

Club Español de Citología Hematológica

El blasto de las neoplasias mieloides relacionadas con la terapia

COORDINADORAS: E. LUÑO. *Oviedo*
G. AZACETA. *Zaragoza*

INTRODUCCIÓN: RECIENTES AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN OMS DE LAS NEOPLASIAS MIELOIDES RELACIONADAS CON TERAPIA: COMENTARIOS A LA CLASIFICACIÓN OMS 2008

E. LUÑO¹, G. AZACETA²

¹*Servicio de Hematología.*

Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo

²*Servicio de Hematología.*

Hospital Clínico Universitario. Zaragoza

La cuarta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ de los tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides clarifica los criterios diagnósticos de algunas de las neoplasias mieloides descritas en ediciones previas, y reconoce nuevas entidades clínicas diferenciadas basadas en recientes hallazgos moleculares, en la identificación de nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos y en los avances en el manejo clínico de los pacientes. Dentro del subgrupo de leucemias agudas, el término “neoplasias mieloides relacionadas con terapia (NMRT)” incluye el espectro de entidades previamente conocidas como LAM-t, SMD-t, o SMD/NMP-t, que aparecen como complicación tardía de quimioterapia y/o radioterapia administrada previamente para el tratamiento de patología tanto neoplásica como, menos frecuentemente, no neoplásica (principalmente enfermedades autoinmunes). Aunque la relación causa-efecto está implícita en el término NMRT, los complejos mecanismos patogénicos fundamentales que conducen a su desarrollo siguen siendo objeto de investigación en la actualidad. Es conocido que la carcinogénesis relacionada con agentes citotóxicos se produce a través de alteraciones de genes críticos en la proliferación y diferenciación del tejido hematopoyético como consecuencia de combinaciones de eventos mutacionales, que a través de distintas vías genéticas, como propuso Pedersen-Bjergaard y cols.,² cooperarían en la génesis y progresión de la leucemia. El hecho de que sólo una pequeña parte de los pacientes expuestos a estos agentes desarrollen una NMRT sugiere la existencia de factores específicos, como los polimorfismos genéticos, que predisponen a padecer una NMRT.

La frecuencia de NMRT se estima entre un 10 y un 20% de todos los casos de LAM, SMD y SMD/NMP, pero desde que en 1970 se publicaron los primeros pacientes con SMD/LAM-t, la frecuencia asignada por los distintos autores ha sido muy variable oscilando desde unos pocos casos hasta 27% sin separar, en la mayoría de los casos, LAM secundaria a SMD

de LAM-t.³ Mauritzson y cols.⁴ estiman la frecuencia por separado de LAM-t en 14% y de SMD-t en 15%, mientras que el grupo Germano-Austriaco, en un estudio sobre 2.853 LAM, establece sólo en 7% la frecuencia de LAM-t.⁵ Entre las patologías previas hematológicas, ocupan el primer lugar por frecuencia los linfomas tanto Hodgkin como no Hodgkin, aunque se han descrito tras mieloma múltiple, LLC, LAL, LAP y posttrasplante de progenitores hematopoyéticos, y de los tumores no hematológicos destacan los de mama y de célula germinal.⁵⁻⁸ Entre la patología no neoplásica, la artritis reumatoide es la relacionada con más frecuencia.⁹ Se excluyen de esta categoría las crisis blásticas de neoplasias mieloproliferativas (NMP), ya que en ellas no es posible determinar si la transformación leucémica es el resultado de su evolución natural o está relacionada con el tratamiento recibido. Un hecho constatado es que la prevalencia de las NMRT ha sufrido un incremento en los últimos años debido al aumento en la esperanza de vida y supervivencia de pacientes neoplásicos tratados con éxito, así como al creciente número de fármacos disponibles que causan daño del ADN, incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antitubulina, inhibidores de topoisomerasa II y agentes intercalantes.⁵ Esto ha motivado en la comunidad científica un interés creciente por conocer mejor sus especiales características clínico-biológicas, que ayude a un mejor manejo de la entidad así como a determinar las posibles implicaciones en el planteamiento terapéutico de la patología primaria.

El periodo de latencia entre el diagnóstico del proceso primario y el de la NMRT varía desde unos meses a varios años y puede depender tanto de la intensidad y de la dosis acumulada de terapia citotóxica como del tipo de agente genotóxico, aunque en la nueva revisión¹ se excluyen subcategorías en función del agente citotóxico previo, ya que muchos pacientes reciben varios fármacos en combinación y, con frecuencia, uno de ellos es un alquilante.⁸ Sin embargo, sí se contempla la existencia clínica de dos escenarios diferenciados:

- El primero y más frecuente (70%), en relación con la exposición a agentes alquilantes y/o radiación ionizante. Muestra un período de latencia de 5 a 10 años; en general la presentación inicial es un SMD-t, aunque una minoría puede debutar como SMD/NMP-t o como LAM-t franca, y suele asociarse a pérdida no balanceada de material de los cromosomas 5 y/o 7 a menudo formando parte de cariotipos complejos e hipodiploides. Su incidencia aumenta con la edad del paciente.

- El segundo (20-30% de los casos) se da principalmente tras tratamiento con inhibidores de topoisomerasa II, aparece tras un periodo de latencia más corto, de 1 a 5 años, y muchos de los pacientes debutan como LAM-t sin fase de SMD previa. Con frecuencia se asocian a traslocaciones ba-

lanceadas que afectan a 11q23/*MLL*, o a 21q22/*RUNX1*. Otras anomalías genéticas recurrentes descritas incluyen t(8;21)(q22;q22);*RUNX1-RUNX1T1*, t(15;17)(q22;q12);*PML-RARA*, inv(16)(p13.1q22)/ t(16;16)(p13.1;q22);*CBFB-MYH11*. En estas últimas, las características morfológicas son similares a las observadas en las leucemias agudas *de novo* asociadas con esas anomalías y deben designarse como LAM-t indicando a continuación la anomalía citogenética correspondiente. Algunos casos pueden presentar cambios displásicos.¹⁰ Pacientes con LAM-t con t(15;17) o inv(16) alcanzan remisión completa en tasas similares a sus equivalentes *de novo*, pero su supervivencia es más corta.⁶ Se incluyen en este grupo, casos de LAL-t en general asociados a t(4;11)(q21;q23). Otras traslocaciones balanceadas menos comunes asociadas a SMD-t/LAM-t que aparecen también tras cortos periodos de latencia incluyen reordenamientos como 3q21q26/*EVII*, t(2;11)(q31;p15);*NUP98-HOCD13* o t(8;16)(p11;p13);*MYST3-CREBBP*.⁴

Inicialmente, la clasificación de las leucemias era predominantemente clínica y morfológica. Posteriormente se añadieron métodos citoquímicos, inmunológicos, citogenéticos y moleculares, que permitieron grandes avances en el conocimiento sobre la naturaleza de las leucemias. Entre 1976 y 2001, la clasificación FAB de LAM¹¹ y sus posteriores propuestas de clasificación y/o modificaciones ha sido la más aceptada y reproducible para la clasificación tanto de SMD como de LAM, y las referencias a casos secundarios a terapia se limitaban a describir una LAM a menudo difícil de categorizar morfológicamente, con displasia trilineal asociada. En los años 70 y primeros 80, se comunicaron pequeñas series de casos de LAM tras quimioterapia y/o radioterapia que parecían compartir ciertos rasgos biológicos y evolutivos: periodo preleucémico con citopenias y anomalías morfológicas llamativas, afectación en mayor o menor grado de todas las líneas mieloides, frecuentes anomalías cromosómicas, y pobre respuesta a terapia. En general, se reconoce ya entonces como una forma de LAM que suele presentar problemas en su clasificación, siendo difícil adscribir los casos a un subtipo FAB concreto, debido a que el proceso proliferativo puede afectar a varias líneas celulares, a la habitual afectación trilineal, el variable porcentaje de blastos y la frecuente mielofibrosis acompañante.¹² Así, en esos años, se considera incluida en las “formas especiales de LANL”, como “LANL secundaria”. Además de las dificultades para clasificar los casos de LAM-t, algunos autores observan que aquellos casos que se catalogarían como SMD-t muestran diferencias claras con los SMD *de novo*, y similitudes biológicas y evolutivas con los casos agudos. Estos pacientes con SMD-t presentan también dishemopoyesis severa en varias líneas, citopenias intensas y complicaciones clínicas graves, todo ello más acorde con un

SMD de “alto riesgo” tipo AREB, pero con un número de blastos con frecuencia (60% de casos) inferior a 5% y que por ello eran clasificados como SMD de “bajo riesgo”.¹² Asimismo, se identifican anomalías citogenéticas adversas comunes en ambos grupos (SMD-t y LAM-t), con frecuente afectación de los cromosomas 5 y/o 7, cariotipos complejos e hipodiploides y pobre respuesta al tratamiento en todos ellos.^{13,14} La evolución era muy desfavorable, con supervivencias muy inferiores a los casos de SMD *de novo*, y prácticamente superponibles a las LAM-t, en torno a 3-4 meses de mediana. Comienza así a gestarse la concepción de una panmielosis relacionada con la terapia,^{12,15} globalmente considerada, ya que el pronóstico no varía en función de la fase más precoz, SMD con pocos blastos, AREB o LAM franca en que se encuentre el paciente, siendo en todos los casos muy adverso.

La inclusión de las neoplasias mieloides relacionadas con la terapia como categoría independiente (ICD-O 9920/3) ya queda reflejada en la clasificación OMS publicada en 1999¹⁶. El fundamento de dicha clasificación es definir procesos que puedan ser reconocidos con las técnicas disponibles y que correspondan a entidades clínico-biológicas “reales” bien diferenciadas, en línea con la “filosofía” de la clasificación OMS, que busca ser reproducible y útil tanto en la práctica clínica como en investigación. La clasificación se basa en toda la información disponible: morfológica, inmunofenotipo, genética y datos clínicos para definir entidades con significado clínico. La importancia relativa de cada uno de esos datos varía según la entidad de que se trate dependiendo del estado del conocimiento, y por ello no hay un “estándar oro” según el cual se puedan definir todas ellas. En el caso de las NMRT, por definición, el diagnóstico es descriptivo y basado en la historia clínica previa de exposición a agentes citotóxicos, y no en marcadores específicos celulares, genéticos o moleculares. En la revisión de 2008, como se ha mencionado previamente, ya no se incluyen subcategorías según el tipo de tratamiento recibido, ya que muchos pacientes han sido tratados tanto con alquilantes como con inhibidores de topoisomerasa II.¹

En las NMRT, el espectro de anomalías morfológicas es muy variable. SMD-t y LAM-t representan los extremos del espectro leucémico y el diagnóstico diferencial entre ellas dependía en las antiguas clasificaciones del porcentaje de blastos, mientras que en la clasificación de la OMS, SMD-t, SMD/NMP-t o LAM-t se consideran un único síndrome clínico, incluso en casos que cumplan criterios morfológicos y citogenéticos de otras entidades. Es objeto de debate en esta entidad la importancia relativa de los hallazgos morfológicos, si entre ellos hay alguno característico o constante, y si tienen o no significado clínico.

Morfológicamente, la mayoría de los pacientes con NMRT presentan displasia multilineal tanto en SP

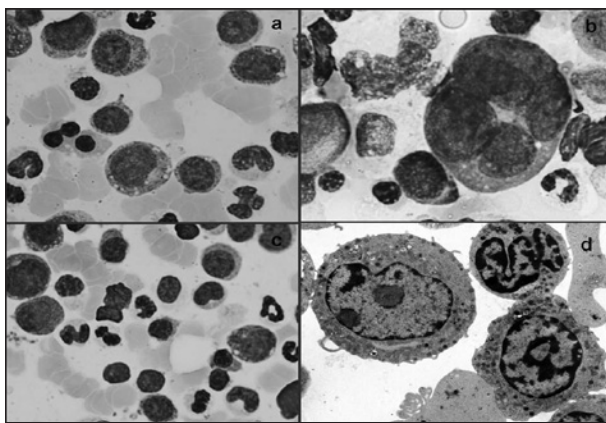


Figura 1. a) Médula ósea, MGG x 1.000. Neutrófilos con intensa degranulación en SMD-t. b) Eritroblasto gigante multinucleado. MO de SMD-t tipo AREB-1 con hiperplasia eritroide displásica. Neutrófilo degranulado. c y d) Neutrófilos degranulados en MO de paciente con SMD-t tipo AREB-1. Imagen ultraestructural de neutrófilo con núcleo en forma de anillo. Doble contraste x4k.

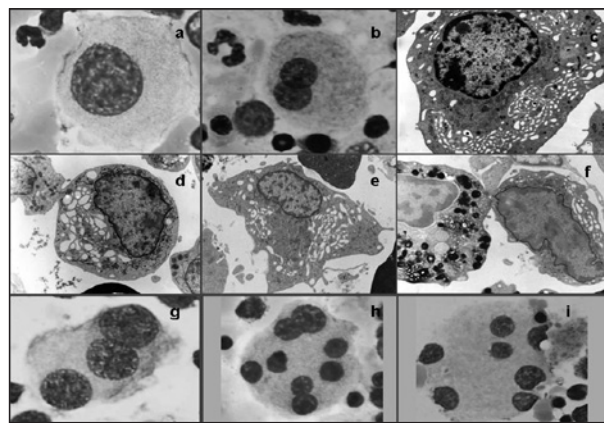


Figura 2. a, b, c) Médula ósea de LAM-t tipo LAM2 con cariotipo complejo y afectación 5q. Megacariocitos hipolobulados. MO y MET, doble contraste x5k. d, e) Sangre periférica de LAM-t con diferenciación megacarioblástica. Micromegacariocitos. f) Blastos POP positivo con membranas de demarcación en el citoplasma. La reacción de peroxidasa es positiva en cisterna perinuclear y pequeños trazos de RE. 3-3 DAB x8K. g, h e i) MO, MGG x1.000. Megacariocitos con núcleos dispersos en SMD-t/LAM-t.

como en MO. Aunque la presencia de displasia se asocia más frecuentemente a una historia previa de tratamiento con alquilantes y/o radiación y a anomalías de los cromosomas 5 y/o 7 con frecuencia formando parte de cariotipos complejos, la displasia puede estar presente también en casos con anomalías genéticas recurrentes.¹⁰ Las características displásicas recuerdan a las existentes en SMD *de novo*, pero el grado de disgranulopoyesis (Figura 1) y dismegacariopoyesis es típicamente mayor (Figura 2), similar a la existente en LAM con cambios relacionados con mielodisplasia, un subtipo de LAM *de novo* incluido también como grupo independiente en la clasificación de la OMS.⁶

En SP hay una o más citopenias. La anemia está casi siempre presente, y la morfología de la serie roja se caracteriza en muchos casos por macrocitosis y poiquilocitosis. A menudo, un aumento en el volumen corpuscular medio (VCM) es el primer indicio para el diagnóstico. Es frecuente también la trombopenia y leucopenia. Puede haber micromegacariocitos. Los cambios displásicos en neutrófilos incluyen lobulación nuclear anormal, principalmente hipolobulación con formas pseudo-Pelger e hipo o agranularidad.¹⁶

La MO puede ser hiper celular, normocelular o hipocelular, con diferentes grados de fibrosis medular en aproximadamente el 15% de los casos. Disgranulopoyesis y diseritropoyesis, en general moderada-severa, están presentes en muchos pacientes. Se han descrito sideroblastos anillados en > 60% de casos y en algunos exceden el 15% de los precursores eritroides. El número de megacariocitos varía, pero en la mayoría de los casos se ven formas displásicas de variable tamaño con núcleos pequeños monolobulados o hipolobulados, o bien megacariocitos con núcleos dispersos. Es frecuente la basofilia.

