18).

Results. Median follow-up time is 184 days (range 14-1 796). In 10 of 26 allograft (38%) acute graft *versus* host disease (GVHD) was observed, whereas chronic GVHD was present in 4 out of 19 (21%) grafts followed for 100 days or more. The 100-day mortality was 19% and 12 patients experienced a post-transplant relapse of the malignancy. The 1 796 day's overall-survival was 44%.

Conclusions. We report our experience with non-myeloablative stem cell transplantation in children and adolescents with both malignant and non-malignant underlying hematologic conditions. Although the experience is limited our results are very promising; moreover, due to the diminished toxicity and reduced cost, this approach seems to be a good alternative to allograft these types of patients in developing countries.

Key words. Bone marrow transplantation; stem cells; children; non myeloablative conditioning.

Referencias

1. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y. Non-myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematological diseases. *Blood*. 1998; 91: 756-63.
2. Garaventa A, Porta F, Rondelli R. Early deaths in children after BMT. Bone Marrow Transplantation Group of the Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology and Gruppo Italiano Trapianto di Midollo. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 10: 419-23.
3. Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD. Regimen related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1988; 6: 1562-8.
4. Pession A, Rondelli R, Paolucci P. Hematopoietic stem cell transplantation in childhood: report from the bone marrow transplantation group of the Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica. *Haematologica*. 2000; 85: 638-45.
5. Sanders JE. Growth and development after hematopoietic cell transplantation. En: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editores. *Hematopoietic cell transplantation*. Malden: Blackwell Science; 1999. p. 764-75.
6. Barret J, Richards C. Non-myeloablative stem cell transplants. *Br J Haematol*. 2000; 111: 6-17.
7. Miniero R, Zecchina G, Nagler A. Non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation in children. *Haematologica*. 2000; 85 Suppl 11: 12-7.
8. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú O, Jaime-Pérez JC. Results of an outpatient-based stem cell allotransplant program using nonmyeloablative conditioning regimens. *Am J Hematol*. 2001; 66: 241-4.
9. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Ruiz-Argüelles A, González-Llano O, Cantú OG, Hernández NE. Hematopoietic stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen can be safely performed on an outpatient basis. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25: 131-3.
10. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K. Engraftment of allogenic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft *versus* leukemia without myeloablative therapy. *Blood*. 1997; 89: 4531-6.
11. Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, et al. Transplant-lite: induction of graft *versus* malignancy using fludarabina-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment

for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2817-24.

12. Childs R, Contentin N, Clave E, Bacechi E, Hensel N, Boland C, et al. Reduced toxicity and transplant related mortality following non-myeloablative peripheral blood stem cell transplantation for malignant disease. *Blood*. 1999; 94 Suppl 1: 393a.

13. Ruiz-Argüelles A. Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles, applications and problems. *Ann Biol Clin*. 1992; 50: 735-43.

14. Ruiz-Argüelles A, Orfao A. Caracterización y evaluación de células totipotenciales en sangre periférica y médula ósea. En: Ruiz-Argüelles GJ, San-Miguel JF, editor. *Actualización en leucemias*. México: Editorial Médica Panamericana; 1996. p. 79-82.

15. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, López-Martínez B, Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC, González-Llano O. Results of an allogeneic non-myeloablative stem cell transplantation program in patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*. 2002; 87: 894-6.

16. Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 2934-8.

17. Yam P, Petz L, Knowlton R, Wallace R, Stock A, deLange G, et al. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1987; 43: 399-407.

18. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Santellán-Olea MR, Abreu-Díaz G, Reyes-Núñez V, Ruiz-Argüelles A, et al. Follow up of hemopoietic chimerism in individuals given allogeneic hemopoietic stem cell allografts using an immunosuppressive, non-myeloablative conditioning regimen: A prospective study in a single institution. *Leukemia Lymph*. 2002; 43: 1509-11.

19. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, López-Martínez B, Ponce-de-León S, Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC. No cytomegalovirus-related deaths after non-ablative stem cell allografts. *Hematology*. 2002; 7: 95-9.

20. Ruiz-Argüelles GJ. "The Mexican approach" to conduct non-myeloablative stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2001; 67: 5-6.

21. Ruiz-Argüelles GJ. Allogeneic stem cell transplantation using non-myeloablative conditioning regimens: Results of the Mexican approach. *Int J Hematol*. 2002; 76 Suppl 1: 376-9.

22. Gómez-Almaguer D, Ruiz-Argüelles GJ, Tarín-Arzaga LC, González-Llano O, Jaime-Pérez JC, López-Martínez B, et al. Reduced-intensity stem cell transplantation in children and adolescents: The Mexican experience. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003; 9: 157-61.

23. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, Gómez-Rangel D, Estrada E, Marín-López A, Bravo-Hernández G, et al. Decreased transfusion requirements in patients given stem cell allografts using a non-myeloablative conditioning regimen: A single institution experience. *Hematology*. 2003; 8: 151-4.

24. Ruiz-Argüelles GJ, López-Martínez B, López-Ariza B. Successful allogeneic stem cell transplantation with nonmyeloablative conditioning in patients with relapsed Hodgkin's disease following autologous stem cell transplantation. *Arch Med Res*. 2003; 34: 242-5.

25. Ruiz-Argüelles GJ. Trasplante alogénico no mieloablatoivo (TANM): La experiencia de Puebla y Monterrey. *Gac Med Mex*. 2003; 139 Suppl 2: S151-4.

26. Ruiz-Argüelles GJ. Non-myeloablative bone marrow transplantation. *Arch Med Res*. 2003; 34: 554-7.

27. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Rangel JD, Ponce-de-León S, González-Déctor L, Reyes-Núñez V, Garcés-Eisele J. The Mexican schedule to conduct allogeneic stem cell transplantation is related to a low risk of cytomegalovirus reactivation and disease. *Am J Hematol*. 2004; 75: 200-4.

28. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Gómez Rangel JD, Vela-Ojeda J, Cantú-Rodríguez OG, Jaime-Pérez JC, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with non-myeloablative conditioning in patients with acute leukemia eligible for conventional allografting: A prospective study. *Leukemia Lymphoma*. 2004; 45: 1191-5.

29. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D. Braking dogmata to help patients: Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther*. 2004; 4: 1693-9.

30. Ruiz-Argüelles GJ, Gómez-Almaguer D, Gómez-Rangel JD, Vela-Ojeda J, Karduss A, Cantú-Rodríguez OG, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with non-myeloablative conditioning in patients with myeloid leukemias: Results of a prospective study of the Latin American Cooperative Onco Hematology Group (LACOHG). *Blood*. 2004; 104 Suppl 1: 373b.

31. Jacobson DA, Duerst R, Tse VV, Kletzel M. Reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation for treatment of non-malignant diseases in children. *Lancet*. 2004; 364: 156-62.

32. Svemnilson J, Ringden O. Is it time to reduce toxicity by non-myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation in children? *Pediatr Transplant*. 2000; 4: 300-4.