UNIVERSIDAD **RICARDO PALMA**

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA DE RESIDENTADO MÉDICO Y ESPECIALIZACIÓN

Asociación entre el inmunofenotipo al diagnóstico y post inducción de la leucemia linfoblástica aguda b y riesgo de recaída en niños del Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja junio 2021 a junio 2022

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Para optar el Título de Especialista en Patología Clínica

AUTOR

Saldarriaga Lecaros, Claudia Alejandra

(0000-0001-5871-6341)

ASESOR

Aucca Vitorino Mabel

(0000-0001-7553-1883)

Lima, Perú

2022

Metadatos Complementarios

Datos de autor

Saldarriaga Lecaros, Claudia Alejandra

Tipo de documento de identidad del AUTOR: DNI

Número de documento de identidad del AUTOR: 45461907

Datos de asesor

Aucca Vitorino, Mabel

Tipo de documento de identidad del ASESOR: DNI

Número de documento de identidad del ASESOR: 40335557

Datos del Comité de la Especialidad

PRESIDENTE: Chunga Chunga Ausberto

DNI:08491003

ORCID: 0000-0003-1259-3299

SECRETARIO: Cruzado Villanueva Magda Yuliana

DNI:00514914

ORCID:0000-0003.1964-460X

VOCAL: Barbieri Grieve Rosanna Mirella

DNI:07210839

ORCID:0000-0002-8358-6654

Datos de la investigación

Campo del conocimiento OCDE: 3.00.00

Código del Programa: 912829

Índice

I.	**Planteamiento del problema**	1
1.1	Descripción de la realidad problemática	1
1.2	Formulación del problema	4
1.3	Objetivos	4
1.4	Justificación	4
1.5	Limitaciones	5
1.6	Viabilidad	6
II.	**Marco teórico**	6
2.1	Antecedentes de la investigación	6
2.2	Bases teóricas	7
2.3	Definiciones conceptuales	10
2.4	Hipótesis	11
III.	**Metodología**	12
3.1	Diseño	12
3.2	Población y muestra	12
3.3	Operacionalización de variables	14
3.4	Técnicas de recolección de datos. Instrumentos	17
3.5	Técnicas para el procesamiento de la información	17
3.6	Aspectos éticos	17
IV.	**Recursos y cronograma**	18
4.1	Recursos	18
4.2	Presupuesto	18
4.3	Cronograma	20
Referencias bibliográficas		21
Anexos		25

I. Planteamiento del problema

1.1 Descripción de la realidad problemática

Las leucemias agudas surgen de mutaciones de células progenitoras hematopoyéticas tempranas, que conducen a la acumulación descontrolada de células neoplásicas, estos son los blastos, que pierden la capacidad de diferenciación y maduración. Al analizar el perfil antigénico de los blastos, podemos representar su linaje celular de origen, si es mieloide, linfoide B, linfoide T o ambiguo y la etapa de diferenciación/madurez. La inmunofenotipificación de citometría de flujo multiparamétrica permite realizar la caracterización de estos blastos[1].

La leucemia linfoblástica aguda es la neoplasia más común en la infancia, el 80 a 85% son de fenotipo B. Es más frecuente en niños de 2 a 9 años, siendo la tasa de curación de 80%. Entre los predictores de pronóstico están la edad al diagnóstico, el número de leucocitos, la presencia de afectación extramedular, cariotipo, alteraciones moleculares y enfermedad mínima residual, este último es un predictor de pronóstico confiable[2].

La evaluación morfológica de la médula ósea no es suficiente para identificar a los pacientes que tienen más probabilidades de recaer, ya que la gran mayoría de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda logran la remisión con regímenes de quimioterapia estándar, sin embargo, muchos de estos pacientes finalmente recaen. En comparación con la evaluación morfológica sola, la detección de enfermedad mínima residual es capaz de estimar la reducción de la carga de la enfermedad después del tratamiento. Esta información se puede utilizar para estratificar el riesgo de los pacientes de acuerdo con la respuesta al tratamiento y se ha demostrado en una serie de estudios que es el marcador pronóstico más poderoso en la leucemia linfoblástica aguda[3].

Se define a la enfermedad mínima residual como a la presencia de células neoplásicas que no pueden ser detectadas por su morfología. La citometría de flujo multiparamétrica detecta la enfermedad mínima residual, siendo una

técnica muy sensible. Evaluar la enfermedad mínima residual post tratamiento quimioterápico de inducción, es parte de la evaluación diaria en niños y adultos, además, es útil para predecir el riesgo de recaída y/o duración de la quimioterapia. Para detectar la enfermedad mínima residual por citometría de flujo multiparamétrica se usan paneles de anticuerpos presentes en el inmunofenotipo encontrados al diagnóstico, este inmunofenotipo puede permanecer o perderse después de la quimioterapia[4].