El porcentaje de blastos es variable, pero en pacientes con fase mielodisplásica al diagnóstico, casi el 50% tienen < 5% de blastos. Son poco frecuentes los bastones de Auer, y la reactividad a mieloperoxidasa y a esterasas no específicas suele ser débil.⁶ Aunque en pacientes con mielodisplasia y citopenias el diagnóstico diferencial entre SMD-t y LAM-t depende de la morfología y el % de blastos, esta subclasificación parece carecer de significado clínico.¹⁷

Muchos casos asociados a reordenamientos 11q23 presentan blastos con diferenciación monocítica o mielomonocítica. Algunos blastos de LAM-t tienen diferenciación mieloide, otros corresponden al espectro de LAM-t con diferenciación eritroide y ya no pueden ser clasificados como eritroleucemia o como leucemia eritroide pura¹⁷ y, ocasionalmente, presentan diferenciación megacarioblástica.

presentan blastos con diferenciación monocítica y se clasifican en las categorías morfológicas LAM₅ y LAM₄. Algunos tienen diferenciación mieloide, otros corresponden al espectro morfológico de LAM-t con diferenciación eritroide y ya no pueden ser clasificados como eritroleucemia o como leucemia eritroide pura¹⁷ y, ocasionalmente, presentan diferenciación megacarioblástica. Finalmente, están los casos de SMD-t/LAM-t morfológicamente idénticos a los observados en todos los subtipos de LAM *de novo* con anomalías genéticas recurrentes.

Respecto al grado de displasia que acompaña a LAM-t con anomalías citogenéticas recurrentes, pocos son los datos publicados al respecto. En un estudio de SMD-t/LAM-t con traslocaciones balanceadas en 21q22,¹⁰ los hallazgos morfológicos y de inmunofenotipo en LAM-t con t(8;21) eran simila-

res a los encontrados en LAM *de novo* con la misma anomalía, pero las diferencias entre ambas entidades fueron significativas en cuanto al grado de displasia. Los autores apuntan que la detección de una leucemia con características morfológicas de t(8;21) y displasia multilineal severa sugiere LAM-t con t(8;21).

Todos estos hallazgos confirman la variabilidad morfológica de las NMRT, pero cada vez hay más evidencias de que su subclasificación morfológica puede tener poca relevancia clínica,¹⁷ a diferencia de otras variables que sí la tienen, como anomalías genéticas y comorbilidad.¹⁸ Sin embargo, el reconocimiento de los diversos aspectos morfológicos es necesario para un apropiado diagnóstico integrado dentro del cual el examen morfológico de la sangre periférica y de la médula ósea sigue siendo el primer paso en la evaluación de los pacientes. Es posible que el análisis detallado de un cada vez mayor número de casos permita reconocer algún subgrupo con características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas propias.

Numerosos estudios han confirmado que en NMRT hay una elevada frecuencia de cariotipos anormales ($\pm 90\%$) y una mayor prevalencia de anomalías citogenéticas de pronóstico adverso respecto a los casos *de novo*.^{4,5,18,19} En el 70% de los casos se trata de alteraciones no balanceadas. Las anomalías citogenéticas han demostrado un valor pronóstico sobre la supervivencia, y para algunos su impacto negativo es significativamente mayor respecto a sus equivalentes *de novo* en casos con anomalías recurrentes de pronóstico favorable,¹⁹ lo que sugiere no sólo diferencias biológicas entre ambos grupos sino que el diagnóstico de NMRT es, en sí mismo, un factor de mal pronóstico.

La frecuencia de mutaciones de NPM1 y FLT3 presentes en LAM-t es inferior a la descrita en casos *de novo*, aunque para algunos se iguala si se consideran sólo los casos con cariotipos normales.⁵ Mutaciones de FLT3 se han descrito en algunas LAP-t con t(15;17) y en casos con cariotipos complejos.^{17,20}

Conclusiones

Las similitudes clínico-patológicas y genéticas entre SMD-t, SMD/NMP-t y LAM-t, y su uniforme mal pronóstico, que es de origen multifactorial, con en general pobre respuesta al tratamiento,^{6,8} sugiere una base biológica común, que justifica su consideración como entidad patológica definida con personalidad propia. Su prevalencia creciente obliga a continuar profundizando en el conocimiento de sus bases genético-moleculares, criterios diagnósticos y aspectos clínico-evolutivos, cuyos da-

tos más actualizados serán revisados en el simposio que nos ocupa. Un mejor entendimiento de esta patología sin duda llevará a planteamientos terapéuticos individualizados y al descenso en la incidencia de esta grave complicación tardía de la terapia antineoplásica.

Referencias bibliográficas

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2008.
2. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20: 1943-1949.
3. Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 1999; 84(10): 937-945.
4. Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billström R, Ahlgren T, Mikoczy Z et al. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and *de novo* adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia* 2002; 16(12): 2366-2378.
5. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne CH, Horst HA, Held G et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011; 117(7): 2137-2145.
6. Godley LA, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008; 35(4): 418-429.
7. Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica* 2007; 92(10): 1389-1398.
8. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 2003; 102 (1):43-52.
9. Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *British Journal of Cancer* 2009; 100: 822-828.
10. Arber DA, Slovak ML, Popplewell L, Bedell V, Ikle D, Rowley JD. Therapy-related acute myeloid Leukemia/Myelodysplasia with balanced 21q22 translocations. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 306-313.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of acute myeloid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-458.
12. Michels SD, McKenna RW, Arthur DC, Brunning RD. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphologic study of 65 cases. *Blood* 1985; 65:1364-1372.
13. Le Beau MM, Albain KS, Larson RA, Vardiman JW, Davis EM, Blough RR et al. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *JCO* 1986; 4(3): 325-345.
14. Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, Smtth TL, Cork A, McCredie KB, Treireich EJ. Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: clinical, cytogenetic, and prognostic features. *JCO* 1986; 4 (12): 1748-1757.

15. Foucar K, McKenna RW, Bloomfield CD, Bowers TK, Brunning RD. Therapy-related leukemia: a panmyelosis. *Cancer* 1979; 43(4): 1285-96.
16. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the Hematopoietic and Lymphoid tissues. *JCO* 1999; 17(12): 3835-3849.
17. Czader M, Orazi A. Therapy-related myeloid neoplasm. *Am J Clin Pathol* 2009; 132:410-425.
18. Singh ZN, Huo D, Anastasi J, Smith SM, Karrison T, Le Beau MM, Larson RA, Vardiman JW. Therapy-related myelodysplastic syndrome. Morphologic subclassification may not be clinically relevant. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:197-205.
19. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia* 2004; 18(1): 120-125.
20. Rund D, Krichevsky S, Bar-Cohen S, Goldschmidt N, Kedmi M, Malik E. Therapy-related leukemia: clinical characteristic and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia* 2005; 19:1919-1928.

DIAGNÓSTICO INTEGRADO DE LAS NEOPLASIAS MIELOIDES SECUNDARIAS A TRATAMIENTO: DATOS CLÍNICOS, MORFOLOGÍA, INMUNOFENOTIPO, CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

T. VALLESPÍ¹, C. SÁNCHEZ-MORATA², M. ORTEGA¹, L. GALLUR³, L. LÓPEZ-ANDREONI¹, N. MARTÍNEZ-MORGADO¹, M. NAVARRETE², J.L. DAPENA⁴, D. VALCÁRCEL⁵, C. PALACIO³

Unidades de Diagnóstico en Hematología:

¹Citogenética; ²Citología; ³Inmunofenotipo;

⁴Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica;

⁵Servicio de Hematología Clínica.

Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona

Introducción

Se consideran neoplasias mieloides relacionadas o secundarias a tratamiento (NM-t) todas las enfermedades hematológicas de origen mieloides que se observan en pacientes tratados con agentes citotóxicos debido a enfermedades neoplásicas (benignas o malignas) o autoinmunes.¹⁻³ Las NM-t son, principalmente, leucemias mieloides agudas (LMA), síndromes mielodisplásicos (SMD) y neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (SMD/NMP) secundarias a tratamiento (LMA-t, SMD-t y SMD/NMP-t, respectivamente).¹ El período de latencia entre el tratamiento de la primera enfermedad y la aparición de la NM-t es variable, oscilando entre algunos meses hasta varios años, y depen-

de fundamentalmente de la cantidad de tratamiento administrado y su modalidad.¹⁻³

Hasta hace poco tiempo, las NM-t se separaban en dos grandes grupos: 1) las relacionadas con la exposición a radioterapia y/o tratamiento alquilante cuyo periodo de latencia es de 5 a 10 años y que suelen asociarse con pérdidas parciales o totales de los cromosomas 5 y 7; y 2) las secundarias a tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II, con un corto período de latencia (1-5 años) y anomalías citogenéticas que implican a 11q23 (gen *MLL*), 21q22 (*RUNX1*)⁴ y al reordenamiento *PML-RARα*.^{2,3,5} Sin embargo, debido a que actualmente muchos pacientes reciben ambos tratamientos (alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II), esta separación ha caído en desuso.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su última clasificación (2008) incluye a las NM-t dentro del capítulo "Leucemias mieloides agudas (LMA) y neoplasias de precursores relacionados" en el subapartado "Neoplasias mieloides relacionadas con tratamiento".¹ Sin embargo, algunas leucemias secundarias a tratamiento pueden ser de naturaleza linfocítica.⁷⁻⁹ Por otra parte, el Grupo de Epidemiología en Radiación del National Cancer Institute, tras un exhaustivo estudio en una larga serie de pacientes, concluye que sólo una pequeña parte de las neoplasias sólidas secundarias (no incluye las hematológicas) son debidas al tratamiento radioterápico previo, estando más relacionadas con factores genéticos o hábitos personales.¹⁰

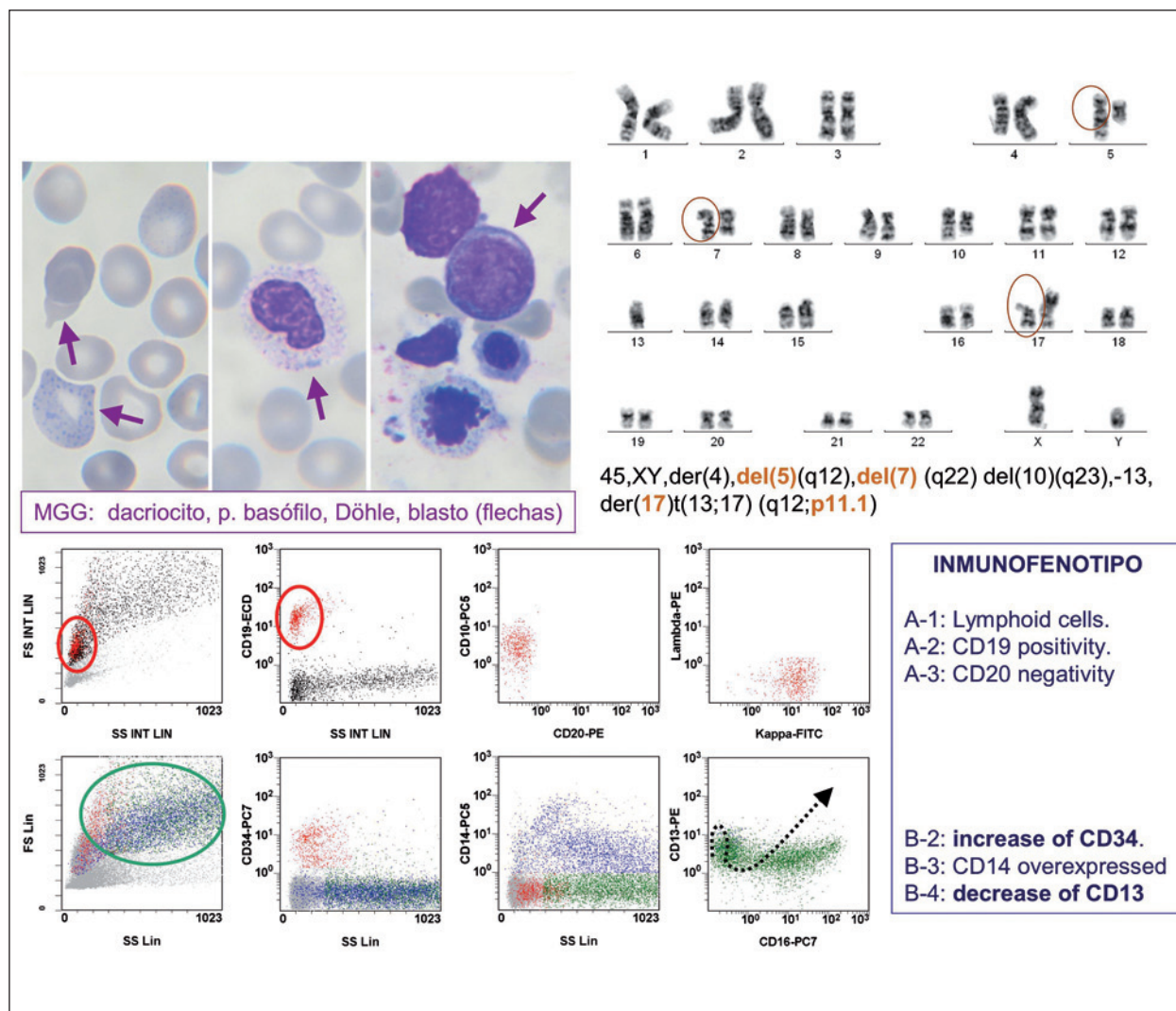
En esta ponencia se revisan los antiguos y recientes hallazgos que pueden contribuir a un mejor diagnóstico de las NM-t.

Estado actual

Actualmente, se observa un aumento de las NH-t debido a:

- Mayor incidencia de neoplasias benignas y malignas
- Diagnóstico de la primera neoplasia en edades más tempranas
- Tratamientos más agresivos
- Mejor respuesta al tratamiento y mayor esperanza de vida
- Aumento del uso de fármacos quimioterápicos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Como en la mayoría de enfermedades hematológicas, el diagnóstico debe hacerse integrando los datos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y de biología molecular. En el caso de los SMD-t y LMA-t, sin olvidar la enfermedad primaria y la fase de la misma (curación o remisión completa, cronicidad o progresión de la misma), las características citogenéticas y las alteraciones moleculares son, junto a la



Caso 1. SMD tras tratamiento por linfoma folicular.

naturaleza de la célula maligna, los factores a tener en cuenta para decidir el tratamiento.

