

Rev Biomed 1999; 10:129-136.

Historia de la Medicina

Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: apuntaciones sobre su historia.

Renán A. Góngora-Biachi, Pedro González-Martínez.

Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN.

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) fue descrita inicialmente por William Gull en 1866, en Londres Inglaterra y representa desde su descripción inicial un buen ejemplo de la evolución de los conceptos y conocimientos, en función del tiempo, en torno a una enfermedad. A William Gull le corresponde el mérito de haber descrito que el pigmento excretado en orina no correspondía a glóbulos rojos (GR). En 1882 Paul Strübing comunicó la siguiente descripción de la HPN. Strübing describió la asociación entre la hemoglobinuria y el ejercicio físico; propuso que la anomalía residía en los GR, que al circular por los riñones sufrían hemólisis. y describió la asociación entre la administración de hierro y la crisis de hemólisis. El nombre de HPN fue establecido en 1928 por Enneking. En 1911, Hijmans-van den Bergh demostró que la acidificación de sueros normales o de pacientes con HPN, inducía lisis en los GR de pacientes con HPN. Sin embargo

fueron las observaciones de Thomas Hale Ham en 1937, que le permitieron proponer que el defecto de los GR en la HPN consistía en una mayor susceptibilidad a la lisis por el complemento (C'). Pangburn y col. y el grupo de Nicholson-Weller en 1983, describieron que en la HPN existe disminución cuantitativa del factor que acelera la degradación de las convertasas del C' fijadas a la membrana (DAF = "*decay accelerating factor*", o CD55). En 1987 y 1988, Zalman y col. y Blaas y cols., respectivamente, describen la deficiencia en estas células de la proteína fijadora del C8 (C8bp) o factor homólogo de restricción (HRF). En 1989 Holguin y col. demostraron que los GR-HPN III eran defectuosos en la proteína reguladora de la fracción C5-9, el inhibidor de membrana de la lisis reactiva o CD59. En 1992, Mahoney y col. y Hirose y su grupo demostraron que en la HPN la síntesis del glucosilfosfatidil inositol (PIG) era defectuosa, lo que en su turno impedía se anclaran las proteínas antes descritas. Estudios realizados

Solicitud de sobretiros: M.C. Renán A. Góngora-Biachi, Avenida Itzáes N° 490 x 59, C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México.

Correo electrónico: gbiachi@tunku.uady.mx

Recibido el 24/Febrero/1999. Aceptado para publicación el 1/Marzo/1999. Checar fecha

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991027.html>

Vol. 10/No. 2/Abril-Junio, 1999

RA Góngora-Biachi, P González-Martínez.

por Takeda y col., en la Universidad de Osaka Japón, y publicados en 1993 permitieron clonar el gen del PIG (gen PIG-A) e identificaron en la HPN una mutación somática que ocasionaba la pérdida de la función del gen PIG-A. 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.

(Rev Biomed 1999; 10:129-136)

Palabras clave: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, CD55, CD59, DAF, HRF, glucosilfosfatidil inositol, gen PIG-A, Anemia Aplástica.

SUMMARY.

Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria: notes on its history.

Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH) was first described by William Gull in London, England, 1866 and since that first description, it represents a good example of the concepts and knowledge of a disease through time. William Gull is given the merit of having described the pigment excreted in the urine didn't correspond to the red blood cells. In 1882, Paul Strubing published the following description of PNH. He showed the association between haemoglobinuria and physical exercise, he proposed that the abnormality resided in the red blood cells, which on circulating through the kidneys, suffered haemolysis. He was the first person to describe the association between the administration of iron and the haemolysis crisis, and he interpreted this phenomenon as secondary to the production of new abnormal cells. The name of PNH was established by Enneking in 1928. In 1911 Hijmans-van den Bergh demonstrated of normal serum, or of patients with PNH, induced lysis in the red blood cells at patients with PNH. However, it was Thomas Hale Ham, in 1937, who proposed that the defect of the red blood cells in the PNH consisted in a greater

susceptibility to the lysis by the complement (C'). In 1983, Pangburn and col. and the Nicholson-Weller group described a quantitative decrease of the factor that accelerates the degradation of the convertasas of the C' fixed in the membrane (DAF = "decay accelerating factor", or CD55) in PNH.