Analizar la enfermedad mínima residual sirve para monitorizar el estado de la enfermedad en medio del tratamiento. Se puede obtener el inmunofenotipo de los blastos que son residuales y la expresión de antígenos que puede estar alterada, estos antígenos pueden estar regulados hacia arriba o abajo durante el tratamiento quimioterápico. Los blastos residuales pueden tener cambios fenotípicos explicados por evolución clonal. El cambio del inmunofenotipo en los blastos post inicio de quimioterapia puede deberse a subclones que han cambiado el antígeno que expresan[5].

La probabilidad de recaer se mide con los niveles de enfermedad mínima residual en distintos momentos, antes, durante y después del tratamiento quimioterápico, a través de los aspirados de médula ósea programados. El valor de corte de enfermedad mínima residual es 0.01% de células, lo que se interpreta, como 1 célula de enfermedad mínima residual en 10 000 células mononucleares de la médula ósea, este límite se basa en los límites de detección de citómetros de flujo de 4 colores. Este nivel de corte, tiene importancia clínica, si el paciente tiene ≥0,01 % de células de enfermedad mínima residual en la muestra significa que tiene más riesgo de recaer[6]. Mientras mayor sea la enfermedad mínima residual al final de la inducción quimioterápica se incrementa el riesgo de recaída y disminuye la supervivencia[7].

La medición de la enfermedad mínima residual permite tomar decisiones en la terapia, en el periodo de inducción que son los primeros 30 días de tratamiento, permite intensificar el tratamiento ante una mala respuesta. En los pacientes con enfermedad mínima residual ≤0,01% al término de la quimioterapia de inducción, puede evaluarse la terapia para prevenir secuelas por el tratamiento.

Entonces, la enfermedad mínima residual permite evaluar decisiones de tratamiento ya sea en la reducción o intensificación de la quimioterapia[8]. Además, al identificar a pacientes con enfermedad mínima residual que tienen mayor riesgo de recaída, es posible que podamos diseñar mejores terapias racionales posteriores a la remisión utilizando agentes novedosos, incluso en pacientes con enfermedad recidivante o refractaria[3].

Evaluar la enfermedad mínima residual post inducción permite valorar la tasa de supervivencia, al respecto Angiolillo Anne et al, en el artículo "Excelentes resultados con frecuencia reducida de pulsos de vincristina y dexametasona en la leucemia linfoblástica B de riesgo estándar: resultados del grupo de oncología infantil AALL0932" en Estados Unidos, encontraron que la supervivencia libre de eventos a cinco años y la supervivencia general para todos los pacientes elegibles y evaluables con leucemia linfoblástica B (n = 9226), fueron del 92,0 % (91,1 % y 92,8 %) y 96,8% (96,2% y 97,3%), respectivamente[9]. A diferencia de lo encontrado en nuestro país por Castro Arechaga, Stephanie et al en el estudio "Sobrevida global libre de enfermedad en una cohorte peruana de pacientes con leucemia linfoblástica aguda" halló una tasa de mortalidad de 32,5 % y una tasa de recaída de 66,1 %. Uno de los factores asociados a menor sobrevida global fue estirpe distinta a B, entre otros[10].

En el mundo, los métodos utilizados para la evaluación de la enfermedad mínima residual son la citometría de flujo multiparamétrica, métodos moleculares como el RT-PCR y la secuenciación de próxima generación[11-12].
A pesar de los avances tecnológicos en el desarrollo de pruebas para valorar el riesgo de la LLA-B la citometría de flujo multiparamétrica con 8 marcadores o más y una adquisición de más de 5 millones de eventos, es comparable en sensibilidad y especificidad a métodos moleculares. A pesar de su limitación por la complejidad del análisis y la variación de la interpretación de los resultados, lo que resalta su uso continuo es ser una prueba accesible, rápida y rentable[13]. Sobre todo, en países como el nuestro dónde la citometría de flujo es vital para tomar decisiones terapéuticas.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es la asociación del inmunofenotipo de la LLA B al diagnóstico y post quimioterapia de inducción con la recaída en pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda B del Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja de junio 2021 a junio 2022?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Identificar la asociación del inmunofenotipo de la LLA B al diagnóstico y post terapia de inducción con la recaída en pacientes con diagnóstico de LLA B en el Servicio de Citometría en el Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja en el periodo junio 2021 a junio 2022.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar por citometría de flujo multiparamétrica el inmunofenotipo al momento del diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda B.
2. Identificar la enfermedad mínima residual post quimioterapia de inducción.
3. Comparar el inmunofenotipo del diagnóstico con la enfermedad mínima residual post quimioterapia de inducción.
4. Identificar la asociación entre el inmunofenotipo al diagnóstico y la presencia de enfermedad mínima residual.
5. Describir los factores asociados a la presencia o positividad de enfermedad mínima residual.

1.4 Justificación

La enfermedad mínima residual es el predictor de resultado más importante de la leucemia linfoblástica aguda, permite estratificar a los pacientes según riesgo de recaída. En los pacientes que tienen probabilidad baja de recaída evita un

tratamiento excesivo, importante en población infantil, evita exponerlos a ciertos efectos adversos de la quimioterapia[14].