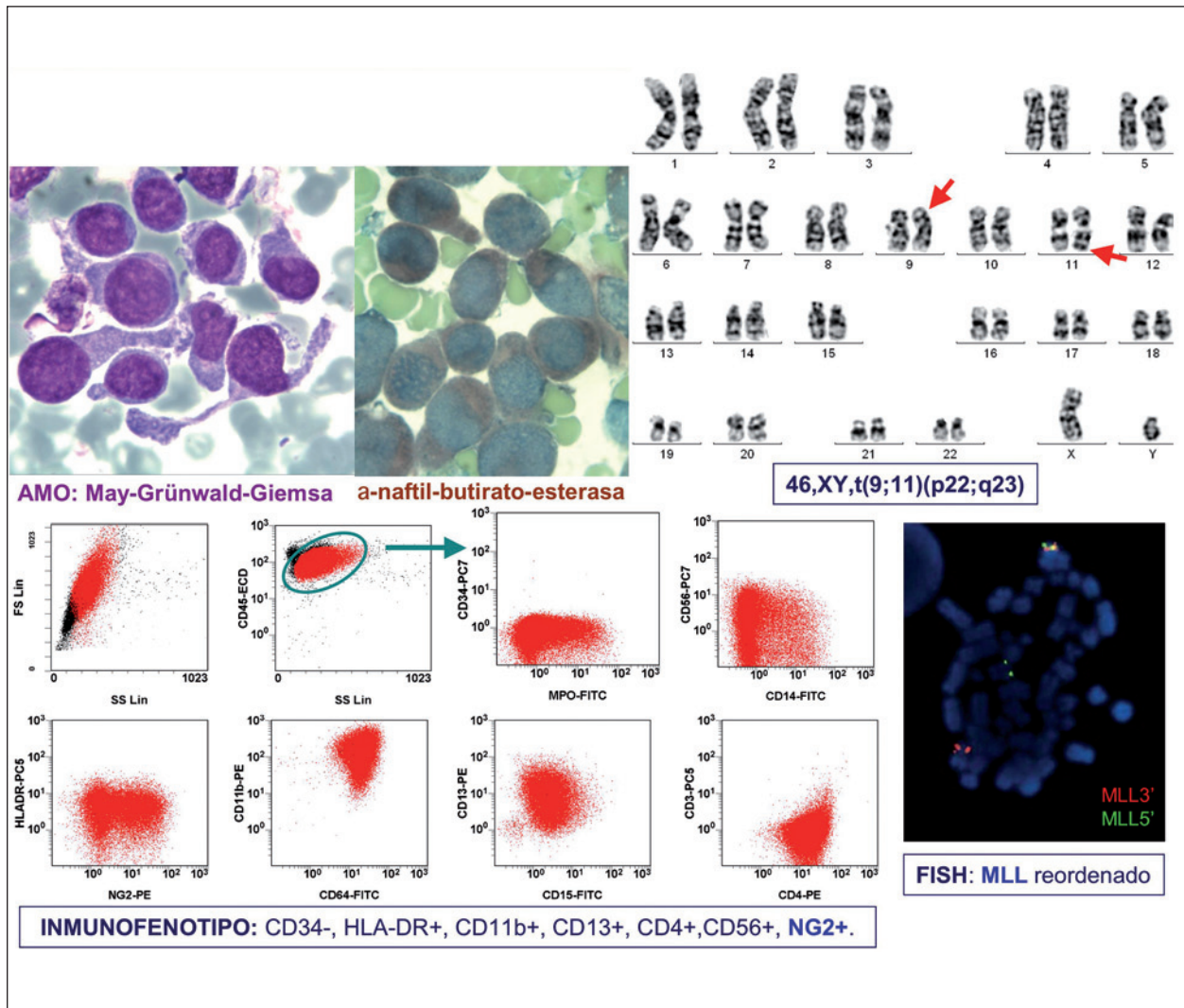
Con la sola excepción de las leucemias promielocíticas secundarias con reordenamiento *PML/RARα*, cuyo tratamiento y pronóstico es el mismo que las diagnosticadas *de novo*,^{5,6} las NM-t tienen muy mal pronóstico. Sin embargo, la introducción de agentes desmetilantes en el tratamiento de estas enfermedades,^{11,12} así como la buena respuesta al trasplante de médula ósea de algunas NM-t^{13,14} hacen que el pronóstico de algunas de ellas haya mejorado en los últimos años y ponen de manifiesto la importancia de alcanzar un diagnóstico lo más preciso posible de estas enfermedades para poder aplicar en cada caso el tratamiento más adecuado.

Datos clínicos y biológicos

En todos los pacientes con aparición o agravamiento de citopenias, inexplicables por otras causas, o

dismorfias de las células de la sangre, y entre cuyos antecedentes figure la administración previa de agentes citotóxicos, debe realizarse un estudio de médula ósea (mielograma, citogenética, inmunofenotipo) para descartar una NM-t. Además de los datos habituales, deben recogerse otros datos que han mostrado tener influencia negativa en el pronóstico de los SMD-t: presencia de hepatomegalia, intervalo entre el tratamiento y la aparición de la NM-t superior a 6 años, y un estado general, según la escala de ECOG, superior a 1.¹⁵ Debido a que muchos pacientes son de edad avanzada, es también imprescindible hacer constar las enfermedades asociadas.¹⁶

Entre los análisis bioquímicos, es conveniente solicitar la determinación sérica de albúmina, de creatinina y de β-2-microglobulina, ya que niveles anormales de las mismas (< 4 g/dL, > 1 mg/dL y > 3 mg/L, respectivamente) pueden ayudar a precisar el pronóstico de los SMD-t.¹⁵



Caso 2. LMA secundaria a tratamiento por sarcoma de Ewing con anomalías en 11q23.

Morfología

Deben analizarse todas las características dismórficas recomendadas para el estudio de los SMD primarios.⁴ Sin embargo, la clasificación FAB¹⁷ es muy poco aplicable a la mayoría de SMD-t, ya que, a pesar de que en muchos casos el número de blastos en médula ósea es < 5%, existen muchas formas inmaduras dismórficas eritroides, monocíticas y megacariocíticas, así como una alta frecuencia de displasia trilineal.

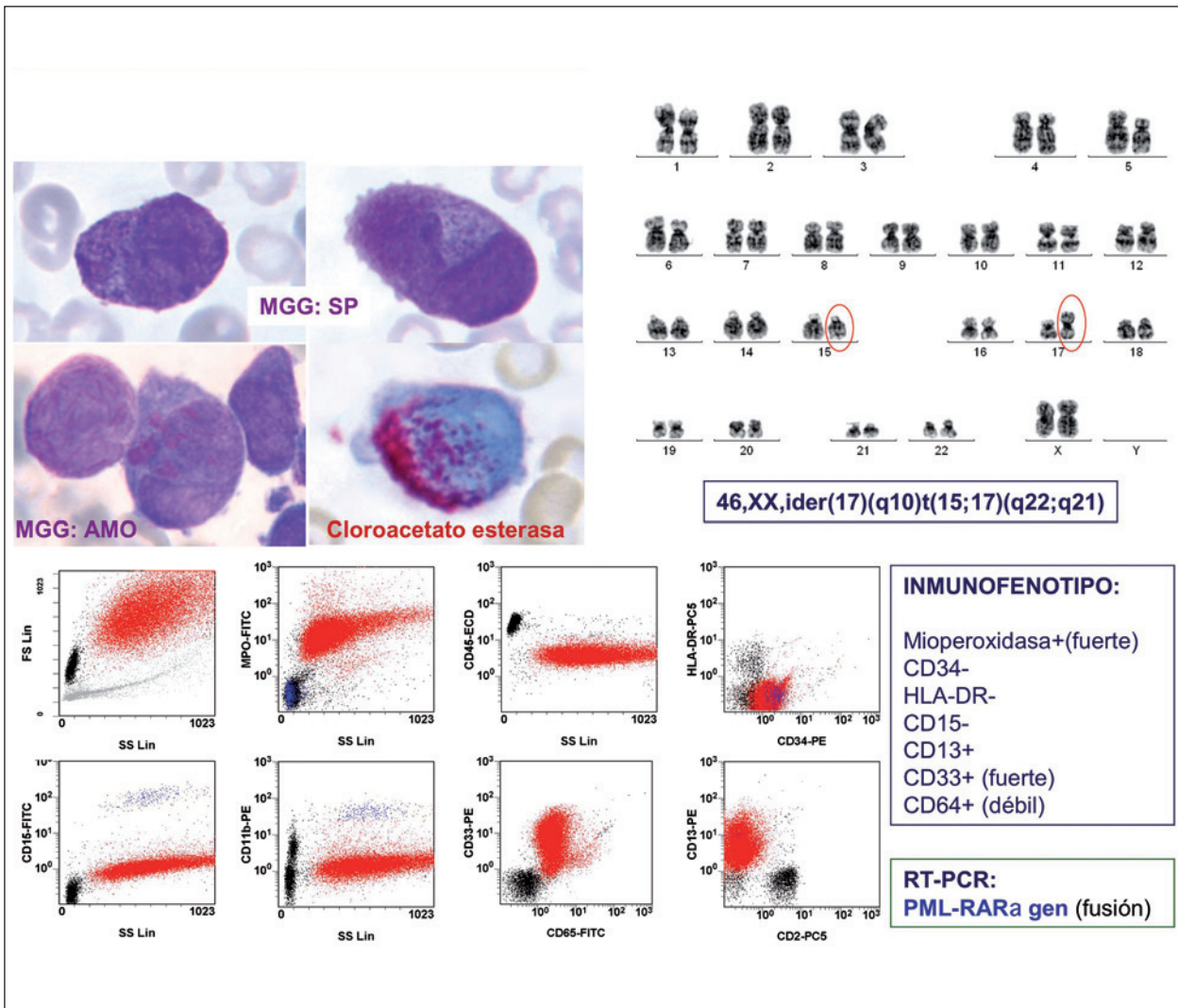
Las características más típicas de los SMD-t son los macrocitos, ovalocitos y eritroblastos circulantes junto a neutrófilos hipo e hipergranulados con el núcleo pseudo-Pelger-Hüet y apéndices nucleares en forma de espículas.^{4,18} En un 20-50% de casos la médula es hipocelular con fibrosis marcada.

Las características de las LMA-t son diversas y van desde las semejantes (Caso 2) a LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia (blastos y

displasia trilineal) hasta casos en que la infiltración por blastos es casi total y tienen morfología muy atípica, por lo que deben ser catalogados con la ayuda de técnicas citoquímicas y, sobre todo, con el estudio inmunofenotípico (Caso 3).

Inmunofenotipo: citometría de flujo

En estos últimos años el estudio de las alteraciones fenotípicas en los SMD primarios está cobrando gran interés. De momento, no hay recomendaciones específicas para los SMD-t. Los estudios se centran sobre todo en el análisis de: 1) las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) CD34+; 2) las células granulocitarias neutrófilas en maduración; y 3) la serie monocítica.¹⁹ La serie megacariocítica, los precursores eritroides, los granulocitos eosinófilos y basófilos, los mastocitos y las células dendríticas han sido menos estudiados en estos síndromes.^{19,20}



Caso 3. LMA promielocítica secundaria a tratamiento por cáncer de mama.

Orfao *et al.* (2010) recomiendan evaluar los compartimentos madurativos de al menos cuatro grupos de precursores medulares: los precursores CD34+ y las células CD34- comprometidas a línea de granulocito neutrófilo, monocito y a la serie eritroide. Entre las anomalías de los diferentes compartimentos citadas por estos autores se encuentran: a) en el de progenitores mieloides CD34+: incremento de CD34+, aumento de expresión de CD11b/CD15, ausencia de expresión de CD13, CD33 y/o HLA-DR y expresión de antígenos asociados a línea linfóide; b) en el de progenitores B CD34+: descenso de precursores CD34+/CD10+; c) en el de precursores de granulocito maduro: hipogranularidad, patrones de expresión alterada (CD11b/CD13/CD16), ausencia de expresión de CD13 y/o CD33, y expresión aberrante de CD34 y/o antígenos de línea linfóide; d) en el de precursores de línea monocítica: alteración del patrón de expresión de HLA-DR, CD11b, CD13, CD14, CD33; y e) en el de precursores eritroide: expresión aberrante de CD34 o elevada de CD45 y/o

CD117.¹⁹ Hay pocos anticuerpos monoclonales comercializados útiles para el estudio de la eritropoyesis. Las

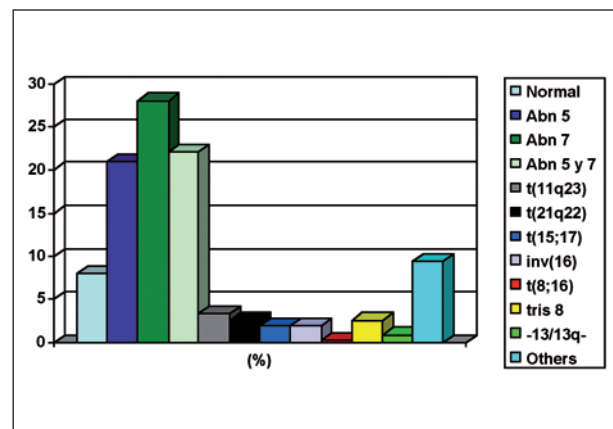
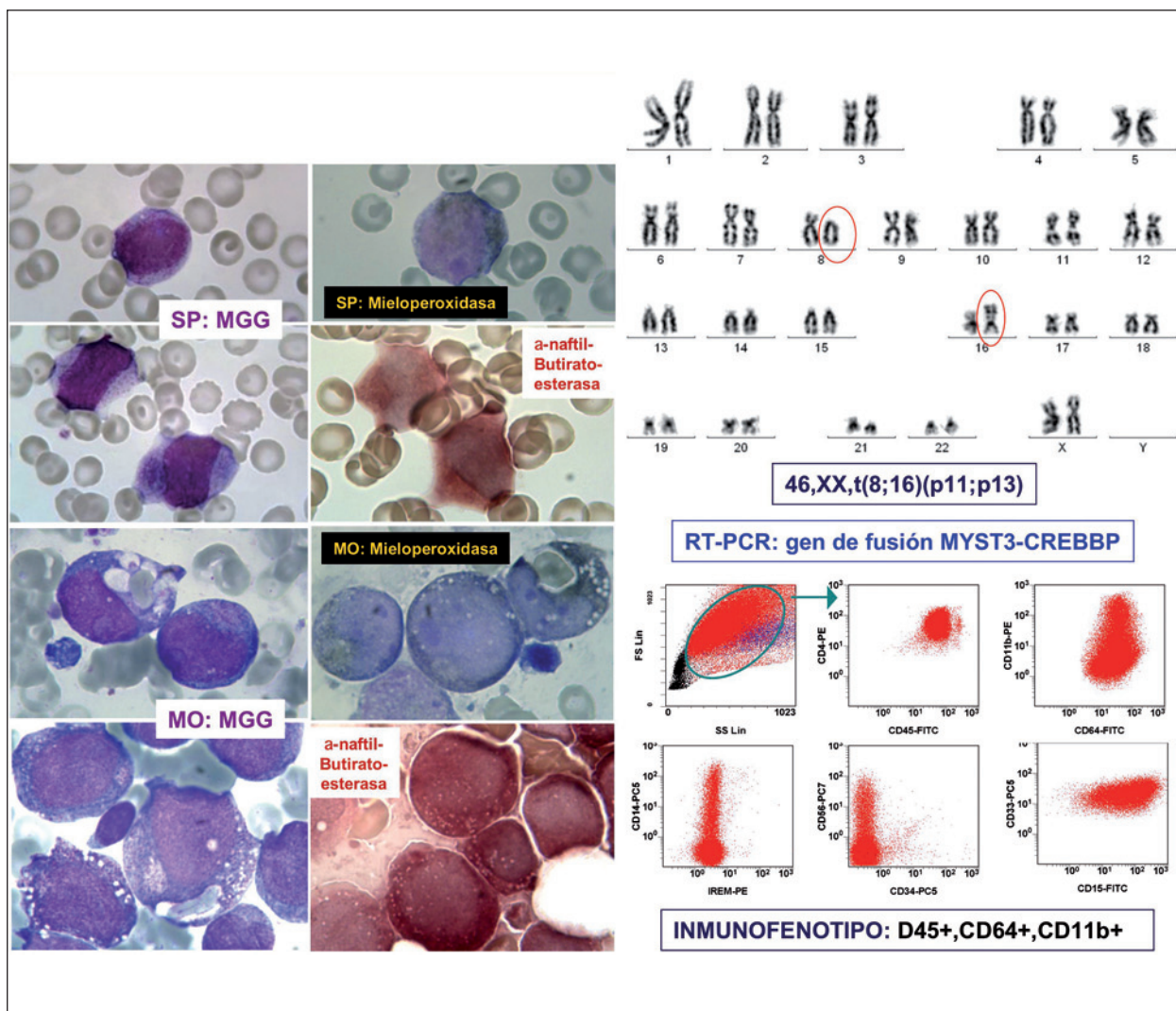


Figura 1. Anomalías citogenéticas (%) en 306 casos de SMD-t y LMA-t. (Smith SM *et al.* Blood 2003; 102:43-52)



Caso 4. LMA-M5 secundaria a tratamiento por linfoma folicular.

aproximaciones más frecuentemente utilizadas son el análisis de la expresión de CD71 (receptor de la trans-

ferrina), CD235a (glicoforina a), CD105 (endogлина) y CD117 (c-kit).^{19,20}

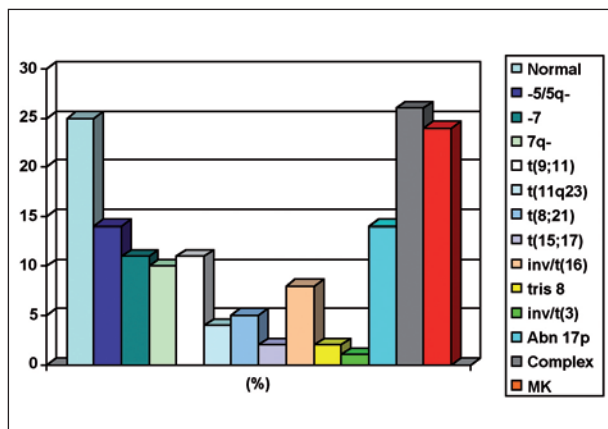


Figura 2. Anomalías citogenéticas (%) en 182 casos de LMA-t. (Kayser et al. Blood 2011; 117:21372145)