In 1987 and 1988 Zalman and cols. (19) and Blaas and cols. (20) respectively described the deficiency of the C8 (C8bp) fixing protein in these cells or homologous restriction factor (HRF). In 1989, Holguin and cols. demonstrated the red blood cell-NPH III to be defective in the regulating protein of the C5-9 fraction, the reactive lysis membrane inhibitor or CD59. In 1992, Mahoney and cols. and Hirose and his group demonstrated that in NPH, the synthesis of the glycosyl phosphatidylinositol (PIG) was defective which in turn, prevented the anchoring of the aforementioned proteins. Studies carried out by Takeda and cols., in the University of Osaka, Japan, published in 1993, on cloning the gene of the PIG (gene PIG-A) identified a somatic mutation which caused the loss of the function of the gene PIG-A. Actually it is postulated that the PNH clone emerges in defense to some external or internal factor which inhibits the normal haemotopoyesis, but it is incapable of inhibiting the haemotopoyetic cells which are deficient in the proteins anchored in the PIG. *(Rev Biomed 1999; 10:129-136)*

Key words: Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria, CD55, CD59, DAF, HRF, glycosyl phosphatidylinositol, gen PIG-A, aplastic anaemia.

INTRODUCCIÓN.

La Hemoglobinuria Paroxística Nocturna (HPN) es un padecimiento adquirido de las células sanguíneas, en donde las células afectadas derivan de células pluripotenciales hematopoyéticas anormales (1). Clínicamente la enfermedad se expresa por uno o varios de los siguientes hechos: hemoglobinuria, hemólisis intravascular, anemia aplástica, citopenias periféricas con médulas óseas celulares y trombosis (2).

Historia de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

La HPN fue descrita originalmente en 1866 y representa desde su descripción inicial un buen ejemplo de la evolución de los conceptos y conocimientos, en función del tiempo, en torno a una enfermedad. En estas anotaciones describimos la historia evolutiva de los conceptos y conocimientos en torno a la HPN.

LAS PRIMERAS DESCRIPCIONES Y NOMENCLATURA.

La HPN fue descrita inicialmente por William Gull en 1866, en Londres Inglaterra (3). Su reporte de caso describe un paciente adulto, hombre, que presentaba orina hiperocrómica tipo hematuria y que se asociaba en varias ocasiones a procesos infecciosos. A William Gull le corresponde el mérito de haber descrito que el pigmento excretado en orina no correspondía a glóbulos rojos (GR). En 1882 Paul Strübing comunicó la siguiente descripción de la HPN (4). Sus observaciones clínicas fueron tan precisas que los conceptos emanados de ellas son válidos hasta nuestros tiempos. Strübing describió la asociación entre la hemoglobinuria y el ejercicio físico; propuso que la anormalidad residía en los GR, que al circular por los riñones sufrían hemólisis. Fue el primero en describir la asociación entre la administración de hierro y la crisis de hemólisis, e interpretó este fenómeno como secundario a la producción de nuevas células anormales, ¡explicación racionalmente aceptada en 1999!

Aunque no existieron méritos mayores en la descripción de la HPN en los trabajos de Marchiafava y Micheli en 1911 y 1931, sus nombres han sido utilizados como epónimo de esta enfermedad. Por justicia académica el epónimo que le corresponde a la HPN es el de "*Enfermedad de Gull-Strübing*".

El nombre de la enfermedad en sí, Hemoglobinuria Paroxística Nocturna, es controvertido en cuanto a la definición que implica. Es decir, el nombre parece equivocado ya que la hemoglobinuria habitualmente no es nocturna y sólo es uno de los signos asociados a la HPN. Por

otro lado, el nombre de HPN no define otras manifestaciones diferentes a la hemoglobinuria macroscópica, que común y frecuentemente forman parte de la enfermedad. Es lógico proponer que la HPN no deba ser considerada exclusivamente como una anemia hemolítica, ya que la hemólisis es sólo un evento asociado a la enfermedad. El nombre de HPN fue establecido en 1928 por Enneking (5) y a pesar que esta nomenclatura en la actualidad no es representativa de la enfermedad, es el nombre que aún se utiliza en la literatura mundial.

DEFECTOS CELULARES EN LA HPN.