Estratificar el riesgo ha mejorado notablemente los resultados del tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en la infancia. La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es de 76 a 86% para niños que reciben tratamiento basado en protocolos. En la LLA la recaída está asociada a baja supervivencia, éste depende del inmunofenotipo, el momento y el lugar o sitio de recaída[15].

No existen estudios en nuestro país que permitan conocer el rol del inmunofenotipo como valor pronóstico o como factor de riesgo de recaída. El presente estudio profundizará el análisis al diferenciar los marcadores antigénicos al debut del diagnóstico y post quimioterapia, para así entregar a los profesionales implicados en el cuidado de pacientes con leucemia linfoblástica aguda B nuevas alternativas que optimicen el manejo. Además, evaluar la enfermedad mínima residual sirve en la toma de decisiones terapéuticas, también sirve previa al trasplante de médula ósea para determinar el momento para realizarlo[16].

1.5 Limitaciones

Dentro de las limitaciones encontradas en la realización de este proyecto nos encontramos con la poca información previa y actual, referida al tema, en nuestro país. Esto a la vez significa una oportunidad para identificar esta brecha y continuar investigando del tema.

Otra limitación, es el tiempo estimado que va a requerir la recolección de datos, ya que hay que revisar las historias clínicas de cada paciente, exámenes de laboratorio y el análisis de los tubos por citometría que fueron archivados.

La falta de datos en las historias clínicas es un aspecto que puede limitar el alcance del análisis, reducir el tamaño de la muestra, o puede ser un obstáculo para encontrar una relación significativa.

1.6 Viabilidad

El Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja autoriza la investigación y cuenta con el apoyo de especialistas en citometría, además cuenta con los recursos para desarrollarla. Se accederá a las historias clínicas electrónicas y base de datos del servicio de citometría de la institución.

II. Marco teórico

2.1 Antecedentes de la investigación

Theunissen, Prisca et al publicó en el artículo "Citometría de flujo estandarizada para mediciones de enfermedad mínima residual altamente sensibles en la leucemia linfoblástica aguda de células B", realizó el diseñó paso a paso un panel de anticuerpos EuroFlow de 8 colores totalmente estandarizado (CD19, CD45, CD34, CD10 y CD20CD66c (80 % de los casos), CD9 (63 %) y CD123 (55 %) y un procedimiento de laboratorio para medir la enfermedad residual mínima en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B con una sensibilidad de $\leq 10^5$, comparable a la detección de enfermedad mínima residual basada en reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real a través de reordenamientos de antígeno-receptor[11].

Donald A. Berry et al publicó en su artículo "Asociación de la enfermedad residual mínima con el resultado clínico en la leucemia linfoblástica aguda pediátrica y del adulto. Un meta-análisis" que, los pacientes pediátricos con enfermedad mínima residual negativa tenían muchas más probabilidades de estar libres de enfermedad después de 10 años que los que tenían enfermedad mínima residual positiva, 77 % frente a 32 %, y vivos, 84 % frente a 55 %[14].

Del Principe, Maria Ilaria et al, publicó, en su estudio "Aplicaciones y eficiencia de la citometría de flujo para el diagnóstico de leucemia". La citometría de flujo proporciona información pronóstica porque algunos fenotipos están asociados a anomalías genéticas que afectan el resultado clínico. La traslocación (9;22)(q34;q11) BCR/ABL1, el cromosoma Filadelfia, Ph, tiene antígenos

asociados, los más conocidos son CD25, CD34, CD10, CD66c, mientras que CD38 se expresa débilmente. Por lo general, en BCP-ALL Ph-positivo, también se pueden expresar antígenos mieloides como CD33 y CD13. La traslocación (12;21)(p13;q22)ETV6/RUNX1es una translocación asociada con un resultado favorable, frecuente en pacientes pediátricos. El perfil de citometría de flujo más común asociado con esta anomalía es una positividad de CD10, CD33, CD13, CD11b y ausencia de CD20, CD34 e IgM citoplasmática[17].

Liu Zhiyu et al en su estudio "Supervisión de la enfermedad residual mínima medible en la leucemia linfoblástica aguda de células B mediante citometría de flujo durante la terapia dirigida" menciona, los anticuerpos monoclonales para B-ALL se dirigen principalmente a CD19, CD20 o CD22. Estos marcadores de superficie celular se han incorporado de forma rutinaria en la detección de citometría de flujo en linfoblastos y, mientras tanto, son adecuados para servir como dianas para la terapia con anticuerpos monoclonales[18].