De los parámetros anteriormente citados, el porcentaje de mieloblastos, el de precursores de línea B, la expresión de CD45 en los mieloblastos y la valoración de la granulación de los granulocitos neutrófilos (SSC) son los más reproducibles entre observadores y aplicables en la mayoría de laboratorios.²¹

En el caso de que se trate de una leucemia aguda secundaria a tratamiento se debe aplicar el panel de anticuerpos que se utiliza para las leucemias *de novo* teniendo en cuenta que existen casos de leucemias agudas relacionadas con el tratamiento que son de línea linfóide B.⁶⁻⁸

Citogenética

El estudio llevado a cabo por el Grupo de la Universidad de Chicago en 306 pacientes con SMD-t y LMA-t sentó las bases de las alteraciones cromosó-

micas asociadas a estos síndromes (Figura 1).³ Las alteraciones más frecuentes son las anomalías de los cromosomas 5 y 7 o de ambos, ya sean solas o en combinación con otras alteraciones, que se observan hasta en un 70% de los casos. Las translocaciones equilibradas que implican a 11q23 (*MLL*) o a 21q22 (*RUNX1*) se sitúan en torno al 6%. También encontraron anomalías usualmente asociadas a las LMA *de novo*, como la t(15;17)(q22;q12-21)/*PML-RARα* y la inv(16)(p13.1;q22)/*CBFβ/MHY11*. Otro trabajo, en el mismo ámbito, es el recientemente publicado por el Grupo Alemán, aunque éste se ha llevado a cabo sólo en pacientes con LMA-t (Figura 2).²

El estudio del cariotipo es indispensable en las neoplasias mieloides y no mieloides secundarias a tratamiento. Se encuentra un cariotipo anómalo en un 75-92% de los casos.^{2,3,22,23} Además de confirmar la sospecha diagnóstica, tiene un gran valor pronóstico. Actualmente, se consideran alteraciones asociadas a NM-t de alto riesgo: -5/del(5q), -7/7q-, inv(3)(q21q26) o t(3;3)(q21;q26), reordenamientos en 11q23 (*MLL*), t(6;9)(p23;q34) y cariotipo complejo (≥ 3 anomalías). Dentro del bajo riesgo se incluyen la pérdida del cromosoma Y, la t(8;21)(q22;q22), la t(15;17) y la inv(16)/t(16;16) en los puntos de rotura citados anteriormente.^{2,3,22,23} Sin embargo, los pacientes con NM-t y la t(8;21), la inv16 o t(16;16) tienen un pronóstico significativamente peor que los pacientes con LMA *de novo* y las mismas alteraciones.^{2,23} En cuanto a los pacientes con SMD-t y LMA-t sometidos a TPH, los pacientes con cualquier anomalía citogenética tienen mayor probabilidad de recaída a los 3 años que los pacientes con cariotipo normal.¹⁴

Aunque de momento el número de casos descritos es bajo, se han comunicado casos de leucemias linfoblásticas agudas relacionadas con tratamiento (LLA-t).⁶⁻⁸ Debido a ello, se han incorporado en la propuesta de clasificación para las neoplasias hematológicas (malignas) secundarias o relacionadas con tratamiento (NH-t). En estos casos, las alteraciones más frecuentes son las que implican al gen *MLL*, seguidas por las que presentan t(9;22)(q34;q11.2) con reordenamiento de *BCR/ABL1*.⁶⁻⁸

Biología molecular

En los pacientes con LMA-t con cariotipo normal puede ser de ayuda el estudio de anomalías moleculares como las mutaciones de la *NPM1* y la duplicación interna en tándem del *FLT3 (FLT3-ITD)*, que se han encontrado en menor frecuencia (14-16% y 12%, respectivamente) pero con la misma influencia pronóstica que en la LMA *de novo*.^{2,24} En los SMD-t, las mutaciones de la *NPM1* son todavía menos frecuentes (3,4%).²⁴

Muy recientemente, Kosmider *et al.* han estudiado las mutaciones del gen *ten-eleven translocation 2 (TET2)*

en 46 casos de LMA-t y en 201 en pacientes con LMA con cambios relacionados con la mielodisplasia (LMA_{smd}). La frecuencia de mutaciones de *TET2* en las LMA-t era más baja que en los casos de LMA_{smd} (8,7% vs. 22,3%; P = 0,035). En la serie global (LMA-t más LMA_{smd}) las mutaciones de *TET2* se asociaban a cariotipo normal (P < 0,001), hecho que nunca se ha descrito en SMD primarios y LMA *de novo*.²⁵

Quizás la aportación más interesante en estos síndromes sería la confirmación de la sospecha de que los pacientes con LMA-t, cariotipo normal y *NPM1* mutada son en realidad LMA *de novo*, es decir, que no se trata de leucemias secundarias a tratamiento sino de segundas neoplasias sin relación con los agentes citotóxicos previos. De momento, las características tan particulares de estas LMA-t así lo hacen pensar.^{24,26}

Por todo lo anteriormente descrito, se podrían clasificar las NH-t en un capítulo aparte y subclasificarlas de acuerdo con la naturaleza de las mismas y las alteraciones cromosómicas o genéticas que presenten.

Propuesta de clasificación de las neoplasias hematológicas secundarias a tratamiento (NH-t)

1. NH-t mieloides (SMD-t y LMA-t)

1. NHM-t con anomalías de los cromosomas 5 y/o 7
2. NHM-t con translocaciones de 11q23 (*MLL*) o 21q22 (*RUNX1*)
3. NHM-t con alteraciones específicas: t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1*, t(15;17)(q22;q12-21)/*PML-RARα*, inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFβ-MHY11*.
4. NHM-t con cariotipo complejo (NOS) no especificado en otro apartado
5. NHM-t con cariotipo normal y *NPM1* mutada
6. Otras

2. NH-t linfoides (LLA-t)

1. NHL-t con t(4;11)(q21;q23)/*AF4-MLL*
2. NHL-t con reordenamientos en 11q23 (*MLL*)
3. NHL-t con t(9;22)(q34;q11.2)/*BCR-ABL*
4. NHL-t con cariotipo normal
5. Otras

3. NH-t no especificadas (NOS) en apartados anteriores

Resumen

La integración de todos los datos es fundamental para el diagnóstico de las NM-t y elección del tratamiento más adecuado. Entre los datos clínicos, son muy importantes la edad del paciente, el tipo de tratamiento previo y las enfermedades asociadas en el momento del diagnóstico de la NH-t. El estudio mor-

fológico, junto con las técnicas de citoquímica, ayudará a establecer el diagnóstico de leucemia aguda o de SMD, así como la filiación de los blastos y el tipo y grado de dismielopoiesis. El inmunofenotipo permitirá establecer la proporción de blastos con características aberrantes, la naturaleza de los mismos y si existe más de una población leucémica. Además, nos proporcionará información sobre las alteraciones en la maduración y en la expresión de antígenos de la línea granulocítica y monocítica. La citogenética, obligatoria en estas enfermedades, especificará el tipo de anomalía cromosómica colaborando en la clasificación de la NM-t y en la orientación del tratamiento. Por último, en los escasos pacientes con cariotipo normal, algunas alteraciones moleculares ayudarán a establecer si se trata de una LMA-t o una LMA *de novo* (NPM1 mutado).

Agradecimientos

Luis García-Alonso ha contribuido a la realización de las figuras. Lorena Ripollés ha colaborado en el estudio de alguno de los casos clínicos. Soledad Woessnes ha revisado el texto. El trabajo de T. Vallespí ha sido subvencionado en parte por un Proyecto de Colaboración entre el Institut de Recerca Vall d'Hebrón y Celgene (expediente PR(AG)28/2008).

Referencias bibliográficas

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe E, Pileri SA, Stein H, et al. (Eds.): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
- Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne CH, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011;117:2137-2145.
- Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks R, Anastasi JM, et al. Clinical-cytogenetic association in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 2003;103:43-52.
- Vallespí T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P. Diagnosis, classification and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 1998;83:258-275.
- Navarrete M, Vallespí T, Jaramillo A, Sánchez-Morata C, Palacio A, Martínez-Morgado N, et al. Therapy-related PML-RAR α leukemia: an emerging disease. Report of 10 cases from one Department of Hematology. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009:114:421.
- Szotkowski T, Rohon P, Zapletalova L, Sicova K, Hubacek J and Indrak K. Secondary acute myeloid leukemia – a single center experience. *Neoplasma* 2010;57:170-178.
- Andersen MK, Christiansen DH, Jensen BA, Ernest P, Hauge G, Pedersen-Bjergaard J. Therapy-related acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992. *Br J Haematol* 2001;114:539-543.
- Ishizawa S, Slovak ML, Popplewell L, Bedell V, Wrede JE, Carter NH, et al. High frequency of pro-B acute lymphoblastic leukemia in adults with secondary leukemia with 11q23 abnormalities. *Leukemia* 2003;17:1091-1095.
- Chen W, Wang E, Lu Y, Gaal KK, Huang Q. Therapy-related acute lymphoblastic leukemia without 11q23 abnormality: report of six cases and a literature review. *Am J Clin Pathol* 2010;133:75-82.
- de González AB, Curtis RE, Kry SF, Gilbert E, Lamart S, Berg CD, et al. Proportion of second cancers attributable to radiotherapy treatment in adults: a cohort study in the US SEER cancer registries. *Lancet Oncol* 2001;12:353-360.
- Klimek VM, Dolezal EK, Tees MT, Stein K, Nimer SD. A retrospective analysis of responses to decitabine in therapy-related MDS patients. *Leuk Res* 2011;35(suppl1):S70(abstract).
- Voso MT, Fianchi L, Criscuolo M, Levis A, Finelli C, Musto P, et al. Response to 5-azacytidine in therapy-related malignant neoplasms (t-MN). *Leuk Res* 2011;35(suppl1):S76.
- Chang CK, Storer BE, Scott BL, Bryant EM, Shulman HM, Flowers ME, et al. Hematopoietic cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome: similar outcomes in patients with *de novo* disease and disease following prior therapy or antecedent hematologic disorders. *Blood* 2007;110:1379-1387.
- Kröger N, Brand R, van Biezen A, Zander A, Dierlamm J, Niederwieser D, et al. Risk factors for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia treated with allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2009;94:542-549.
- Kim H, García-Manero G. Clinical characteristics of therapy-related myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2011;35(suppl1):S59-S60.
- Naqvi K, García-Manero G, Sardesai S, Oh J, Vigil CE, Pierce S, et al. Association of comorbidities with overall survival in myelodysplastic syndrome: development of a prognostic model. *J Clin Oncol* 2011;29:2240-2246.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DGA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51:189-199.
- Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. *Acción Médica, S.A. y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia. Madrid* 2006 (pp:321).
- Orfao A, Matarraz S, López A, Barrena S, Fernández C, Flores J, et al. Impacto de la citometría de flujo en el diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos. *Haematologica (edición española)* 2010;95 (Extra1): 294-300.
- Cutler JA, Stolk TT, Eidenschink L, Wells DA, Loken MR. Flow cytometry analysis of erythropoiesis: The last major frontier. *Leuk Res* 2011;35 (suppl1):S43-S44.
- Della Porta MG. Standardization of flow cytometric analysis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2011;35(suppl1):S3-S4.
- Stölzel F, Pffirmann M, Aulitzky WE, Kaufmann M, Bodenstern H, Bornhäuser M, et al. Risk stratification using a new prognostic score for patients with secondary acute myeloid leukemia: results of the prospective AML96 trial. *Leukemia* 2011;25:420-428.
- Schoch C, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with the *de novo* AML. *Leukemia* 2004;18:120-125.
- Andersen MT, Andersen MK, Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. NPM1 mutations in therapy-related acute myeloid leukemia with uncharacteristic features. *Leukemia* 2008;22:951-955.
- Kosmider O, Delabesse E, de Mas VM, Cornillet-Lefebvre P, Blanchet O, Delmer A, et al. TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica* 2011 (Epub ahead of print).
- Falini B, Martelli MF, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood* 2011;117:1109-1120.
- Vallespí T and García-Alonso L. Atlas of blood cells and blood diseases: Atlas of Integrated Diagnosis in Hematology (ISSN 2014-0045. Website: www.atlasbloodcells.com/index2.php).

GENETIC AND MOLECULAR BASIS IN MYELOID NEOPLASIAS IN RELATION WITH TREATMENT

D. HAASE

Department of Hematology. University of Göttingen (Germany)

Introduction

Secondary hematologic malignancies are the most severe long-term complications of antineoplastic and immunosuppressive therapy. According to published data, therapy-associated hematoepoietic neoplasms (T-HN) – most frequently acute myeloid leukemias (AML) or myelodysplastic syndromes (MDS) - and much less frequent acute lymphoblastic leukemias (ALL), chronic myeloid leukemias (CML) or malignant lymphomas - were observed following therapy of a primary malignancy or non-malignant diseases. T-HN after Non Hodgkin's lymphomas occurred in 1.15% up to 7.4% (mean 2.5%) of patients¹⁻⁵, after Hodgkin's disease in 0.75% to 6.5% (mean 2.3%)^{1,6-10}, after breast cancer in 0.65% to 1.6% (mean: 0.9%) of patients¹¹⁻¹⁶. After multiple myeloma the maximum incidence observed was 17.4% at 50 months¹⁷ and 10% after 8 years¹⁸. In MPS treated by radioactive phosphorus the maximum observed cumulative risk was 10% after 10 years¹⁹. The risk for T-AML after cured ALL ranged between 3.8 at 6 years and 5.9 at 4 years. But also after treatment of a de novo AML, especially after acute promyelocytic leukemia²⁰ T-MDS/-AML have been observed. After therapy of

ovarian cancer the risk for T-MDS/-AML was 7.6% to 8.6% after 5 years. After testicular cancer the risk for T-MDS/-AML/-ALL ranged between 1.3% and 4.7% (see review)²¹. T-HN have also been reported after therapy of sarcomas in up to 11% at 5 years in a trial in patients with Ewing's sarcoma²² and anecdotally after therapy of lung cancer²³. Even in non-malignant conditions like autoimmune diseases or organ allografts treated with immunosuppression (e.g. with Azathioprine) an increased risk for T-HN has to be envisaged²⁴.

In general most experts expect the incidence of T-HN to further increase due to improved efficiency of antineoplastic therapy significantly improving survival on the one hand and statistically raising the probability to develop T-HN as a long-term complication on the other hand.

Among 125 therapy-associated MDS, AML and CML examined in our institution the most frequent primary malignancies were (Figure 1): Breast cancer, followed by Non Hodgkin's lymphoma, multiple myeloma, Hodgkin's disease, AML, lung cancer, ovarian cancer, cancer of the testis, and rheumatoid arthritis. 17% had miscellaneous solid tumors. These observations are in line with findings of other groups²⁵. Besides the classical therapeutic mutagens irradiation and chemotherapy, there is a growing body of evidence that also immunosuppressive therapy e.g. with azathioprine²⁴ and also cytokine therapy have the potential to contribute to the induction of T-HN after NHL²⁶ and breast cancer²⁷.