En 1911, Hijmans-van den Bergh demostró que la acidificación con dióxido carbónico de sueros normales o de pacientes con HPN, inducía lisis en los GR de pacientes con HPN (7). Sin embargo fueron las observaciones de Thomas Hale Ham en 1937, que le permitieron proponer que el defecto de los GR en la HPN consistía en una mayor susceptibilidad a la lisis por el complemento (C') (7) e iniciaron una época de estudios sobre esta enfermedad y el sistema de C', de los que han emanado un caudal de conocimientos progresivos en los últimos 60 años. Ham diseñó y promovió el uso de una sencilla prueba hemolítica para diagnóstico de la HPN, en la que GR afectados eran lisados en presencia de suero fresco normal, ABO-compatibles, ajustado a un pH 6.4 (8). Ham notó que con esta prueba no todos los GR eran destruidos y así surgió la idea de que existía una población de GR sensibles al suero y otra normal. Ham demostró también que el suero de los pacientes con HPN era normal y que -como había sospechado Strübing 55 años antes- el defecto de la HPN era intrínseco a los GR. El desarrollo de la prueba del suero acidificado también permitió al Dr. Ham identificar al C' como el factor del suero como el responsable de la inducción de la hemólisis, aunque no pudo definir la naturaleza del defecto de los GR (8).

Los trabajos de Dacie en 1949 (9) demostraron que en las células no lisadas en la prueba

de suero acidificado, al volverlas a exponer a éste, no ocurría mayor magnitud de hemólisis. Estos hechos le permitieron proponer que en la HPN existían al menos dos poblaciones celulares de GR, una con resistencia normal a la lisis por el C' y la otra con características típicas de HPN. Con el desarrollo de una técnica que medía la sensibilidad a la lisis por el C' mediada por un anticuerpo anti I, Dacie y Rosse en 1966 (10) logran identificar correctamente la presencia de estos dos grupos celulares. En 1974, Rosse y su grupo demuestran la existencia de tres clases de GR-HPN diferentemente susceptibles al C' (11). Así, estos autores demostraron que los GR-HPN I son similares a los normales. Los GR-HPN II son de 3 a 5 veces más sensibles a la lisis por el C' y los GR-HPN III lo son de 15 a 25 veces más (11). En 1979, Packman y su grupo demostraron que los GR-HPN III eran más susceptibles a la fracción lítica del C' C5b-9 (12), condición que explicaba el porqué diferentes sensibilidades de las poblaciones de GR-HPN.

Otros de los eventos relevantes en el diagnóstico de la HPN fue el desarrollo de otras pruebas de hemólisis capaces de identificar GR-HPN. Así, en 1966 Hartman y Jenkins publican la técnica de sucrosa (13) y en 1975 Brubaker y col. proponen la prueba de inulina como un método diagnóstico (14). En 1984, demostramos que la proporción de GR-HPN varía de sujeto a sujeto y aún en el mismo paciente en el transcurso de la enfermedad y que de estas variaciones celulares dependían los resultados de los sistemas de hemólisis (prueba de Ham, de sucrosa e inulina) (15).

LA IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS DEL COMPLEMENTO.

Uno de los conceptos más relevantes en relación a la HPN, es sin duda la identificación de dos proteínas en la membrana de los GR normales que regulan la actividad de la fracción C3b fijada a la misma (15) descritas por Pangburn y col. en 1983 (16). Estas proteínas, que otorgan una actividad

biológica similar al factor H en el suero, han sido identificadas como el receptor de C3b (CR1) y el factor que acelera la degradación de las convertasas del C' fijadas a la membrana (DAF = "*decay accelerating factor*", o *CD55*). Pangburn y col. describieron en 1983, que la fracción C3b en los GR-HPN era 100 veces menos susceptible a la inactivación por el factor I del sistema del C' y por otra parte la "supervivencia" del factor C3b fue 3 veces mayor en los GR-HPN que en los normales y fue similar a la observada en la asociación de C3b con complejos enzimáticos que no poseían la actividad inhibitoria del factor H. Sus observaciones han permitido a estos autores proponer que la susceptibilidad anormal a la lisis por C' en la HPN pudiera deberse a una deficiencia funcional en una o más proteínas con actividad similar al factor H en los GR-HPN. Estos conceptos han sido avalados por investigadores subsecuentes de este mismo grupo y del grupo de Nicholson-Weller en ese mismo año (17). Estos autores describieron que en la HPN existe disminución cuantitativa del DAF. Esta disminución es relativa en los GR-HPN II, mientras que en los GR-HPN III, la deficiencia es total. *In vitro*, la deficiencia del DAF fue detectada en las células derivadas de la unidad formadora de brotes critroides (UFB-E) por More y su grupo en 1985 (18).