Campana, Dario et al en "Tratamiento guiado por la enfermedad residual mínima en la leucemia linfoblástica aguda infantil" encontró que en pacientes con infantil que tienen niveles altos de enfermedad mínima residual (≥1 %) al final de la terapia de inducción y la enfermedad mínima residual persistente después del tratamiento de consolidación subsiguiente son considerados en muy alto riesgo de recaída y deben ser propuestos para trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas precedido por tratamientos de reducción de leucemia con protocolos tradicionales o con inmunoterapia. Por el contrario, los pacientes con características de alto riesgo en la presentación se pueden curar con quimioterapia sola si logran la negatividad de la enfermedad mínima residual (<0,01%) al final de la terapia de inducción o consolidación de la remisión, con excepciones[19].

2.2 Bases teóricas

La citometría de flujo multiparamétrica es una técnica que se basa en evaluar características celulares específicas, incluyen el tamaño celular y la complejidad o granularidad citoplasmática, y características inmunológicas a través de la

medición de varios antígenos de membrana o intracelulares mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos. El procedimiento consiste en la adquisición de muestras en el que se genera un fluido envolvente compuesto por células individuales que pasan por un punto donde se cruzan varios haces de luz con múltiples láseres. Estos haces de luz inciden en el fluido envolvente y el fluoróforo que está conjugado con anticuerpos, determinando un estado de excitación y provocando una emisión de energía liberada como un fotón de luz con propiedades espectrales específicas, exclusivas de diferentes fluorocromos. La luz dispersa es capturada por detectores de dispersión frontal y lateral, proporcionan la información sobre el tamaño celular y la complejidad interna, propiedades físicas que permiten identificar poblaciones celulares. Los fluorocromos conjugados con anticuerpos emiten una longitud de onda específica y tienen múltiples detectores que reciben las señales de longitud de onda específica. Después estas señales adquiridas se amplifican para su análisis y se muestran en una pantalla, en forma de histograma que permite analizar a la población celular[17].

Esta técnica permite el diagnóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas. Es un método rápido, su cuantificación directa permite el seguimiento del tratamiento y permite detectar fenotipos anormales[20].

Si bien la citometría de flujo en muestras de médula ósea es el estándar para conocer el inmunofenotipo de la leucemia linfoblástica aguda, las muestras de sangre periférica analizadas por citometría de flujo, son menos invasivas para identificar le inmunofenotipo de la leucemia y hacen más fácil y rápido el diagnóstico. Existen estudios que respaldan el desempeño y equivalencia de las muestras de sangre periférica para el inmunofenotipo de la leucemia al diagnóstico[21].

El análisis de la enfermedad mínima residual requiere un proceso estandarizado, la adquisición y correcta manipulación de las muestras. En la adquisición de muestras se evita el arrastre adquiriendo un tubo que contenga líquido envolvente antes de las muestras[24].

La configuración del instrumento y validez de los reactivos son necesarios para garantizar el análisis de datos, Las muestras serán de sangre periférica y médula ósea con EDTA, min 2mL y máximo 5 mL el transporte de las muestras debe ser a temperatura ambiente y deben procesarse 24h de la recolección. Después la muestra se incuba con los anticuerpos en la oscuridad y se lisan, se lavan y analizan en el citómetro. Para asegurar los resultados deben usarse controles de calidad internos y externos[20-24].

La leucemia linfoblástica aguda B se caracteriza por la presencia de expresión fuerte de CD19 unido a otros marcadores de células B, CD79a, CD22, CD10 o CD19 débil y otros dos marcadores B de expresión fuerte[25]. MFCI permite definir el grado de diferenciación de BCP-ALL, distinguiendo cuatro grupos BI pro B, B-II B común, B-III pre B y B-IV B maduro según la clasificación del *European Group for the Immunological Characterization of Leukemias* (EGIL)[26].

Las células pre B normales expresan antígenos que también se expresan en células pre B leucémicas, se pueden identificar antígenos en distintas etapas de la maduración de los linfoblastos que se identifican por la combinación de marcadores CD10, CD20, CD22, CD19, CD34, CD38, CD45 y CD58, estos patrones permiten el reconocimiento de fenotipos celulares en la enfermedad mínima residual[21].

Si comparamos las células B con la mínima residual, ésta muestra marcadores celulares distintos a lo largo del tiempo, las muestras que se toman en la fase de inducción, son confiables, se asemejan al fenotipo de diagnóstico. En caso de recaída, los fenotipos que son diferentes al del diagnóstico aún se puede detectar LLA a partir de los mismos progenitores o se pueden usar otros perfiles de LLA[22].

La expresión de antígenos en células leucémicas detectadas por citometría de flujo es diferente a las células normales, cambia la expresión del inmunofenotipo asociado a leucemia. El inmunofenotipo cambia durante la quimioterapia, para evaluar la enfermedad mínima residual es importante tener el inmunofenotipo del diagnóstico[23].

Con citometría de flujo multiparamétrica se pueden comparar los patrones de diferenciación y la maduración de las células leucémicas y células normales, es evaluar lo diferente de lo normal, esta estrategia mejora la sensibilidad, pero requiere conocimiento a profundidad de la expresión de antígenos y patrones normales de maduración de los progenitores hematopoyéticos[20].