In the WHO-classification²⁸ two subtypes of T-HN are distinguished: Those with an antecedent exposure to alkylating agents and those following topoisomerase-II (topo-II) inhibitors. After alkylating therapy typically T-MDS with unbalanced abnormalities of chromosomes 5, 7, 13 and 17 occur after a relatively long latency period – often 5 to 7 years - after therapeutic exposure, while an inhibition of topoisomerase-II is associated with balanced abnormalities of chromosome bands 11q23 or 21q22 and a much shorter latency of 6 months to 3 years. It was shown by several groups that the prognostic impact of chromosome aberrations is retained in T-MDS/-AML in relation to their de novo counterparts²⁹. Referring to the applied antecedent therapy and cytogenetic features a third group has been proposed following therapy with other agents like bimolane or radiation alone

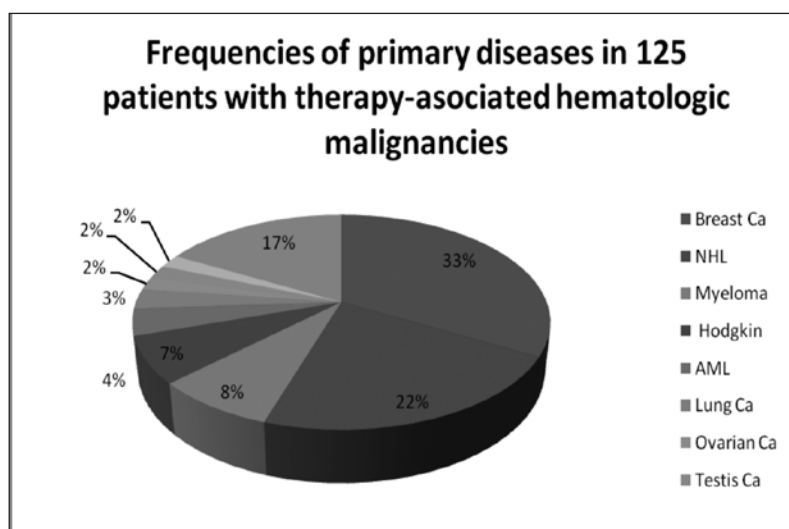


Figure 1

presenting with t(15;17) or inv(16q) after a relatively short latency period of 2-3 years³⁰.

Conventional cytogenetics

Although there is no single cytogenetic abnormality which would be specific for T-HN, quantitative differences of chromosomal abnormalities in primary vs. therapy-associated (T)-MDS do exist. The frequency of clonal aberrancies is much lower (37-50%) in de novo MDS³¹⁻³⁴ compared to 82-94% in t-MDS^{34,41,42}. Complex abnormalities and unbalanced chromosome 5- and/or 7-alterations as well as chromosome 17p-anomalies are significantly increased

in T-MDS, while sole 5q-, trisomy 8 and sole 20q- were underrepresented^{34,41,42}. In a cohort of n=116 patients with therapy-associated MDS, AML or CML examined at our institution the aberration rate was 66%. The most frequent abnormalities were complex changes (29%), followed by monosomy 7 or der(17p) (20%), CBF-like t(8;21)/inv(16) changes (12%), trisomy 8 (8%), t(15;17) (5%), del(20q) (5%), del(5q) (5%), del(9q) (5%), t(11;19) (3%), +21 (3%) and miscellaneous other changes (30%) (unpublished as yet). In a series of n=297 pts. with T-MDS/AML from the university of Chicago, 93% of patients presented with clonal abnormalities of which 70% had anomalies of chromosomes 5 and/or 7. The following other abnormalities were observed: t(11q23) in 3%, 21q22-abnormalities in 3%, t(15;17) in 2%, trisomy 8 in 3%, inv(16) in 2% -13/13q- in 1%, and del(20q), del(11q), trisomy 11, trisomy 21 and loss of Y-chromosome in 0.3% each³⁰. The most comprehensive comparative analysis of cytogenetic findings in de novo MDS, de novo AML, T-MDS, and T-AML was performed by the group of Johansson³⁴. The analysis was based on a collection of 4230 patients with AML and 1629 patients with MDS. Among these cases 14% were T-AML and 15% T-MDS. Clonal abnormalities were significantly more common in T-AML (68%) and T-MDS (84%) versus de novo AML (50%) and MDS (45%). In T-MDS/AML the number of abnormalities and the ploidy levels differed significantly from de novo cases. Complex and hypodiploid cases were more common in T-MDS/AML. In T-AML unbalanced changes in general and t(1;3), der(1;7), 3p-, -5, 5q-, -7, 7q-, t(9;11), t(11;19), t(11q23), der(12p), -17, der(17p), -18 and -21 were significantly more frequent compared to de novo AML. In T-MDS -5, -7, 7q-, 13q-, der(17p), and -18 were significantly more common. The type of prior treatment correlated significantly with the number of anomalies in T-AML. Also single abnormalities varied according to antecedent therapy such as 5q- which was associated with MDS after radiotherapy, monosomy 7 which was more common after alkylating therapies, and 11q23-translocations which were closely associated with T-AML after topoisomerase-II inhibitors³⁴. Further details are shown in Table 1. Related to del(5q), recent data imply that deleted regions in del(5q) might be different between de novo and therapy-induced cases. Boultonwood *et al.*³⁵ identified three patients with very small del(5q) deletions and reported a commonly deleted region (CDR) of 1.5 Mb within band 5q32 flanked by the loci D5S413 and GLRA1. Recently Ebert and colleagues³⁶ identified the ribosomal protein RPS14 located within this region as the relevant gene for erythropoietic defects in MDS with isolated del(5q). Haploinsufficiency of

Table 1. Incidences (%) of chromosome abnormalities in overrepresented in t-MDS and t-AML compared to de novo cases (% is related to abnormal cases) (according to ³⁴)

Abnormality	MDS de novo (n=1377)	t-MDS (n=252)	p-value*
-5	6.7	16.0	<0.001
-7	12.0	35.0	<0.001
sole -7	5.7	12.0	<0.001
7q-	5.0	9.9	0.005
loss of 5 and/or 7	45.0	70.0	<0.001
13q-	1.7	4.0	0.03
der(17p)	4	7	0.02
complex	24	39	<0.001
Abnormality	AML de novo (n=3649)	t-AML (n=581)	p-value*
3p-	0.9	2.9	<0.001
-5	4.2	13.0	<0.001
5q-	6.8	13.0	<0.001
-7	9.3	29.0	<0.001
sole -7	3.1	8.8	<0.001
7q-	4.0	6.2	0.02
der(1;7)	0.2	2.1	<0.001
loss of 5 and/or 7	20.0	49.0	<0.001
der(12p)	4.2	6.4	0.02
-17	4.7	9.1	<0.001
der(17p)	2.9	6.2	<0.001
-18	3.5	6.9	<0.001
-21	2.5	7.1	<0.001
t(1;3)(p36;q21)	0.1	0.5	0.02
t(9;11)(p22;q23)	1.8	6.0	<0.001
t(11;19)(q23;p13)	0.4	2.4	<0.001
t(11q23)	3.9	12.0	<0.001
complex	23.0	40.0	<0.001

* Calculated by chi-square test and Fisher's exact test

Table 2. Chromosomal localization and frequency of genetic imbalances by array CGH in T-AML (n=50) vs. de novo AML (n=550) (according to ³⁹)

Chromosomal region/band	Type of imbalance	Frequency in T-AML	Frequency in de novo AML
1q21 - q44	gain	6%	1.5%
1q44	loss	6%	0
3p26.3 - p12.3	loss	16%	1.9%
3q13.1 - q29	loss	8%	1%
4q27 - q31.2	loss	12%	1.2%
5q11 - q33.3	loss	86%	21%
6p25.1 - p22.1	loss	10%	2.8%
7p15.2	gain	8%	2.2%
7p22 - p14.1	loss	14%	0.7%
7q21.1 - 7q36.2	loss	48%	16%
8p23.2 - 8p12	loss	6%	0.7%
8q24.3	gain	8%	2.2%
12p13.3 - p12.3	loss	26%	6.5%
17p13.2 - 17p11.2	loss	18%	4%
17q12 - q21.31	gain	8%	1.3%
21q22.12	Loss	8%	1.7%

other genes in this CDR, also of micro RNAs might have additional impact on the phenotype of del(5q) cases. This CDR contrasts with more centromeric (band 5q31) segments found to be consistently deleted in del(5q) patients with AML and higher risk MDS, often with complex abnormalities, studied by Zhao *et al.*³⁷ and Horrigan *et al.*³⁸. Candidate genes in this region are *EGR1*, *APC*, *HSPA9*, *CTNNA1* and *DIAPH1*.

Copy number variations detected by array CGH

To investigate whether submicroscopic copy number abnormalities (CNA) differ between T-AML and de novo AML array CGH analyses were performed in 30 patients with therapy-associated and 36 patients with de novo AML³⁹. In de novo cases eight minimal critical regions (MCR) with a size ranging between 0.95 Mb to 45.96 Mb were detected compared to 12 MCR in t-AML (0.04 Mb to 36.44 Mb). The number of CNA was higher in t-AML with 63 losses and 41 gains with a mean number of 3.46 abnormalities per case in comparison to 32 losses and 37 gains with a mean number of 1.9. In de novo cases with a normal karyotype 18%

of patients displayed submicroscopic CNA in comparison to 50% of cytogenetically normal T-AML. The chromosomal localization was heterogeneous and significantly different between the two cohorts with no common minimal critical regions. In a comprehensive evaluation including own as well as published data, the group furthermore described MCR in 550 cases with de novo and 50 cases with T-AML. MCR in 50 patients with T-AML vs. 550 patients with de novo AML were differentially frequent resulting in a specific profile of genomic imbalances in T-AML (Table 2). Interestingly the three most frequently deleted chromosomal regions 5q (86%), 7q (48%), and 12p (26%) are involved in com-

parable frequencies in visible chromosomal deletions in T-HN. In T-AML patients CNA characteristics did not differ between those induced by alkylating agents versus those following topoisomerase-II inhibitors. The authors speculated that several genes of which so far only a minority were known play a significant role in T-AML (Table 3). To the best of our knowledge other whole genome analyses like SNP array profiling or next

Table 3. Chromosomal localization of genetic imbalances by array CGH and candidate genes in T-AML (according to ³⁹)

Chromosomal region/band	Type of imbalance	Candidate Gene(s)
1q44	loss	SMYD
3p14.1 - p12.3	loss	PROK2, SHQ1
4q31.2	loss	SMAD1
5q31.1	loss	CDKL3, UBE2B, DDX46
5q31.3 - q32	loss	PRELID2, TCERG1, LARS, FBXO38, POU4F1, RBM27
7p22	loss	CARD11
7p15	gain	HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10
7q21.2	loss	PFTK1
7q21.3 - q22.1	loss	mir-25, mir-93, mir-106b, MCM7, TRAPP
7q33 - q34	loss	mir-490, CREB3L2,
8q24.3	gain	PSCA, C8orf55, JRK
12p13	loss	ETV6, CDKN1B
17p13.2 - p13.1	loss	TP53
21q22.12	loss	RUNX1

generation sequencing have not been performed in T-HN systematically or in a substantial number of patients.

Gene mutations

In MDS and AML three types of mutations can be observed: 1) Activation of genes from the tyrosine kinase- *RAS/BRAF* pathway associated with increased proliferation, the so-called class I mutations, affecting genes such as *FLT3*, *cKIT*, *cFMS*, *JAK2*, *NRAS*, *KRAS*, *BRAF* or *PTPN11*, 2) inactivating mutations of transcription factor genes, such as *RUNX1*, *CBFβ*, *MLL*, *RARA*, *EVI1*, *NPM1* and *CEBPA* leading to impaired cellular differentiation (class II mutations) and 3) inactivating mutations of the tumor suppressor gene *TP53*⁴⁰. Class I mutations are considered late events in leukemic evolution and cooperate with class II mutations. Point mutations of *TP53* are the most frequent molecular defects in T-MDS/-AML, occurring in 20% to 30% of patients. Often these mutations are accompanied by other genetic alterations (deletions/microdeletions and recently described uniparental disomy) leading to loss of heterozygosity leaving no intact allele left. *TP53* mutations show a close association with complex chromosome abnormalities involving chromosomes 5 and/or 7 and/or 17p. Frequently, amplifications of the *MLL* gene in 11q23 or the *AML1/RUNX1* gene in 21q22 have been observed in these cases in the sense of cooperating genetic alterations⁴¹. Mutations of *AML1/RUNX1* belong to the most frequent molecular alterations in T-MDS/-AML and have been observed in 15.7% of 140 patients with T-AML/-MDS. These mutations were furthermore found to be associated with -7/7q- and increased risk for leukemic transformation⁴². All the above mentioned genes have been found to be mutated in T-MDS/-AML in varying frequencies. An overview is given in Table 4. Reliable data concerning the role of recently identified gene mutations in de novo MDS (e.g. affecting *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1* and 2, *EZH2* and *UTX*) are not available for therapy-associated MDS as yet (reviewed in⁴³).

Epigenetic findings

The epigenetic modification of molecular pathways by aberrant promoter methylation has gained increasing interest during the last years. Methylation of the promoter of *p15INK4B* localized in 9p21 has been observed in 55 of 81 patients with T-MDS/-AML. This was significantly associated with therapy-associated MDS evolving to AML and thus presenting as a late-occurring genetic event. This abnormality was fur-

thermore found to be associated with chromosome 7-abnormalities⁴⁴⁻⁴⁶.

Recently, an Italian group examined the methylation status of key promoter regions in de novo and therapy-associated AML and MDS⁴⁷. In their comparative study of 385 patients (105 de novo MDS, 208 de novo AML, 45 T-MDS and 27 T-AML) they used a methylation-specific PCR to analyze the promoter-methylation status of E-cadherin (*CDH1*), thrombospondin1 (*TSP1*) and DAP-Kinase 1 (*DAPK1*). They found out that *DAPK1* was significantly more frequently methylated in T-MDS/AML compared to the de novo cases (p=0.0001). Methylation of *CDH1* was equal in T-MDS/AML and de novo AML but less frequent in de novo MDS (p=0.003). *TSP1* was only rarely methylated and not associated with T-MDS/AML (Table 5). In 177 pts. all three promoters were examined parallelly revealing that t-MDS/AML and de novo AML showed more frequently multiple hypermethylations as compared to de novo MDS.

Gene expression profiling

An expression profiling of CD34+ hematopoietic bone marrow cells was performed in 14 patients with T-AML by Qian and co-workers⁴⁸. Eleven (79%) of these patients had clonal cytogenetic aberrations. Gene expression profiles of these patients were compared with those of 3 healthy controls. A total of 2.945 genes, expressed in CD34+ cells, were analyzed according to their expression levels. By this procedure common features for T-AML and two major groups – and one subgroup could be identified (Table 6): Group A consisted of cases with monosomy 7 but no chromosome 5 anomaly, group A1 contained cases with a normal karyotype or trisomy 13 and group B was defined by chromosome 5 abnormalities within a complex karyotype. A common feature of all T-AML was the down-regulation of genes for differentiated functions of hematopoietic cells such as the serine proteases *CTSG*, *ELA2*, *PRTN3*, and *AZU1*, myeloperoxidase and the platelet-specific proteins *PF4* and *PPBP*. Down-regulation of these genes is suggestive for a maturation arrest and trilineage dysplasia characteristic for T-AML. Ten genes essential for the differentiation of neutrophils, eosinophils and platelets were expressed in the normal controls but not in T-AML. Group A1 showed a significant down-regulation of transcription factors involved in hematopoietic differentiation in comparison to group B leukemias and overexpression of *FLT3*, *PIK3* and the antiapoptotic gene *BCL-2*. According to the general molecular pathways in AML defined by Gilliland⁴⁹ loss of *TAL1*, *GATA1* and *ELKF* expression in group A1 could be associated with impaired differentiation while overexpression of *FLT3*, *PIK3C2B*, and *BCL2* would be part of the

proliferative and immortality component of the AML model. While the initiating mutations in groups A and A1 remained undetermined, Quian and colleagues speculated that mutations and/or haploisufficiency of genes located on chromosome 5q might be initiating events in type B leukemias.

Genetic pathways

Only limited data is available describing early mechanisms after exposure to leukemogenic therapy and before occurrence of clonal genetic alterations.