Las alteraciones en la regulación de la actividad del C' comentadas previamente, no explicaban la mayor susceptibilidad a la lisis por la fracción C5-9 que presentan los GR-HPN III (12). En 1987 y 1988, Zalman y col. (19) y Blaas y cols. (20), respectivamente, describen la deficiencia en estas células de la proteína fijadora del C8 (C8bp) o *factor homólogo de restricción* (HRF). En 1989 Holguin y col. demostraron que los GR-HPN III eran defectuosos en la proteína reguladora de la fracción C5-9, el *inhibidor de membrana de la lisis reactiva* o *CD59*. En los GR-HPN II la actividad del CD59 y del HRF es parcialmente deficiente.

Historia de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

EL GLUCOSILFOSFATIDIL INOSITOL Y LA HPN.

La deficiencia de la acetilcolinesterasa reportada en los GR-HPN, y que no se ha relacionado como factor causante de la hemólisis (22), fue identificada tempranamente como una expresión más del defecto de membrana de los GR-HPN. La identificación de otras proteínas con expresión deficiente en estos GR (antígeno 3 relacionado con la función linfocitaria, el CD14 (proteína fijadora y receptora de endotoxina, CD24 (activador de células B) y el receptor IIIa del FC, entre otras) sugerirían que el defecto debería estar en un origen común. El detalle común de estas proteínas radica en que todas ellas se encuentran ancladas a la superficie de las células a través de una estructura de glucosilfosfatidil inositol (PIG).

En 1992, Mahoney y col. (23) y Hirose y su grupo (24) demostraron que en la HPN la síntesis del PIG era defectuosa, lo que en su turno impedía se anclaran las proteínas antes descritas. Estas observaciones otorgaron por vez primera el conocimiento del trastorno molecular de la HPN. Estudios realizados por Takeda y col., en la Universidad de Osaka Japón, y publicados en 1993 (25), demostraron que las líneas celulares de dos pacientes con HPN y líneas celulares mutantes deficientes en PIG tenían el mismo gen defectuoso. Este mismo grupo de investigadores logró clonar este gen en 1993 y lo denominó gen PIG-A (por la clase A de fosfatidilinositolglican) e identificaron el DNA complementario y encontraron que éste participaba en la síntesis del primer compuesto intermedio del PIG (26). Asimismo Takeda y su grupo pudieron demostrar que el DNA complementario del gen PIG-A corregía el fenotipo defectuoso de las células HPN e identificaron una mutación somática que ocasionaba la pérdida de la función del gen PIG-A (27). La localización de este gen ha sido ubicado por este grupo en la porción p22.1 del cromosoma X, lo que lo define como un gen haploide en las células somáticas de hombres, así como de las mujeres por el fenómeno de la

inactivación del cromosoma X (27). Se han descrito que las mutaciones del gen PIG-A en pacientes con HPN y de diferentes grupos étnicos son similares. (28-30). Para identificar estas mutaciones son necesarias técnicas de biología molecular, ya que como hemos demostrado en 1993, los estudios de cariotipo son normales en los pacientes con HPN (31).

LA HPN: ¿ENFERMEDAD PRIMARIA O SECUNDARIA?

Uno de los conceptos que han emergido en esta década es considerar que si la HPN es una enfermedad primaria o secundaria al daño de la médula ósea. Los trabajos de Luzato y cols. sugieren 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 (29). La evidencia mostrada por Herstenstein y su grupo en 1995 en dos pacientes con linfoma de células B tratadas con anticuerpos monoclonales anti CD52 y que desarrollaron clonas de células T deficientes en CD52, CD59 y CD48 secundarias a la mutación del PIG-A, apoyan este concepto (32). La identificación de células deficientes en las proteínas ancladas al PIG en pacientes con anemia aplásica (AA) y sin cuadros clínicos de hemólisis reportados por Ruiz-Argüelles y cols (33) también apoyan este concepto.

LOS PATRONES CLINICOS EN LA HPN.