Hay dos enfoques para la evaluación de la enfermedad mínima residual por citometría de flujo, el primero es detectar las aberraciones inmunofenotípicas al momento del diagnóstico y al evaluar la mínima residual para el seguimiento se toma como base este inmunofenotipo. Está limitado por que en la práctica un gran número de casos no cuentan con inmunofenotipo al diagnóstico[13].

El otro enfoque, el normal, se basa en la desviación que se observa en los blastos leucémicos del patrón de maduración normal de las células linfoides y a veces es la única opción para evaluar la enfermedad mínima residual sino contamos con el inmunofenotipo al diagnóstico[27].

Los expertos destacan la diferencia entre los enfoques para detectar la enfermedad mínima residual por citometría de flujo, consideran el inmunofenotipo asociado a leucemia es una versión simplificada del enfoque normal, que no tiene en cuenta los cambios posteriores a la quimioterapia[23].

Identificar el linaje de las células leucémicas es importante para evaluar el pronóstico de la enfermedad y para seleccionar el tratamiento actual y futuro. Una parte de pacientes con LLA muestra un inmunofenotipo asociado a la leucemia que varía de patrones comunes y debe conocerse para la evaluación adecuada de la efectividad de la terapia e identificación de recaídas[28].

2.3 Definiciones conceptuales

1. Leucemia Linfoblástica Aguda Tipo B

Es una neoplasia maligna hematológica derivada de progenitores linfoides B que proliferan en médula ósea y otros tejidos.

2. Citometría de flujo

Es una tecnología que proporciona el análisis multiparamétrico rápido de células individuales suspendidas en una solución. Usan láseres como fuentes de luz para producir señales que son leídas por fotodiodos o fotomultiplicadores. Estas señales se convierten en señales electrónicas que son analizadas por una computadora. Las poblaciones celulares se analizan en función de sus características fluorescentes o de dispersión de luz.

3. Inmunofenotipificación

Es una técnica que combina anticuerpos específicos con compuestos fluorescentes para medir la expresión de proteínas específicas en una población de células. La expresión de estas proteínas permite identificar y categorizar las células marcadas.

4. Enfermedad mínima residual

Se define como el enfoque, incluida la citogenética, la citometría de flujo, las técnicas basadas en PCR y los métodos de secuenciación, que detecta y cuantifica las células tumorales residuales más allá del nivel de sensibilidad de la citomorfología.

5. Recaída

La recaída se define como la reaparición de la enfermedad después de la consecución previa de remisión completa.

2.4 Hipótesis

Existe asociación entre el inmunofenotipo al diagnóstico y post inducción, y el riesgo de recaída de los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda B del servicio de Citometría del Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja.

III. Metodología

3.1 Diseño

El estudio es observacional analítico, retrospectivo, de tipo transversal, y cuantitativo, por cuanto se empleará estadística descriptiva e inferencial.

Se buscará la relación entre el inmunofenotipo al diagnóstico y el inmunofenotipo post quimioterapia de inducción en presencia de enfermedad mínima residual ≥0.01%. Además, se buscará la relación entre el inmunofenotipo al diagnóstico y otras variables, como son: leucocitos, neutrófilos, hemoglobina, plaquetas y translocaciones, lo que nos permitirá encontrar la relación de estos factores y riesgo de recaída.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Pacientes menores de 18 años con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda B que hayan recibido quimioterapia de inducción en el Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja en el periodo junio 2021 a junio 2022.

3.2.2 Muestra

La muestra se seleccionará con aplicación de la técnica censal, por la cual participarán todos los pacientes menores de 18 años con el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda B, que hayan recibido quimioterapia de inducción. Finalmente, se analizarán aquellas historias clínicas electrónicas con registro completo de datos.

Al ser un censo y no un muestreo, los resultados obtenidos serán representativos para la población y patología en estudio, y además se obtendrán resultados sobre los factores asociados al pronóstico para la población investigada.

3.2.3 Criterios de inclusión

1. Paciente menor de 18 años con diagnóstico de LLA B por citometría de flujo multiparamétrica que proviene de muestra de sangre periférica o médula ósea.
2. Paciente menor de 18 años con LLA B que cuente con citometría de flujo al diagnóstico y post inducción.
3. Paciente menor de 18 años con LLA B que haya completado quimioterapia de inducción.

3.2.4 Criterios de exclusión

1. Paciente menor de 18 años con diagnóstico de otro cáncer o de inmunodeficiencia primaria.
2. Paciente menor de 18 años con diagnóstico de LLA B que recibió quimioterapia o corticoides antes del estudio del inmunofenotipo.

