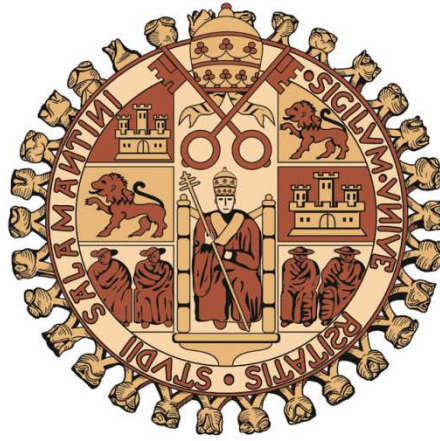


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

*Papel de la citogenética y de la genética molecular
en la detección de la clonalidad en las eosinofalias*

Maryam Arefi

2014

Dr. Jesús María Hernández Rivas, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y Médico Adjunto del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca y Dr. Juan Luis García Hernández, Doctor en Biología:

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, realizada bajo nuestra dirección por D. Maryam Arefi con el título "Papel de la citogenética y de la genética molecular en la detección de la clonalidad en las eosinofilias" reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación en Salamanca, a uno de Abril de dos mil catorce.

Fdo: Dr. Jesús M^a Hernández Rivas

Fdo: Dr. Juan Luis García Hernández

*De hecho, la humanidad está en pérdida
excepto los que han creído, han hecho buenas
obras, han aconsejado a otros la verdad y han
tenido paciencia*

(Libro sagrado)

A mis padres

A mi familia

Fariborz y mis hijos, Amir y Shervin

Doy las gracias a ellos por el gran apoyo que me han dado todos estos años, por ayudarme en los momentos más difíciles y ser comprensivos conmigo.

Agradecimientos

A lo largo de los años que ha durado la realización de esta investigación y al final la tesis, numerosas personas me han prestado, de diferentes formas, su colaboración y ayuda, y este es el momento de expresarles mi sincero agradecimiento.

En primer lugar y de forma especial, quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Jesús M Hernández Rivas, director de este trabajo doctoral, cuyas inestimables orientaciones y sugerencias, cuyo apoyo y estímulo continuo, comprendiéndome, me ha guiado con paciencia y sabiduría profesional en el mundo de Hematología (citogenética) para dar la oportunidad de realizar esta tesis.

A Dr. Juan Luis García, por enseñarme en el perfil de arrays y genómica, por la ayuda y su apoyo en análisis de los datos de los pacientes y sus valiosos consejos.

El trabajo y entusiasmo de mis profesores guías en el perfil de investigación, fue un estímulo enorme para mí en todo el tiempo, Sin ellos, esta tesis no hubiera salido adelante.

A las Doctoras María Isabel Sánchez, Norma Gutiérrez y Gema Mateo por el apoyo moral y animándome durante todos estos años me han prestado, la cual ha facilitado superarme en los momentos muy difíciles. Les estoy profundamente agradecida.

A los doctores del tribunal por haber aceptado venir para realización de esta presente tesis.

A mis compañeros del equipo en la unidad de Citogenética en Hospital Universitario de Salamanca y en el Lab. 12 CIC, por facilitarme la aplicación de los protocolos y materiales de investigación.

A todo el personal del Servicio de Hematología (Salamanca y Valladolid) que me han enseñado y aportado mucho en formación en Hematología e investigación.

A mis hermanos (María, Ali, Mahbuubeh)