La asociación de la HPN con la AA es un hecho reconocido desde hace más de 20 años (34). Un trabajo clásico de Kruatrachue y cols de Tailandia, publicado en 1978 demostró que la coincidencia de AA y HPN era más frecuente que en Europa y se presentaba a edades más jóvenes (35). Los estudios realizados en pacientes mexicanos (36) nos ha permitido clasificar la enfermedad en cuatro grupos clínicos (aplásico, milodisplásico, hemolítico y trombótico), demostrando que el aplásico es el más frecuente en esta población. Así mismo nos ha permitido proponer que existe al menos dos patrones de expresión de la HPN: “el

RA Góngora-Biachi, P González-Martínez.

asiático” y el “caucásico”. Así la HPN parece ser más frecuente en poblaciones asiáticas (35, 37) y que se presenta asociada frecuentemente a la AA y con poca frecuencia de fenómenos trombóticos. De hecho para la república mexicana hemos estimado un caso por 100,000 habitantes/año a diferencia de lo reportado en Europa de un caso por 500,000 habitantes/año (38).

Aunque se consideró por mucho tiempo la enfermedad como un padecimiento de adultos, la primera serie pediátrica fue publicada por nuestro grupo en 1987 (39) y recientemente hemos demostrado que en los servicios de Hematología que atienden niños y adultos la HPN se presenta en edad pediátrica con una frecuencia del 18% y que su pronóstico es peor que en los adultos, dependiendo principalmente de hemorragias por trombocitopenia (40).

PERSPECTIVAS.

El futuro de la HPN, con base a su historia, se encamirá en el siguiente milenio a la búsqueda de tratamientos basados en el conocimiento de la inmunopatogénesis molecular. Así, es muy probable que la terapia génica sea un arma de interés en la HPN. Otro aspecto futurista es el hecho de la “modulación del fenómeno HPN”, considerando la evidencia de que la HPN es un padecimiento secundario. El uso del trasplante de MO y la posibilidad de remisión del padecimiento es un hecho que fue demostrado, basado en la expresión normal de las proteínas ancladas en el PIG en 1992 (41).

REFERENCIAS.

1.- Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Semin Hematol* 1989;26:201-207.

2.- Góngora-Biachi RA, López-Borrasca A. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. En López-Borrasca A, ed. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología: 1ª edición*. Salamanca: Ediciones Universal; 1992. vol. I. p. 327-33.

3.- Gull WW. A case of intermittent haematuria. *Guys Hosp Rep* 1866; 13:381-92.

4.- Strübin P. Paroxysmal haemoglobinurie. *Dtsch Med Wochenschr* 1882; 8:1-17.

5.- Rosse WF. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. Present status and future prospects. *West J Med* 1980; 132:219-28.

6.- Hijmans van den Bergh AA. Ictère hémolytique avec crises hemogloburiques. Fragilité globulaire. *Revue de Médecine (Paris)* 1991;31:63-9.

7.- Ham TH, Dingle JH. studies on destruction of red blood cells . II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest* 1939; 18:657-72.

8.- Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. *N Engl J Med* 1937; 217:915-7.

9.- Dacie JV. Diagnosis and mechanism of hemolysis in chronic hemolytic anemia with nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1949; 4:1183-95.

10.- Rosse WF, Dacie JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. Y. The sensitivity of PNH red blood cells to lysis complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966; 45:736-48.

11.- Rosse WF, Adams JP, Thorpe AM. The population of cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis: significance and mechanism of increased immune lysis. *Br J haematol* 1974; 28:181-90.

12.- Packman ChH, Rosendfeld DI, Jenkins DE, Thiem PA, Leddy J. Complement lysis of human erythrocytes. Differing susceptibility of two types of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to C5b-9. *J Clin Invest* 1979; 64:428-33.

13.- Hartman RC, Jenkins DE. The sugar-water test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1966; 275:155-7.

Historia de la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna.