3.3 Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE POR NATURALEZA	CATEGORÍA Y/O UNIDAD
Edad	Tiempo de vida desde el nacimiento	Número de años indicado en la historia clínica	Razón	Cuantitativa	Años
Sexo	Género orgánico	Género señalado en la historia clínica	Nominal	Cualitativa	0 = Femenino 1 = Masculino
Servicio de procedencia	Servicio del INSNSB donde se encontraba el paciente cuando realizaron la solicitud	Servicio donde se encontraba el paciente cuando realizaron la solicitud consignada en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Emergencia 1 = Hospitalización 2 = Consulta externa
Fecha de citometría al diagnóstico	Día, mes y año en el que se realizó la citometría	Día, mes y año en el que se realizó la citometría indicada en la historia clínica	Razón	Cuantitativa	Día/Mes/Año
Fecha de citometría post quimioterapia de inducción	Día, mes y año en el que se realizó la citometría post quimioterapia de inducción	Día, mes y año en el que se realizó la citometría post quimioterapia de inducción registrado en la historia clínica	Razón	Cuantitativa	Día/Mes/Año
Leucocitos ($10^3/mm^3$)	Número de glóbulos blancos en sangre por mm^3	Leucocitos en sangre por mm^3 consignados en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Leucocitosis >10000 1 = Normal 4000 a 10000 2 = Leucopenia <4000

Neutrófilos ($10^3/mm^3$)	Número de neutrófilos en sangre por mm^3	Número de neutrófilos en sangre por mm^3 consignado en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Normal > 1500 1 = Leve 1000 a 1500 2 = Moderado 500 a 1000 3 = Severo < 500
Hemoglobina (g/dL)	Proteína presente en los glóbulos rojos en sangre en g/dL	Hemoglobina en sangre en g/dL consignada en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Leve > 11 1 = Moderada 9 a 10 2 = Severa < 9
Plaquetas ($10^3/mm^3$)	Número de plaquetas en sangre por mm^3	Plaquetas $10^3/mm^3$ consignado en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Normal >150000 1 = Plaquetopenia leve <100000 2 = Plaquetopenia moderada<50000 3 =Plaquetopenia severa <20000
Translocación (9;22)(q34;q11) BCR/ABL1 Cromosoma Filadelfia Ph	Anormalidad cromosómica originada por una translocación entre los cromosomas 9 y 22	Anormalidad cromosómica originada por una translocación entre los cromosomas 9 y 22 registrada en la historia clínica	Nominal	Cualitativa	0 = Si 1 = No
Translocación (12;21)(q13;q22) ETV6/RUNX1	Anormalidad cromosómica originada por una translocación entre los cromosomas 12 y 21	Anormalidad cromosómica originada por una translocación entre los cromosomas 12 y 21 registrada en la historia clínica	Nominal	Cualitativa	0 = Si 1 = No
Inmunofenotipo al diagnóstico	Presencia de antígenos expresados en células malignas derivadas de progenitores linfoides B y anticuerpos aberrantes.	Presencia de anticuerpos expresados en células malignas derivadas de progenitores linfoides B y anticuerpos	Ordinal	Cualitativa	CyCD79a (0=Presente 1=Ausente) CD19 (0=Presente 1=Ausente) CD10 (0=Presente 1=Ausente) CD22 (0=Presente 1=Ausente) CD20 (0=Presente 1=Ausente) CyIgM (0=Presente 1=Ausente)

		aberrantes registrados en la historia clínica			CD45 (0=Presente 1=Ausente) CD34 (0=Presente 1=Ausente) CD38 (0=Presente 1=Ausente) HLA-DR (0=Presente 1=Ausente) Otros: CD13 (0=Presente 1=Ausente) CD33 (0=Presente 1=Ausente) CD15 (0=Presente 1=Ausente) CD123 (0=Presente 1=Ausente) CD66c (0=Presente 1=Ausente) Otros (0=Presente 1=Ausente)
Enfermedad mínima residual	Cuantificación las células tumorales residuales	Cuantificación las células tumorales residuales registrado en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Negativo <0.01% 1 = Positivo >0.01%
Recaída	Enfermedad mínima residual positiva al término de la quimioterapia de inducción	Enfermedad mínima residual positiva registrado en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	0 = Presente 1 = Ausente
Inmunofenotipo post quimioterapia de inducción	Antígenos presentes en las células tumorales residuales	Antígenos presentes en las células tumorales residuales registrados en la historia clínica	Ordinal	Cualitativa	CD45 (0=Presente 1=Ausente) CD34 (0=Presente 1=Ausente) CD19 (0=Presente 1=Ausente) CD10 (0=Presente 1=Ausente) CD38 (0=Presente 1=Ausente) CD81 (0=Presente 1=Ausente) Otros (0=Presente 1=Ausente)

3.4 Técnicas de recolección de datos. Instrumentos

La información recabada será documentada y registrada en un formulario diseñado por la autora para esta investigación. En este formulario se recabarán los datos de las historias clínicas electrónicas de los pacientes, se recolectará la información disponible sobre las variables incluidas en esta investigación; de esta manera se recolectarán los datos de los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda B atendidos en el Instituto Nacional de Salud del Niño de San Borja. Entre los datos recolectados estarán el inmunofenotipo informado al diagnóstico, el día de la citometría será considerado el día 1, y el inmunofenotipo informado post quimioterapia de inducción entre el día 30 y el día 33.