In a prospective investigation by RT-PCR with a sensitivity of 10⁻⁴ to 10⁻⁵ Bäsecke *et al.*⁵⁰ demonstrated that molecular aberrations (*RUNX/RUNX1*, *PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *MLL-MLLT1*, *BCR-ABL* fusions) were induced dose-dependently in 46% of 95 patients by intermediate or high-dose chemotherapy of aggressive lymphoma. The earliest observations were made during therapy, the latest 14 months after end of therapy. Cytogenetic analyses were performed in 53 patients after high dose chemotherapy revealing increased chromosomal breakage in 19% and clonal abnormalities in 6%. All molecular aberrations and clonal cytogenetic anomalies were transient. During clinical follow-up no patient developed T-HN. It was concluded that the observed abnormalities were not predictive for T-MDS/AML but reflect a general chemotherapy-induced genotoxicity occurring in a substantial portion of patients not representing expanding aberrant cell clones⁵⁰. These findings are compatible with in vitro and in vivo findings after treatment of CD34+ cells with etoposide showing rapid induction of translocations involving *MLL* with a subsequent extinction of most but not all of these cell populations⁵¹.

An early step in leukemogenesis may be accelerated telomere shortening in myeloid cells. This was demonstrated in a prospective comparative study of 9 patients after high dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation for malignant lymphoma later developing T-MDS/AML and 24 matched controls. It was shown that accelerated telomere shortening was an independent risk factor for the development of T-MDS/AML. It was concluded that telomere dysfunction may be due to increased clonal proliferation and/or disturbed telomere regulation in premalignant cells⁵². Telomere shortening can trigger genetic instability by promoting chromosomal end-to-end fusions

Table 4. Frequency of gene mutations in de novo and T-MDS/-AML (according to ⁴¹)

Type of Gene	Gene mutations	T-MDS/AML (%)	De novo MDS (%)	De novo AML (%)
Tumor suppressor	<i>TP53</i> p.m.	20-3	5-10	10-15
Tyrosine kinases	<i>FLT3</i> i.t.d.	rare/10	rare	35-50
	<i>JAK2</i> p.m.	2-5/rare	2-5	rare
RAS/BRAF pathway	<i>KRAS/NRAS</i> p.m.	10	10	10
	<i>PTPN11</i> p.m.	3-5	3-5	3-5
Transcription factors	<i>AML1/RUNX1</i>	17-32/7-10	10-15	12-20
	c.r./p.m.	4-5/15	rare	40-50
	<i>NPM1</i> p.m.	rare/5-7	rare	5-7
	<i>MLL</i> c.r.	rare/2-3	rare	5-8
	<i>CBFB</i> c.r.	rare/2-3	rare	2-3
	<i>RARA</i> c.r.	rare/2-3	rare	2-3
	<i>EVI1</i> c.r.	rare/rare	rare	15-20

Legend: p.m. = point mutations, i.t.d. = internal tandem duplications, c. r. = chimeric rearrangements (e.g. translocations and inversions leading to fusion genes)

and as a consequence gene deletions or amplifications can arise^{53,54}.

The induction of clonal abnormalities can sometimes be observed very soon after start of therapy. As an example the emergence of cells with a topo-II-inhibitor induced *MLL-ENL* fusion (molecular manifestation of t(11;19)(q23;p13.3) could be retrospectively demonstrated in a child treated for acute lymphoblastic leukemia only 6 months after start of therapy by PCR⁵⁵. In another case report of a T-AML in a 13 years-old child with neuroblastoma a cryptic t(11;17)(q23;p13) (*MLL-GAS7*-fusion) was tracked back only 1.5 months after start of therapy. In their discussion the authors made the very interesting point that alternatively to an induction by the topo-II-inhibitor the chemotherapy might have selected for a translocation that was already present before therapy but below the detection level of PCR, which would be in line with previous proofs of *MLL* tandem duplications in healthy subjects⁵⁶.

In a comprehensive model considering cytogenetic findings and molecular mutations of 14 different genes (Table 4) eight distinct genetic pathways in the pathogenesis of T-MDS/AML had been defined by Pedersen-Bjergard⁴¹. Pathway I is defined by monosomy 7/del(7q), normal chromosomes 5, and lack of balanced aberrations. On the molecular level *AML1/RUNX1* point mutations are frequent and associated with rapid pro-

Table 5. Frequency of promoter methylation in patients with de novo and T-MDS/AML (according to ⁴⁷)

Gene	T-MDS/AML	De novo MDS	De novo AML
<i>DAPK1</i>	39%	15.3%	24.4%
<i>CDH1</i>	51%	29%	53.4%
<i>TSP1</i>	6%	5.7%	7.2%

Table 6. Subgroups of T-AML, defined by cytogenetic and gene expression analyses (according to ⁴⁸)

Subgroup	Cytogenetic features	Down-regulated genes	Up-regulated genes	Biologic consequences/remarks
A	monosomy 7, no chromosome 5 anomaly		<i>CCNA2, CCNE2, CDC2, BUB1, CKS2, MYC</i>	Increased proliferation
A1	Normal karyotype, trisomy 13	<i>TAL/1SCL, GATA1, ELKF</i>	<i>FLT3, PIK3, BCL2</i>	Down-regulated genes are transcription factors regulating hematopoiesis leading to impaired differentiation Up-regulated genes involved in hyperproliferation and immortalisation
B	complex anomalies containing abnormal chromosomes 5	<i>NRC1, APC, CYFIP2, IQGAP2, DOCK2, ADRB2, CSPG2, U30521, HSPC16</i> Lack of <i>ICSBP</i>		All genes located on 5q were down-regulated in cases with loss of 5q (gene dosage effect?) Deregulated proliferation and differentiation

gression to overt AML. These cases typically present as MDS after alkylating therapy. Pathway II includes patients with loss of chromosome 5 material often as part of complex abnormalities but without balanced aberrations. Occasionally, monosomy 7 or del(7q) is observed in these cases. On the molecular level this pathway is characterized by *TP53* mutations. Pathway III is clearly defined by balanced abnormalities involving chromosome band 11q23 and on the molecular level the *MLL* gene. Cooperating mutations of *NRAS*, *KRAS* or *BRAF* are common. By cytomorphology these cases are mainly FAB 4 or 5 AML. This pathway is significantly associated with topoisomerase-II inhibitors. Pathway IV is cytogenetically characterized by balanced abnormalities of 21q22 or 16q22 harbouring the genes *RUNX1* and *CBFB* respectively. These cases mainly present as AML and are frequently observed after anthracycline chemotherapy. Pathway V comprises patients with balanced rearrangements of 17q21 with involvement of the retinoic acid receptor presenting with acute promyelocytic leukemia. Frequently *FLT3* tandem duplications can be observed as additional molecular alterations. These cases are often observed after adjuvant therapy of breast cancer with mitoxantrone. Pathway VI is characterized by balanced rearrangements affecting chromosome band 11p15 harbouring the *NUP98* gene. To date no cooperating mutations are known. This pathway is closely related to topo-II inhibitor therapy. Pathway VII comprises patients with a normal karyotype. In these patients point mutations of *NRAS*, and internal tandem duplications of *MLL* have been observed. Hopefully, future whole genome sequencing strategies will be able to delineate the molecular background in these patients. These cases often are clinically atypical and lack a clear association with an antecedent therapy. Pathway VIII contains patients with other chromosomal changes such as trisomy 8. In these cases accompanying gene mutations are rare. Only a few cases with mutations of genes involved in the *RAS-BRAF* signalling pathway have been observed.

Cooperations of gene mutations have been dissected in T-MDS/-AML with an association of Class I (activating mutations of receptor tyrosine kinases leading to increased cell proliferation) and class II (inactivating mutations of transcription factor genes leading to impaired differentiation) genes in 25 of 140 patients with T-MDS or T-AML. The observed associations were *NPM1* with *FLT3*, *RUNX1* with *cKIT* and *RARA* with *FLT3*⁵⁷.

Predisposing genetic factors

Parameters which might allow an estimation of the individual risk to develop a therapy-induced neoplasia are urgently needed. Thus, during the last decade much effort has been put into the delineation of predisposing host-related genetic factors such as polymorphisms of detoxification - and DNA-repair genes.

The so-called xenobiotic metabolizing enzymes (XME) are essential for the detoxification of drugs and other foreign compounds. They protect the organism against environmental toxins and regulate the metabolism of drugs. Table 6 gives an overview of antineoplastic agents and related detoxification/repair enzymes. Two phases of detoxification have been defined. Phase I reactions are related to the cytochrome P-450 enzyme system which is involved in oxidative reactions leading to polar and reactive metabolites. Phase II reactions are performed by several superfamilies of enzymes including sulfotransferases, glucuronosyltransferases, NAD(P)H:quinine oxidoreductase (NQO), epoxide hydrolases (EPH), glutathione S-transferases (GST) and N-acetyltransferases (NAT). Phase II reactions are important for metabolization or conjugation of reactive metabolites and thus enhancing hydrophilicity and finally biliary or urinary excretion (reviewed in ⁵⁸). One of the most abundant Phase I enzymes is the isoenzyme CYP3A4 involved in metabolization of epipodophyllotoxins, etoposide, teni-

Table 7. Antineoplastic therapies and related detoxification/DNA-repair enzymes (according to ⁵⁸)

Type of therapy	Substance	GST	CYP-Isoenzyme	DNA-repair enzyme
Alkylating agents	Mechlorethamine	GSTT1 GSTM1/GSTP1	CYP2B6 CYP2C19 CYP3A4	MGMT BER (RAD51) (XRCC3)
	Cyclophosphamide			
	Melphalan			
	Busulphan BCNU, CCNU			
Topoisomerase-I inhibitors	Topotecan		CYP3A4	NHEJ
	Irinotecan			
Topoisomerase-II inhibitors	Mitoxantrone	(GSTP1)	CYP1B1 CYP3A4	NHEJ (RAD51) (XRCC3)
	Daunorubicin			
	Doxorubicin			
	Etoposide Teniposide			
Ionizing radiation				(RAD51) (XRCC3)

poside, cyclophosphamide, ifosfamide, vinblastine, and vindesine. Felix et al. found a variant of the 5' promoter region (CYP3A4-V) in 19 of 99 patients with de novo AML and in only 1 of 30 patients with T-AML. The variant was absent in patients with anomalies of the MLL gene. It was speculated that the CYP3A4 wildtype is associated with increased production of reactive toxic intermediates leading to an increased risk for T-AML⁵⁹. An association between defects in the *NQO1* pathway and occurrence of clonal hematopoiesis, accelerated telomere shortening, and increased oxidative stress has been described by Fern and colleagues in patients after conventional chemotherapy. The findings were interpreted as defining possible risk factors for T-MDS/-AML⁶⁰. Larson and co-workers observed a higher frequency of individuals homozygous for the *NQO1* 609 C→T polymorphism in T-AML (11%) vs. de novo AML (4%). In patients with chromosome 5 and/or 7 abnormalities or in those treated with alkylating agents this difference was even more pronounced⁶¹. In infant T-ALL, supposed to occur in utero, maternal carcinogenic exposure is assumed. In this connection an increased frequency of MLL translocations and the *NQO1* C609T polymorphism was reported⁶². Polymorphisms of isoenzymes of the GST family were also reported to be associated with an increased risk for T-MDS/AML. This was demonstrated for Japanese patients with the GSTT1 null genotype by Sasai and co-workers⁶³. Our group could observe a significant overrepresentation of combined homozygous deletions of GSTT1 and GSTM1 in 44 patients with T-MDS/-AML after breast cancer (55%) treated with chemo- and/or radiotherapy in comparison to 239 healthy controls (8%, $p=0.0003$)⁶⁴. In a study of 89 T-AML, 420 de novo AML and 1022 matched controls Allan et al. found no association of GSTM1 or GSTT1 with T-AML, however this group observed a significant overrepresentation of the GSTP1 codon 105 Val

allele in patients with T-AML and antecedent therapy with known GSTP1 substrates⁶⁵.

Other important risk factors for T-MDS/-AML are defects in DNA-repair. Double strand breaks represent the most severe and important type of DNA damage. They can lead to cell death or loss of genetic material thus fostering chromosomal aberrancies. The most intensively examined double strand DNA-repair enzymes in relation to therapy-induced MDS/AML are *RAD51* and *XRCC3*. For both enzymes

polymorphisms with an impact on the repair function – *RAD51*-G135C and *XRCC3*-241 MET - are known (reviewed in ⁵⁸). Seedhouse and co-workers found a significantly higher incidence of the *RAD51*-G135C polymorphism in 51 T-AML patients compared to matched normal controls resulting in a 2.7 fold increased AML risk. The risk was substantially higher when both polymorphisms - *RAD51*-G135C and *XRCC3*-241 MET were present in one and the same individual with an 8.1 fold risk for T-AML⁶⁶. Microsatellite instability (MSI) is a hallmark of mismatch-repair defects⁵⁸. In a case-control study of 420 patients with de novo AML, 91 with T-AML and 837 matched controls Worillow et al. found a low incidence of MSI in de novo AML in comparison to 38% MSI-positive cases in 34 patients with T-AML⁶⁷. These data are in line with findings of other groups⁶⁸. If already a single deficient component of the detoxification/repair complex can significantly increase the risk for T-HN it is of special interest whether combined defects occur and which impact they would have on the leukemia/MDS risk. This was investigated by the group of Seedhouse who observed a triple combined defect – *GSTM1* null genotype + *RAD51*-G135C + *XRCC3*-241 MET in 12 (5.6%) of 216 de novo AML, resulting in a 15.3 fold risk for AML. Respective calculations referring to T-AML patients were not possible due to the low number of patients⁶⁶.

Very recent results of proteome analysis by NMR spectroscopy imply that dysfunctions in several metabolic pathways are associated with an increased risk for T-MDS/AML after autologous hematopoietic stem cell transplantation for malignant lymphoma. Non-parametric tests and multivariate analysis were performed to compare metabolite patterns of peripheral blood stem cells in 6 patients developing T-MDS within 5 years after transplantation with those of 6 patients that did not. The critical patterns identified by

this approach include metabolic pathways leading to mitochondrial dysfunction. As a consequence the capacity for detoxification of oxygen radicals generated by irradiation and chemotherapy is decreased favouring leukemogenic mutations. The authors hypothesized that the observed dysfunctions could be caused by therapeutic exposure before stem cell transplantation, transplant conditioning, autograft collection and hematopoietic regeneration⁶⁹. The conclusions obtained from the proteome analyses are supported by microarray gene expression profiling of the same patients cohort using a larger sample size which identified the same cellular metabolic pathways as risk factors for T-MDS⁷⁰.

Conclusions

Therapy-induced hematologic neoplasms represent the most severe long-term complication of antineoplastic therapy with breast cancer as the leading primary malignancy. It is anticipated that the incidence will further increase in future. On the cytogenetic level T-HN are well characterized. They can be subdivided into at least two subgroups according to the cytogenetic profile and the antecedent therapy with distinct prognosis. The introduction of array CGH has enabled a more comprehensive characterization of copy number variations additive to conventional cytogenetics at a submicroscopic level displaying new critical chromosomal regions. A lot of candidate genes now have been identified which will be promising as targets for further investigations and innovative therapeutic strategies. The same holds true for epigenetic - and gene expression analyses. Knowledge of the multistep pathogenesis spanning from cellular damage to clonal therapy-induced malignancy now is increasing with impressive data about the rapidity of the leukemogenic process in vivo. A very clear picture of the genetic mechanisms behind the development of T-HN has been condensed with as yet 8 clearly distinct pathways. It has also become evident that host factors such as constitutional impairment of metabolism of foreign compounds and DNA-repair contribute substantially to the development of T-HN and provide the opportunity to define patient cohorts at risk and to develop strategies to rescue these patients from therapy-associated malignancies.