- 14.- Brubaker LH, Schaberg DR, Jefferson DH, Mengel C. A potencial screening test for PNH. *N Engl J Med* 1975;268:1059
- 15.- Góngora-Biachi RA, Khoury-Mancebo L, Dillman E, Hurtado-Monroy R, González-Llaven J. Relación entre los sistemas de hemólisis y las variaciones celulares en la Hemoglobinuria Paroxística Nocturna. *Sangre* 1984; 29:384-90.
- 16.- Pangburn MK, Schreiber RA, Müller-Eberhard HJ. Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:5430-4.
- 17.- Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfel SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein decay accelerating factor. *Proc natl Acad Sci USA* 1983; 80:5066-70.
- 18.- Moore JG, Frank MM, Müller-Eberhard HJ, Young NS. Decay-accelerating factor is present on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythroid progenitors and lost during erythropoiesis in vitro. *J Exp Med* 1985; 162:1182-92.
- 19.- Zalman LS, Wood LM, Frank MM, Müller-Eberhard HJ. Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1987; 165:572-7.
- 20.- Blaas P, Berger B, Weber S, Peter HH, Hansch GM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Enhanced stimulation of platelets by the terminal complement components is related to the lack of C8bp in the membrane. *J Immunol* 1988; 140:3045-51.
- 21.- Holguin MH, Frederick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989;84:7-17.
- 22.- Góngora-Biachi RA, González-Martínez P. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: conceptos y controversias actuales. *Rev Clin Esp* 1987;180:438-43.
- 23.- Mahoney JF, Urakaze M, Halls S. Defective glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria granulocytes. *Blood* 1992; 79:1400-3.
- 24.- Hirose S, Ravi L, Prince GM. Synthesis of mannosylglucosaminylinositol phospholipids in normal but not paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6025-9.
- 25.- Takahashi M, Takeda J, Hirose S. Deficient biosynthesis of -acetyl-glucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1993; 177:517-21.
- 26.- Miyata T, Takeda J, Iida J, et al. The cloning the PIG-A, a component in the early step of GPI anchor synthesis. *Science* 1993;259:1318-20.
- 27.- Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Cell* 1993; 73:703-11.
- 28.- Yamada N, Miyata T, Maeda K, Kitani T, Takeda J. Somatic mutations of the PIG-A gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 85: 885-92.
- 29.- Bessler M, Mason P, Hillmen P, Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 1994;343:951-53.
- 30.- Pramoongjago P, Wanachiwanawin W, Chinprasertsak S, Pattanapanayasat K, Takeda J, Kinoshita T. Somatic mutations of PIG-A in Thai patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood* 1995;86:1736-9.
- 31.- Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Pinto-Escalante D, Ceballos-Quintal JM. Chromosomal findings in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 1993; 58: 163-7.
- 32.- Hertenstein B, Wagner B, Bunjes D, Duncker C, Raghavachar A, Arnold R. Emergence of CD52, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after in vivo application of Campath-1H for refractory B-cell non Hodgkin lymphoma. *Blood* 1995;86:1487-92.
- 33.- Ruiz-Argüelles GJ, Ramírez-Cisneros FJ, Ruiz-Argüelles A, Pérez-Romano B, Morales-Aceves R. Deficiencia de proteínas de superficie ancladas por glucosilfosfatidilinositol en células de pacientes mestizos mexicanos con hipoplasia medular. *Rev Invest Clin* 1999; 51:5-9.

RA Góngora-Biachi, P González-Martínez.

34.- Dacie JV. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Proc R Soc Med 1963;56: 87-96.

35.- Kruatrachue M, Wasi P, Nakorn N. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in Thailand with special reference to an association with aplasic anaemia. Br J Haematol 1978;39:267-76.

36.- Góngora-Biachi RA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: The mexican experience. Rev Invest Clin 1997; 49 (supl): 85-8.

37.- Fujioka S, Asai T. Prognostic features of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in Japan. Acta Haematol Jpn 1989;52:1386-94.

38.- Góngora-Biachi RA, Sosa-Muñoz J, Duarte-Zapata L, Pinto-Escalante D, González-Martínez P, Achach-Asaf J. Hemoglobinuria Paroxística Nocturna: Análisis de 36 casos. Sangre 1987;32:27-37.

39.- Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Aguilar-Ortega M, Achach-Asaf J, Lara-Perera D. Hemoglobinuria paroxística nocturna en edad pediátrica: observaciones en siete casos. Bol Med Hosp Infant Mex 1987; 44:222-9.

40.- Góngora- Biachi Ra, González-Martínez P, Sosa-Muñoz J, Castro-Sansores C, Delgado-Lamas JL, Vázquez-Villegas V, et al. Historia natural de hemoglobinuria paroxística nocturna en adolescentes, adultos y en la edad pediátrica; la experiencia mexicana. Sangre 1997; 42:171-7.

41.- Pérez-Oteyza J, Roldan E, Brieva JA, Cancelas JA, García-Iarana J, Odriozola J, et al. Expression of phosphatidylinositol anchored membrane proteins in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1992; 10:297-9.