3.5 Técnicas para el procesamiento de la información

Para el análisis estadístico se utilizará el programa Epidat 3.1. La fase descriptiva abarcará las medidas de tendencia central y dispersión, tales como la mediana y el rango intercuartílico, tratándose de las variables cuantitativas; en tanto que para las variables cualitativas categóricas se estimarán frecuencias y porcentajes. Se confeccionarán tablas de doble entrada para la presentación de los datos. Se calculará la razón de prevalencias, así como se aplicarán pruebas estadísticas de relación, como la del chi cuadrado de independencia o la prueba exacta de Fisher. En el caso de la contrastación de la hipótesis de estudio, se usará la regresión logística múltiple, con el fin de establecer los factores asociados al riesgo de recaída. El software estadístico a ser empleado para el análisis de regresión será el IBM SPSS 24. Para la decisión estadística, se tomarán en cuenta los niveles de significación de $p<0,05$ y $p<0,01$.

3.6 Aspectos éticos

En esta investigación no será necesaria la aplicación del consentimiento informado pues se revisarán historias clínicas; no obstante, será necesaria la aprobación del comité de ética de la institución para dicha revisión.

Además, se asegurará la confidencialidad de los datos personales al no solicitar ninguna variable que permita identificar a los participantes, los formularios de recolección de datos recibirán un código aleatorio y los datos serán revisados sólo por el autor del estudio.

IV. Recursos y cronograma

4.1 Recursos

Participantes	Actividades (cronograma)	Horas
Investigador	1,2,3,4,5,6,7	300
Asesor	1,2,4,6	60
Estadístico	5	8

4.2 Presupuesto

4.2.1 Insumos

Insumos	Unidad	Cantidad	Costo	Financiamiento
Hojas bond A4	Millar	2	80.00	autofinanciado
Lapiceros	Caja x 12	2	40.00	autofinanciado
Archivador	Unidad	6	120.00	autofinanciado
Resaltador	Caja x 12	1	40.00	autofinanciado
Folder	Unidad	12	12.00	autofinanciado

Perforador	Unidad	2	30.00	autofinanciado
Tinta	Cartucho	2	200.00	autofinanciado
CD	Unidad	6	20.00	autofinanciado
USB	Unidad	1	100.00	autofinanciado
PC	Unidad	1	0.00	autofinanciado
Subtotal = 642.00 soles				

4.2.2 Servicios

SERVICIOS	UNIDAD	CANTIDAD	COSTO	FINANCIAMIENTO
Internet	Mes	8	800.00	autofinanciado
Asesoría estadística	Horas	8	800.00	autofinanciado
Procesamiento de datos	Horas	48	800.00	autofinanciado
Gasolina	Galones	10	250.00	autofinanciado
Alimentación	Almuerzo	32	640.00	autofinanciado
Fotocopiado	Hojas	300	30.00	autofinanciado
Anillado	Cuaderno	10	35.00	autofinanciado
Grabación CD	Unidad	10	20.00	autofinanciado
Subtotal = 3375.00 soles				
Total = 4017.00 soles				

4.3 Cronograma

N°	ACTIVIDADES	PERSONA RESPONSABLE	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SETIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE				ENERO				FEBRERO			
1	Planificación del proyecto.	Investigador Asesor	X	X	X	X																																	
2	Elaboración del proyecto.	Investigador Asesor					X	X	X	X	X	X																											
3	Presentación y aprobación del proyecto.	Investigador											X	X	X	X																							
4	Recolección de datos.	Investigador Asesor															X	X	X	X	X	X																	
5	Procesamiento de datos.	Investigador Estadístico																					X	X	X	X	X	X											
6	Análisis e interpretación de datos	Investigador Asesor																											X	X	X	X	X	X					
7	Elaboración y presentación del informe final.	Investigador																																	X	X	X	X	
	Duración del proyecto en semanas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	

Referencias Bibliográficas

1. Grimwade LF, Fuller KA, Erber WN. Applications of imaging flow cytometry in the diagnostic assessment of acute leukaemia. Methods. 2017; 112:39–45.

2. Thulasi Raman R, Anurekha M, Lakshman V, Balasubramaniam R, Ramya U, Revathi R. Immunophenotypic modulation in pediatric B lymphoblastic leukemia and its implications in MRD detection. Leukemia & Lymphoma. 2020; 61(8):1974–80.

3. Short NJ, Jabbour E. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: how to recognize and treat it. Curr Oncol Rep. 2017; 19(1):6.

4. Keegan A, Charest K, Schmidt R, Briggs D, Deangelo DJ, Li B, et al. Flow cytometric minimal residual disease assessment of peripheral blood in acute lymphoblastic leukaemia patients has potential for early detection of relapsed extramedullary disease. Journal of Clinical Pathology. 2018; 71(7):653–8.