References

- van Leeuwen FE, Chorus AM, van den Belt-Dusebout AW, Hagenbeek A, Noyon R, van Kerkhoff EH, et al. Leukemia risk following Hodgkin's disease: relation to cumulative dose of alkylating agents, treatment with teniposide combinations, number of episodes of chemotherapy, and bone marrow damage. *J Clin Oncol.* 1994 May;12(5):1063-73.
- Lavey RS. Acute nonlymphocytic leukemia after radiation and MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol.* 1990 Dec;8(12):2089-90.
- Pedersen-Bjergaard J, Ersboll J, Sorensen HM, Keiding N, Larsen SO, Philip P et al. Risk of acute nonlymphocytic leukemia and preleukemia in patients treated with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphomas. Comparison with results obtained in patients treated for Hodgkin's disease and ovarian carcinoma with other alkylating agents. *Ann Intern Med* 1985;103:195-200.
- Friedberg JW, Neuberg D, Stone RM, Alyea E, Jallow H, LaCasce A et al. Outcome in patients with myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 1999 Oct;17(10):3128-35.
- Milligan DW, Ruiz De Elvira MC, Kolb HJ, Goldstone AH, Meloni G, Rohatiner AZ et al. Secondary leukaemia and myelodysplasia after autografting for lymphoma: results from the EBMT. EBMT Lymphoma and Late Effects Working Parties. *European Group for Blood and Marrow Transplantation. Br J Haematol* 1999;106:1020-26.
- Henry-Amar M. Second cancer after the treatment for Hodgkin's disease: a report from the International Database on Hodgkin's Disease. *Ann Oncol.* 1992 Sep;3 Suppl 4:117-28.
- Brusamolino E, Anselmo AP, Klersy C, Santoro M, Orlandi E, Pagnucco G, et al. The risk of acute leukemia in patients treated for Hodgkin's disease is significantly higher after [see bined modality programs than after chemotherapy alone and is correlated with the extent of radiotherapy and type and duration of chemotherapy: a case-control study. *Haematologica.* 1998 Sep;83(9):812-23.
- Pedersen-Bjergaard J, Specht L, Larsen SO, Ersbøll J, Struck J, Hansen MM et al. Risk of therapy-related leukaemia and preleukaemia after Hodgkin's disease. Relation to age, cumulative dose of alkylating agents, and time from chemotherapy. *Lancet.* 1987 Jul 11;2(8550):83-8.
- Schellong G, Riepenhausen M, Creutzig U, Ritter J, Harbott J, Mann G et al. Low risk of secondary leukemias after chemotherapy without mechlorethamine in childhood Hodgkin's disease. German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Group. *J Clin Oncol.* 1997 Jun;15(6):2247-53.
- Scholz M, Engert A, Franklin J, Josting A, Diehl V, Hasenclever D, Loeffler M; German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Impact of first- and second-line treatment for Hodgkin's lymphoma on the incidence of AML/MDS and NHL—experience of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group analyzed by a parametric model of carcinogenesis. *Ann Oncol.* 2011 Mar;22(3):681-8. Epub 2010 Aug 18.
- Andersson M, Storm HH, Mouridsen HT. Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen therapy and radiotherapy for early breast cancer. *J Natl Canc Inst* 1991;83:1013-17.
- Diamandidou E, Buzdar AU, Smith TL, Frye D, Witjaksono M, Hortobagyi GN. Treatment-related leukaemia in breast cancer patients treated with fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide combination adjuvant chemotherapy: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol* 1996;14:2722-30.
- DeCillis A, Anderson S, Bryant J, Wickerham DL, Fisher B. Acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) on NSABP B-25: an update. *Proc Am Soc Clin Oncol*;...A459 1997.
- Saso R, Kulkarni S, Mitchell P, Treleaven J, Swansbury GJ, Mehta J et al. Secondary myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia following mitoxantrone-based therapy for breast carcinoma. *Br J Cancer* 2000;83:91-4.
- Bernard-Marty C, Mano M, Paesmans M, Accettura C, Munoz-Bermeo R, Richard T et al. Second malignancies following adjuvant chemotherapy: 6-years results from a Belgian randomized study comparing cyclophosphamide, meth-

- otrexate and 5-fluorouracil (CMF) with an anthracycline-based regimen in adjuvant treatment of node-positive breast cancer patients. *Ann Oncol* 2003;14:693-8.
16. Crump M, Dongsheng T, Shepherd L, Levine M, Bramwell V, Pritchard K. Risk of acute leukaemia following epirubicin-based adjuvant chemotherapy: A report from the national cancer institute of Canada clinical trials group. *J Clin Oncol* 2003;21:3066-71.
 17. Bergsagel DE, Bailey AJ, Langley GR, MacDonald RN, White DF, Miller AB. The chemotherapy on plasma-cell myeloma and the incidence of acute leukemia. *N Engl J Med*. 1979 Oct 4;301(14):743-8.
 18. Cuzick J, Erskine S, Edelman D, Galton DA. A comparison of the incidence of the myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia following melphalan and cyclophosphamide treatment for myelomatosis. A report to the Medical Research Council's working party on leukaemia in adults. *Br J Cancer*. 1987 May;55(5):523-9.
 19. Brandt L, Anderson H. Survival and risk of leukaemia in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia treated with oral radiophosphorus: are safer drugs available? *Eur J Haematol*. 1995 Jan;54(1):21-6.
 20. Zompi S, Legrand O, Bouscary D, Blanc CM, Picard F, Casadevall N et al. Therapy-related acute myeloid leukaemia after successful therapy for acute promyelocytic leukaemia with t(15;17): a report of two cases and a review of the literature. *Br J Haematol*. 2000 Sep;110(3):610-3.
 21. Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica*. 1999 Oct;84(10):937-45.
 22. Bhatia S, Krailo MD, Chen Z, Burden L, Askin FB, Dickman PS et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone: A report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):46-51. Epub 2006 Sep 19.
 23. Griesinger F, Metz M, Trümper L, Schulz T, Haase D. Secondary leukaemia after cure for locally advanced NSCLC: alkylating type secondary leukaemia after induction therapy with docetaxel and carboplatin for NSCLC IIIB. *Lung Cancer*. 2004 May;44(2):261-5.
 24. Kwong YL. Azathioprine: association with therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *J Rheumatol*. 2010 Mar;37(3):485-90. Epub 2010 Jan 15.
 25. Pagano L, Pulsoni A, Mele L, Tosti ME, Cerri R, Visani G et al. Acute myeloid leukemia in patients previously diagnosed with breast cancer: experience of the GIMEMA group. *Ann Oncol*. 2001 Feb;12(2):203-7.
 26. Gruschus SK, Lairson D, Dunn JK, Risser J, Du XL. Use of white blood cell growth factors and risk of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome among elderly patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*. 2010 Nov 15;116(22):5279-89. doi: 10.1002/cncr.25525.
 27. Le Deley MC, Suzan F, Cutuli B, Delaloue S, Shamsaldin A, Linassier C et al. Anthracyclines, mitoxantrone, radiotherapy, and granulocyte colony-stimulating factor: risk factors for leukemia and myelodysplastic syndrome after breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 20;25(3):292-300. Epub 2006 Dec 11.
 28. Vardiman JW (2010), "The World Health Organisation (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*; 184: 50-57.
 29. Singh ZN, Huo D, Anastasi J, Smith SM, Karrison T, Le Beau MM et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome: morphologic subclassification may not be clinically relevant. *Am J Clin Pathol*. 2007 Feb;127(2):197-205.
 30. Godley and Larson. The syndrome of therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia. In *The Myelodysplastic Syndromes* (2002) ed. John Bennett, pp139-176, Marcel Dekker inc, New York.
 31. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):2079-88. Erratum in: *Blood* 1998 Feb 1;91(3):1100.
 32. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005;90:1168-1178.
 33. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstöcker M, Nösslinger T, Hildebrandt B, Kündgen A, Lübbert M, Kunzmann R, Giagounidis AAN, Aul C, Trümper L, Krieger O, Stauder R, Müller TH, Wimazal F, Valent P, Fonatsch C, Steidl C (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110:4385-4395.
 34. Mauritzson N, Albin M, Rylander L, Billström R, Ahlgren T, Mikoczy Z et al. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. *Leukemia*. 2002 Dec;16(12):2366-78.
 35. Boulwood J, Fidler C, Strickson AJ, Watkins F, Gama S, Kearney L et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*. 2002;99:4638-4641.
 36. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17;451(7176):335-9.
 37. Zhao N, Stoffel A, Wang PW, Eisenbart JD, Espinosa R 3rd, Larson RA et al. Molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases to 1-1.5 Mb and preparation of a PAC-based physical map. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:6948-6953.
 38. Horrigan SK, Westbrook CA, Kim AH, Banerjee M, Stock W, Larson RA. Polymerase chain reaction-based diagnosis of del (5q) in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome identifies a minimal deletion interval. *Blood*. 1996;88:2665-2670.
 39. Itzhar N, Dessen P, Toujani S, Auger N, Preudhomme C, Richon C et al. Chromosomal minimal critical regions in therapy-related leukemia appear different from those of de novo leukemia by high-resolution aCGH. (2011), *PLoS ONE*, 6(2): e16623. Doi:10.1371/journal.pone.0016623.
 40. Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):740-4.
 41. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:392-7.
 42. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood*. 2004 Sep 1;104(5):1474-81. Epub 2004 May 13.
 43. Tiu RV, Visconte V, Traina F, Schwandt A, Maciejewski JP. Updates in cytogenetics and molecular markers in MDS. *Curr Hematol Malig Rep*. 2011 Jun;6(2):126-35.
 44. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1315-25. Epub 2008 Oct 2.
 45. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002 Mar 15;99(6):1909-12.
 46. Au WY, Fung A, Man C, Ma SK, Wan TS, Liang R, Kwong YL. Aberrant p15 gene promoter methylation in therapy-re-

- lated myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations. *Br J Haematol.* 2003 Mar;120(6):1062-5.
47. Greco M, D'Alò F, Scardocci A, Criscuolo M, Fabiani E, Guidi F et al. Promoter methylation of DAPK1, E-cadherin and thrombospondin-1 in de novo and therapy-related myeloid neoplasms. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Oct 15;45(3):181-5. Epub 2010 Jul 24.
 48. Qian Z, Fernald AA, Godley LA, Larson RA, Le Beau MM. Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 12;99(23):14925-30. Epub 2002 Nov 4.
 49. Kelly L, Clark J, Gilliland DG. Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Oncol.* 2002 Jan;14(1):10-8.
 50. Basecke J, Podleschny M, Becker A, Seiffert E, Schwiers I, Schwiers R et al. Therapy-associated genetic aberrations in patients treated for non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2008 Apr;141(1):52-9.
 51. Libura J, Slater DJ, Felix CA, Richardson C. Therapy-related acute myeloid leukemia-like MLL rearrangements are induced by etoposide in primary human CD34+ cells and remain stable after clonal expansion. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2124-31. Epub 2004 Nov 4.
 52. Chakraborty S, Sun CL, Francisco L, Sabado M, Li L, Chang KL et al. Accelerated telomere shortening precedes development of therapy-related myelodysplasia or acute myelogenous leukemia after autologous transplantation for lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009 Feb 10;27(5):791-8. Epub 2009 Jan 5.
 53. De Lange T. Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:197-204.
 54. Feldser DM, Hackett JA, Greider CW. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer.* 2003 Aug;3(8):623-7.
 55. Blanco JG, Dervieux T, Edick MJ, Mehta PK, Rubnitz JE, Shurtleff S et al. Molecular emergence of acute myeloid leukemia during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 28;98(18):10338-43.
 56. Megonigal MD, Cheung NK, Rappaport EF, Nowell PC, Wilson RB, Jones DH et al. Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2814-9.
 57. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2006 Nov;20(11):1943-9. Epub 2006 Sep 21.
 58. Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica.* 2007 Oct;92(10):1389-98.
 59. Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13176-81.
 60. Fern L, Pallis M, Ian Carter G, Seedhouse C, Russell N, Byrne J. Clonal haemopoiesis may occur after conventional chemotherapy and is associated with accelerated telomere shortening and defects in the NQO1 pathway; possible mechanisms leading to an increased risk of t-AML/MDS. *Br J Haematol.* 2004 Jul;126(1):63-71.
 61. Larson RA, Wang Y, Banerjee M, Wiemels J, Hartford C, Le Beau MM et al. Prevalence of the inactivating 609C->T polymorphism in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood.* 1999 Jul 15;94(2):803-7.
 62. Smith MT, Wang Y, Skibola CF, Slater DJ, Lo Nigro L, Nowell PC et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4590-3. Epub 2002 Aug 1.
 63. Sasai Y, Horiike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Fujii H, et al. Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. *Leuk Res.* 1999 Nov;23(11):975-81.
 64. Haase D, Binder C, Büniger J, Fonatsch C, Streubel B, Schnittger S et al. Increased risk for therapy-associated hematologic malignancies in patients with carcinoma of the breast and combined homozygous gene deletions of glutathione transferases M1 and T1. *Leuk Res.* 2002 Mar;26(3):249-54.
 65. Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ et al. Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):11592-7. Epub 2001 Sep 11.
 66. Seedhouse C, Faulkner R, Ashraf N, Das-Gupta E, Russell N. Polymorphisms in genes involved in homologous recombination repair interact to increase the risk of developing acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 15;10(8):2675-80.
 67. Worrillow LJ, Travis LB, Smith AG, Rollinson S, Smith AJ, Wild CP et al. An intron splice acceptor polymorphism in hMSH2 and risk of leukemia after treatment with chemotherapeutic alkylating agents. *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 1;9(8):3012-20.
 68. Rund D, Krichevsky S, Bar-Cohen S, Goldschmidt N, Kedmi M, Malik E et al. Therapy-related leukemia: clinical characteristics and analysis of new molecular risk factors in 96 adult patients. *Leukemia.* 2005 Nov;19(11):1919-28.
 69. Cano KE et al. (2011) *J Proteome Res*, DOI: 10.1021/pr200200y. Publication date (Web): 21 April 2011.
 70. Li L, Sun CL, Sabado MD, Francisco L, McDonald T, Chang KL et al. Gene Expression Changes in CD34+ Cells Precede Development of Therapy-Related Leukemia (t-MDS/AML) After Autologous Hematopoietic Cell Transplantation (aHCT) for Hodgkin (HL) or Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) (2009) *Blood*, ASH Annual Meeting Abstracts, 114 (22), 677.

ASPECTOS CLÍNICOS, PRONÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS DE LAS NEOPLASIAS MIELOIDES RELACIONADAS CON LA TERAPIA

J. ESTEVE REYNER, M. PRATCORONA CANELA,
M. DÍAZ BEYÁ

*Servicio de Hematología. IDIBAPS. Hospital Clínic.
Barcelona*

Concepto

Bajo la definición de neoplasia mieloide relacionada con tratamiento (NM-t) reconocida en la última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2008) se agrupan síndromes mielodisplásicos (SMD-t), leucemia mieloide aguda (LMA-t) y neoplasias mielodisplásicas-mieloproliferativas (NMP-t) que aparecen

tras la exposición previa a agentes quimioterápicos y/o radiaciones ionizantes¹. La misma definición de NM-t comprende un extenso abanico de entidades nosológicas y un amplio repertorio de potenciales agentes causantes, lo que condiciona la gran heterogeneidad biológica y clínica de estas enfermedades.

Los potenciales agentes causantes pueden sistematizarse en grandes familias de fármacos, entre los que destacarían agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa II, radiaciones ionizantes y otros agentes como antimetabolitos, agentes antitubulínicos o fármacos inmunosupresores. Un aspecto interesante en este contexto es el de la vigilancia epidemiológica para un reconocimiento del potencial leucemógeno de nuevos fármacos introducidos en la práctica clínica, como serían los diversos agentes radioinmunoterápicos que combinan un anticuerpo monoclonal con isótopos radioactivos, utilizados mayoritariamente en el tratamiento de neoplasias linfoides, y cuyo potencial leucemogénico es incierto. Por otra parte, cabe considerar este grupo de enfermedades (NM-t) como una secuela de incidencia creciente debido a la prolongación de la supervivencia en enfermos de cáncer. Las neoplasias primarias más frecuentes son las neoplasias de mama y linfomas en adultos. Aunque difícil de precisar, el riesgo de desarrollo de NM-t tras el tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia se sitúa entre el 0 y el 10%. Por otra parte, porcentaje de LMA-t puede situarse en la actualidad cerca del 5%^{2,3}.