Gracias a todos

Índice

Abreviaturas	15
Introducción	21
1.1. Eosinofilia	24
1.2. Biología de los eosinófilos.....	24
1.3. Ontogenia y mecanismos de regulación de los eosinófilos	25
1.4. La eosinofilia en las enfermedades mieloproliferativas.....	30
1.4.1. Clasificaciones de la hipereosinofilia.....	31
1.4.2. Epidemiología del SHE.....	33
1.4.3. Clínica y tratamiento del SHE.....	33
1.4.4. Patogenia del SHE.....	34
1.4.5. Las Neoplasias Mieloides asociadas con eosinofilia y anomalías de <i>PDGFRA</i>	39
1.4.6. Las Neoplasias Mieloides con eosinofilia asociada y anomalías de <i>PDGFRB</i>	42
1.4.7. Las Neoplasias Mieloides y Linfoides con eosinofilia y anomalías de <i>FGFR1</i>	46
1.5. Criterios diagnósticos de Leucemia Eosinofílica Crónica y de SHE.....	47
2. Los microarrays genómicos	47
Hipótesis	49
Objetivos	53
Artículos científicos	57
Capítulo 1:	
Arefi et al. Incidence and clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms displaying a <i>PDGFRB</i> rearrangement. Eur J Haematol. 2012; 89: 37-41.	59
Capítulo 2:	
Arefi et al. Response to imatinib mesylate in patients with hypereosinophilic syndrome. Int J Hematol. 2012; 96: 320-6.	67
Capítulo 3:	
Arefi et al. Genomic analysis of clonal eosinophils by CGH arrays reveals new genetic regions involved in chronic eosinophilia (Eur J Haematology 2014).	77
Discusión general	97
Conclusiones	107
Bibliografía	111

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BACs	Cromosoma artificial bacteriano
BAC array	Matrices de BAC para mapear en el cromosoma humano con el fin de detectar genes o grandes secuencias de interés
BCR/ABL	<i>Breakpoint cluster región / Abelson</i>
CGH	Hibridación genómica comparada
aCGH	CGH-array
cKIT (CD117)	receptor de membrana del factor de células madre hematopoyéticas, también conocido como <i>steel factor</i> o ligando c-kit
CCL	Citoquinas y ligandos de quimioquinas
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C/EBP (CEBPA)	<i>CCAAT/enhancer binding protein alpha</i>
C/Ebε	<i>CCAAT/ enhancer binding protein (C/EBP), epsilon</i>
CSF3R	Receptor del gen CSF3R
CHIC2	<i>Cysteine-rich hydrophobic domain 2</i>
ECP	Proteína catiónica eosinofílica
EDN	<i>Eosinophil derived neurotoxin</i>
EMS	Síndrome mieloproliferativo con reordenamiento de 8p11
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FGFR1	Factor de crecimiento de fibroblasto (tipo 1)
GC	Glucocorticoides
GM-CSF	Factor estimulante de colonias Granulocito/macrófago
GMPs	Los progenitores de los granulocitos-macrófagos
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL-3	Interleucina-3
IL-3Rα	Receptor alfa de interleucina-3
IL-5	Interleucina-5

IL-5Rα	Receptor alfa de interleucina-5
ITK	Inhibidor de tirosina kinasa
IES	Sociedad Internacional del Estudio de los Eosinófilos
JAK2	Gen Janus Kinasa 2
LEC	Leucemia eosinofílica crónica
LEC (NOS)	Leucemia eosinofílica crónica no especificada
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LMC atípica	Leucemia mieloide crónica atípica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crónica
LNC	Leucemia neutrofílica crónica
LNH-T	Linfoma No-Hodgkin T
Mb	Megabyte
MBP	Proteína básica mayor
MCP	Proteína quimiotáctica del monocito
MO	Médula ósea
MS	Mastocitosis sistémica
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento neural
NMP	Neoplasia Mieloproliferativa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAC	Cromosoma artificial derivado del bacteriófago P1 “derivado del ADN del bacteriófago P1”
PAF	Factor de activación plaquetario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFRA	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDGFRB	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa

ABREVIATURAS

PLC	Fosfolipasa C
PNT-ETV6	La parte N-terminal del factor de transcripción <i>ETV6</i>
POE	Peroxidasa eosinofílica
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RTK	Receptores de tirosina kinasa
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
SHE	Síndrome Hipereosinofílico
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SMD	Síndrome mielodisplásico
SMP	Síndrome mieloproliferativo
SP	Sangre periférica
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
HE	Hipereosinofilia
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TK	Tirosina Kinasa
TPH	Trasplante de precursores hematopoyéticos
USHE	Hipereosinofilia con significado indeterminado
VIP	Péptido vasointestinal
VEGA	Factor de crecimiento endotelial vascular