5. Thulasi Raman R, Anurekha M, Lakshman V, Balasubramaniam R, Ramya U, Revathi R. Immunophenotypic modulation in pediatric B lymphoblastic leukemia and its implications in MRD detection. Leukemia & Lymphoma. 2020; 61(8):1974–80.

6. Kruse, Abdel-Azim, Kim, Ruan, Phan, Ogana, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21(3):1054.

7. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. Blood. 2015 ;126(8):964–71.

8. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, Fiocco M, van den Berg H, de Bont E, et al. Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: study ALL10 from the dutch childhood oncology group. Journal of Clinical Oncology. 2016; 34(22):2591–601.

9. Angiolillo AL, Schore RJ, Kairalla JA, Devidas M, Rabin KR, Zweidler-McKay P, et al. Excellent outcomes with reduced frequency of vincristine and dexamethasone pulses in standard-risk b-lymphoblastic leukemia: results from children's oncology group AALL0932. Journal of Clinical Oncology. 2021; 39(13):1437–47.

10. Castro-Arechaga S, Ronceros-Salas L, Vega-Centeno S, Moreno M, Soto A. Sobrevida global y libre de enfermedad en una cohorte peruana de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2018; 35(3):416.

11. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2016; 129(3):347–57.

12. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V, et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. Leukemia. 2019; 33(9):2241–53.

13. Das N, Gupta R, Gupta SK, Bakhshi S, Seth R, Kumar C, et al. Critical evaluation of the utility of pre- and post-therapy immunophenotypes in assessment of measurable residual disease in B-ALL. Annals of Hematology. 2021; 100(10):2487-2500.

14. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia. JAMA Oncology. 2017; 3(7): e170580.

15. Balasubramanian P, Singh J, Verma D, Kumar R, Bakhshi S, Tanwar P, et al. Prognostic significance of CD45 antigen expression in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2021; 89:102562.

16. Lovisa F, Zecca M, Rossi B, Campeggio M, Magrin E, Giarin E, et al. Pre- and post-transplant minimal residual disease predicts relapse occurrence in children with acute lymphoblastic leukaemia. British Journal of Haematology. 2018; 180(5):680–93.

17. Del Principe MI, De Bellis E, Gurnari C, Buzzati E, Savi A, Consalvo MAI, et al. Applications and efficiency of flow cytometry for leukemia diagnostics. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2019; 19(12):1089–97.

18. Liu Z, Li Y, Shi C. Monitoring minimal/measurable residual disease in B-cell acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry during targeted therapy. International Journal of Hematology. 2021;113(3):337–43.

19. Campana D, Pui C-H. Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2017;129(14):1913–8.

20. Correia RP, Bento LC, de Sousa FA, Barroso R de S, Campregher PV, Bacal NS. How I investigate minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. International Journal of Laboratory Hematology. 2021; 43(3):354–63.

21. Cheng J, Klairmont MM, Choi JK. Peripheral blood flow cytometry for the diagnosis of pediatric acute leukemia: Highly reliable with rare exceptions. Pediatric Blood & Cancer. 2018; 66(1): e27453.

22. Tembhare PR, Subramanian PG PG, Ghogale S, Chatterjee G, Patkar NV, Gupta A, et al. A high-sensitivity 10-color flow cytometric minimal residual disease assay in b-lymphoblastic leukemia/lymphoma can easily achieve the sensitivity of 2-in-10^6 and is superior to standard minimal residual disease assay: a study of 622 patients. Cytometry Part B: Clinical Cytometry. 2019; 98(1):57–67.

23. Chen X, Wood BL. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: treatment and prognosis?. Best Practice & Research Clinical Haematology. 2017; 30(3):237–48.

24. Cossarizza A, Chang H, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al.

Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). European Journal of Immunology. 2019; (10):1457–973.

25. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein h, et al. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. The International Agency for Research on Cancer (IARC).2017; 4(2).

26. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. Leukemia. 1995;9(10):1783-6.

27. Della Starza I, Chiaretti S, De Propris MS, Elia L, Cavalli M, De Novi LA, et al. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: technical and clinical advances. Frontiers in Oncology. 2019; 9:726.

28. Mohammed DJ, Jalal SD, Yassin AK, Mohammed AI, Al-Allawi NA. The outcome of acute lymphoblastic leukemia in 109 adult iraqi patients. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion. 2020; 37(2):264–70.

Anexos

Formulario de recolección de datos

Código:		
Edad:		
Sexo:		
Servicio de procedencia:		
	Citometría al diagnóstico	Citometría post inducción
Fecha Dia/mes/año		
Leucocitos mm^3		
Neutrófilos mm^3		
Hemoglobina g/dL		
Plaquetas mm^3		
Traslocación (9;22)(q34;q11) bcr/abl1 Cromosoma Filadelfia Ph	□ Si □ No	
Traslocación (12;21)(q13;q22) Etv6/runx1	□ Si □ No	
Inmunofenotipo:		
Enfermedad mínima residual	No aplica	□ >0.01% □ <0.01%