Etiología: mecanismos de leucemogénesis

La heterogeneidad las NM-t es debida a la diversidad de los fármacos causantes y a la especificidad de los mecanismos de leucemogénesis asociados a estos fármacos (Tabla 1). Así, los agentes alquilantes y las radiaciones ionizantes se han asociado a NM-t asociadas a pérdidas parciales o completas de los cromosomas 5 o 7, la frecuente aparición de una fase de mielodisplasia, un intervalo de latencia entre la exposición al agente causante y la neoplasia mielode secundaria relativamente prolongado, entre 2 y 10 años, y un pronóstico desfavorable debido a marcada quimiorresistencia. Sin embargo, las vías patogénicas subyacentes pueden resultar más complejas, ya que la del-7 puede representar una anomalía única y, en consecuencia, ser considerada como el evento único o, por el contrario, como una anomalía asociada a otras lesiones genéticas o que afectan únicamente un subclón de la población neoplásica. Por otra parte, las diversas lesiones cromosómicas pueden asociarse de manera específica a otros eventos moleculares, como son mutaciones de genes RAS a anomalías del cromosoma 7 o mutaciones de p53 a cariotipos portadores de alteraciones del cromosoma 5⁴⁻⁷. Los

agentes alquilantes actúan por un doble mecanismo de acción: la transferencia de grupos alquilantes a las bases de los nucleótidos de DNA (como O⁶-metilguanina) y la inducción de entrecruzamientos intra o intercatenarios de DNA. Además, el potencial leucemógeno entre agentes alquilantes es distinto, siendo mayor para melfalán que para ciclofosfamida. Un segundo grupo de NM-t por alquilantes está constituido por casos asociados a delección o monosomía del cromosoma 5. Esta lesión parece un evento primario en la evolución de la enfermedad, a menudo asociado a alteraciones genéticas sobreañadidas (frecuentemente en forma de cariotipo monosómico) y, de manera interesante, asociado a mutaciones de p53.

Las NM-t asociadas a inhibidores de topoisomerasa II muestran características diferenciales. Estos fármacos, al interferir con la actividad de esta enzima, cuya función es la de producir ruptura y nuevas uniones tras inducir la "relajación" de la estructura compacta del DNA, favorecerían el origen de puntos de ruptura y reordenamientos anómalos. Así, los inhibidores de topoisomerasa II son causantes de LMA asociadas a translocaciones balanceadas que involucran a los genes *MLL* en 11q23, *RUNX1* en 21q22, reordenamiento *CBFB-MYH11* o *PML-RARα* en la leucemia promielocítica secundaria (LPA-t), sin fase de mielodisplasia previa⁸⁻¹⁰. Así, los casos con reordenamiento del gen *MLL* se han relacionado preferentemente con exposición a epipodofilotoxinas³. De manera interesante, el estudio de casos de LPA-t aparecida tras el uso de mitoxantrone, tanto en el contexto de tratamiento anti-neoplásico como agente inmunosupresor en pacientes con esclerosis múltiple, ha revelado la existencia de una región bien delimitada en el intrón 6 del gen *PML* por donde se produciría la translocación preferentemente en las formas secundarias. Estudios funcionales han demostrado que esta región constituye un *hot spot* o diana de escisión preferencial de la enzima topoisomerasa II que, en presencia de fármacos inhibidores de topoisomerasa II, daría lugar a una reparación anómala de la secuencia del gen *PML* con una región homóloga identificada en el gen *RARα*^{9,10}.

Existen dos formas de leucemias de baja frecuencia, pero con una alta proporción de formas secundarias tras exposición a inhibidores de topoisomerasa II, como son las distintas formas de LMA con reordenamiento *NUP98* con distintos *partners*, y aquellas asociadas reordenamiento *MYST3* (*MOZ*) en la banda 8p11, entre las cuales la LMA con t(8;16)(p11;p13)/*MYST3-CREBBP* es la forma más característica (Tabla 1).

Predisposición genética

Las distintas lesiones genéticas inducidas por los fármacos utilizados en el tratamiento de enferme-

Tabla 1. Tipos de neoplasia mielóide secundaria a tratamiento (*therapy-related*) según sustrato biológico

Entidad	Antecedente	Latencia	Eventos moleculares asociados	Pronóstico
t-SMD o t-LMA asociada a cromosoma 7	Agentes alquilantes Radiaciones ionizantes Análogos de purinas	2-10 años	Mutaciones de RAS	Por lo general, desfavorable Casos de -7 aislada de larga evolución
t-SMD o t-LMA asociada a cromosoma 5	Agentes alquilantes Radiaciones ionizantes Análogos de purinas	2-10 años	Mutaciones de p53	Muy desfavorable
LMA con reordenamiento MLL secundaria	Inhibidores de topoisomerasa-II: · Epipodofilotoxinas · Antraciclínicos · Dexrazoxano	Meses-5 años	Reordenamiento de MLL con múltiples partners: t(9;11)(p21;q23)/AF9-MLL; t(11;19)(q23;p13)/MLL-ENL; t(4;11)(q21;q23)/AF4-MLL; t(11;16)(q23;p13)/MLL-CBP	Desfavorable Alto riesgo de recidiva
LMA con reordenamiento RUNX1 (AML1) secundaria	Inhibidores de topoisomerasa-II	Meses-5 años	t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1 t(3;21)(q26;q22)/EVI1-RUNX1	Desfavorable LMA-CBF <i>de novo</i>
LMA con reordenamiento CBFβ/MYH11 secundaria	Inhibidores de topoisomerasa-II	Meses-5 años	Inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q22)/CBFβ/MYH11	Desfavorable respecto a CBF-LMA <i>de novo</i>
Leucemia promielocítica aguda secundaria	Inhibidores de topoisomerasa-II	Meses-5 años	t(15;17)(q22;q12)/PML-RARα	Favorable Similar a LPA <i>de novo</i>
LMA con reordenamiento MYST3 (MOZ)	Inhibidores de topoisomerasa-II	Meses-5 años	t(8;16)(p11;p13)/MYST3-CREBBP inv(8)(p11;q13)/MYST3-TIF2 t(8;22)(p11;q13)/MYST3-EP100	Desfavorable Posible beneficio de trasplante alogénico
LMA con reordenamiento NUP98 (11p15)	Inhibidores de topoisomerasa-II	Meses-5 años	t(7;11)(p15;p15)/NP98-HOX9 t(2;11)(q31;p15)/NUP98-HOXD13 t(2;11)(q31;p15)/NUP98-HOXD13 t(11;20)(p15;q11)/NUP98-TOP1	Desfavorable

dades neoplásicas son reparadas por la compleja maquinaria celular dedicada a esta función. Por ello, no es sorprendente que determinados polimorfismos que modifiquen la función enzimática de las distintas proteínas implicadas en el metabolismo de agentes genotóxicos y de los diversos componentes de la maquinaria de reparación del ADN puedan aumentar la predisposición a padecer NM-t tras exposición a determinados fármacos. Respecto a los polimorfismos en enzimas de metabolismo identificados con potencial implicación en la predisposición a neoplasias secundarias cabe destacar que importan tanto enzimas de fase I (componentes de la superfamilia del citocromo CYP P450) como de fase II (oxidoreductasa de quinonas, transferasas de glutatión S/GST)^{3,7,11}. Un ejemplo de ello son los polimorfismos inactivadores que afectan al gen *NQO1* (oxidoreductasa quinona NADPH), asociados a un mayor riesgo de padecer LMA-t en diversos estudios, especialmente en individuos homocigotos para el polimorfismo NQO1-187Ser^{7,12}. Otros polimorfismos relacionados con una mayor predisposición a t-LMA descritos corresponden al gen

MTHFR (metileno tetrahidrofolato reductasa), en el que un determinado haplotipo que incluye dos SNP (*single nucleotide polymorphisms*) se relacionó con un riesgo superior de desarrollo de LMA-t tras tratamiento de neoplasia de mama y neoplasias hematológicas¹³.

Por otra parte, polimorfismos que afectan componentes de la maquinaria de reparación del ADN pueden explicar un mayor riesgo de desarrollar NM-t tras exposición a determinados agentes, como ocurre con la variante -93 del promotor del gen *hMLH1*, que conducen a una menor actividad de la proteína, en pacientes que habían recibido agentes alquilantes por enfermedad de Hodgkin¹⁴. La combinación de polimorfismos asociados a una detoxificación defectuosa y una menor capacidad de daños al DNA inducidos por fármacos tendría un efecto sinérgico que se traduciría en un riesgo especialmente elevado de desarrollo de NM-t³.

Finalmente, cabe mencionar la existencia de síndromes hereditarios de predisposición a cáncer como el síndrome de Li-Fraumeni o el síndrome de Noonan, asociados a mutaciones germinales de p53

y de la vías de RAS-MAPK, respectivamente, en los que se ha descrito una mayor incidencia de NMRT tras el tratamiento de otras neoplasias¹¹.

Características clínicas diferenciales y pronóstico

Los tumores sólidos representan la mayoría de las neoplasias precedentes al desarrollo de NM-t, especialmente tumores de mama, tiroides, próstata y testicular. Las enfermedades hematológicas representan el 20-30% de los casos; existe un pequeño porcentaje de pacientes con NM-t debidos al tratamiento de trastornos autoinmunes con agentes genotóxicos. Los pacientes con LMA-t tienen una edad superior y acostumbran a presentarse con formas menos leucocitósicas. Como ya se ha mencionado, determinadas alteraciones citogenéticas son más frecuentes entre los enfermos que desarrollan LMA-t, como con las translocaciones que involucran 11q23 (gen *MLL*), anomalías del cromosoma 5 y/o 7, 17p, cariotipos complejos y monosómicos. Por el contrario, de manera interesante, las mutaciones de los genes *NPM1* y *FLT3-ITD*, frecuentes entre pacientes con LMA *de novo* y cariotipo normal, son poco frecuentes en el contexto de t-LMA².

En términos generales, el origen secundario, relacionado con el tratamiento, de una LMA tiene un impacto pronóstico global desfavorable, debido tanto a la mayor quimiorresistencia como a una mayor morbimortalidad asociada al tratamiento, probable reflejo de la toxicidad acumulada por el tratamiento previo de otros tumores. El impacto pronóstico desfavorable de la LMA-t mostró valor independiente en una extensa serie de 200 pacientes analizados en el seno del grupo alemán AMLSG, con una supervivencia a los 4 años del 25% para la cohorte de pacientes con una LMA secundaria a tratamiento².

De manera similar, se ha analizado el valor pronóstico conferido por el origen *therapy-related* en subgrupos de enfermos con LMA-t asociada a formas biológicas de pronóstico considerado favorable. Así, un subgrupo de 17 pacientes con LMA-t y reordenamiento *core-binding factor* (LMA-CBF) tratados en el MD Anderson Cancer Center mostró supervivencias global y libre de evento inferiores a las de la LMA-CBF con presentación *de novo*¹⁵. De manera similar, el origen secundario de la LMA asociada a inv(16) secundaria también se erigió como un factor pronóstico adverso de manera independiente en otro estudio².

Por el contrario, el pronóstico de la t-LPA con esquemas actuales, basados en el empleo de agentes diferenciadores como el ácido retinoico (ATRA) o el trióxido de arsénico (ATO) en asociación o no con

quimioterapia, no muestra un resultado sustancialmente distinto al obtenido en la LPA primaria^{10,16,17}.

Tratamiento

Aunque el tratamiento de las NM-t es en líneas generales similar al de las formas primarias, se enfrenta con dos grandes dificultades. Por una parte, el pronóstico específicamente adverso de la mayoría de LMA-t, cuando se compara con el de las formas equivalentes *de novo*, sugiere la existencia de complejos mecanismos de resistencia que confieren mayor quimiorresistencia. En segundo lugar, el tratamiento intensivo, incluyendo el trasplante de progenitores hemopoyéticos, se acompaña de una mayor toxicidad en la LMA-t, hecho que debe explicarse por la toxicidad acumulada por los tratamientos quimioterápicos previos. En general, el único tratamiento con potencial curativo para la mayor parte de formas de la LMA-t deberá contemplar la realización de un trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (aloTPH). La excepción a ese plan serían la LPA-t y, quizás, la LMA-CBF aparecida tras exposición a quimioterapia.

En este sentido, el análisis del resultado del TPH es especialmente interesante. Así, un estudio del CIBMTR que reunió más de 500 y 300 enfermos con LMA-t y SMD-t, respectivamente, mostró una supervivencia a los 5 años del 22%, con una mortalidad relacionada con el tratamiento al año del 41%. En este estudio, se identificaron la edad superior a los 35 años, la presencia de una citogenética adversa, la realización del trasplante en una fase avanzada y el empleo de donante no familiar como factores de riesgo para la supervivencia tras el trasplante, siendo inferior al 20% en aquellos pacientes con 3 o más de estos factores. Resultados similares así como la constatación de una mayor toxicidad relacionada con el tratamiento en los enfermos con LMA-t se han confirmado en un estudio realizado en el EBMT así como en la anteriormente mencionada serie multicéntrica alemana, en la que el riesgo de muerte en remisión completa era dos veces superior al de las formas de LMA *de novo* y la mortalidad relacionada con el trasplante a los 4 años era del 38,5%^{2,19}.

En conclusión, la estrategia de tratamiento de la NM-t se basará en el mismo tratamiento utilizado para las formas primarias, con una especial atención a la selección de pacientes candidatos a aloTPH, con el fin de minimizar la toxicidad del tratamiento. Es evidente que el desarrollo de nuevos agentes con eficacia en este grupo de enfermedades pero asociados a menor toxicidad es imprescindible para ofrecer mejores opciones a los pacientes afectados de NM-t.

Referencias bibliográficas

- Vardiman JW, Arber DA, Brunning RD, Larson RA, Matutes E, Baumann I, Thiele J. Therapy-related myeloid neoplasms. En: WHO classification of tumour of haematopoietic and lymphoid tissues. Ed.: Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. Lyon, 2008.
- Kayser S, Döhner K, Krauter J, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* 2011; 117:2137-45.
- Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica* 2007; 92: 1389-98.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99: 1909-12.
- Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations with loss of heterozygosity of p53 are common in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after exposure to alkylating agents and significantly associated with deletion or loss of 5q, a complex karyotype, and a poor prognosis. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1405-13.
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Andersen MT, Christiansen DH. Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 240-8.
- Godley LA, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008; 35: 418-29.
- Pui C-H, Relling MV. Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 2000; 109: 13-23.
- Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, et al. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352:1529-38.
- Hasan SK, Mays AN, Ottone T, et al. Molecular analysis of t(15;17) genomic breakpoints in secondary acute promyelocytic leukemia arising after treatment of multiple sclerosis. *Blood* 2008; 112: 3383-90.
- Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wölfler. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *B J Pharmacol* 2011; 162: 792-805.
- Bolufer P, Collado, Barragan E, et al. Profile of polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the risk of therapy-related leukaemia. *Br J Haematol* 2007; 136:590-6.
- Guillem VM, Collado M, Terol MJ, et al. Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia* 2007; 21:1413-22.
- Worrillow LJ, Travis LB, Smith AG, et al. Polymorphic MLH1 and risk of cancer after methylating chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *J Med Genet* 2008;45:142-6.
- Borthakur G, Lin M, Jain N, et al. Survival is poorer in patients with secondary core-binding factor acute myelogenous leukemia compared with de novo core-binding factor leukemia. *Cancer* 2009; 115:3217-21.
- Ravandi F. Therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2011; 96: 493-5.
- Beaumont M, Sanz M, Carli PM, et al. Therapy-related acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21:2123-37.
- Litzow MR, Tarima S, Pérez WS, et al. Allogeneic transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 115: 1850-57.
- Kröger N, Brand R, van Biezen A, et al. Risk factors for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia treated with allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2009; 94: 542-549.