Introducción

Los eosinófilos son los granulocitos encargados de la defensa frente a las infecciones parasitarias e intervienen en la remodelación tisular mediante la liberación de diversas citoquinas, tanto en condiciones fisiológicas como en la respuesta a tumores (Kita, 2011; Gatault et al, 2012; Ishibashi et al, 2006). La eosinofilia persistente constituye un problema de salud en los países en vías de desarrollo, donde en la mayoría de las ocasiones es un proceso reactivo y, en menor medida, en el mundo industrializado, donde la ausencia de marcadores de clonalidad de los eosinófilos ha dificultado su correcto diagnóstico. Esta situación se ha modificado en la última década debido a un aumento considerable en el conocimiento sobre los mecanismos subyacentes de la hipereosinofilia (HE) y de sus daños orgánicos. Este progreso se ha asociado con el hallazgo de alteraciones en los genes de fusión relacionados con el dominio catalítico tirosina kinasa (TK), que se han observado en las hemopatías malignas y en los tumores sólidos. A nivel clínico, la identificación de los genes de fusión con actividad tirosina kinasa no solo ha tenido una relevancia diagnóstica, sino que ha facilitado el tratamiento de estos procesos, lo que ha mejorado su pronóstico.

Toda propuesta de clasificación de los tumores malignos deberá incluir las enfermedades que sean clínicamente significativas, claramente definidas y que puedan ser diagnosticadas mediante la tecnología y los métodos disponibles. Estas clasificaciones deben ser flexibles y modificables para poder adaptarse a los datos aportados por la investigación. Estas premisas tienen plena vigencia en la clasificación de los trastornos de los eosinófilos donde los cambios moleculares se han incorporado tanto a las clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) o de la Sociedad Internacional de Eosinófilos (IES) (Klion et al, 2006; Noel, 2012). Sin embargo, varias cuestiones relativas a las definiciones y la clasificación de los trastornos eosinofílicos permanecen sin respuesta ya que no se dispone de suficientes datos acerca de la epidemiología de estas enfermedades, la evolución de estos procesos con el uso de los inhibidores tirosina kinasa no está bien documentada y el número de casos en los que se puede establecer la clonalidad del proceso es aún insuficiente. Por ello, en este trabajo de tesis doctoral, se abordaron estas cuestiones controvertidas, basándonos en la clasificación de las hemopatías malignas de la OMS de 2008 para proponer un estudio de las eosinofalias con un enfoque multidisciplinario.

1.1. Eosinofilia

Se considera eosinofilia la presencia mantenida en la sangre periférica (SP) de más de 500 eosinófilos/ μL . La hipereosinofilia (HE) se define por una eosinofilia marcada, patológica y persistente de al menos 1,500/ μL confirmado durante un periodo de varios meses. En la médula ósea, el término HE se aplica cuando se observan más del 20% de eosinófilos del total de las células nucleadas. Aún así bien, la definición tiene que adaptarse a la situación clínica ya que en los enfermos con daño evidente de los órganos diana relacionado con la hipereosinofilia el tratamiento debe ser introducido inmediatamente. (Valent et al, 2012). Sin embargo, no hay una definición exacta de HE en los órganos extramedulares (Horny et al, 2011; Valent et al, 2012). En condiciones normales los eosinófilos no son detectables en los tejidos y órganos normales, salvo en la médula ósea y en el tracto gastrointestinal, donde el recuento suele sobreestimarse (DeBrosse et al, 2006; Powell et al, 2010). Por el contrario, la presencia de un pequeño número de eosinófilos en el miocardio debe ser considerada como un hallazgo patológico.

Las eosinofilias se pueden dividir en reactivas y en clonales. En las eosinofilias reactivas hay un aumento de eosinófilos maduros policlonales en relación con procesos alérgicos, infecciones o neoplasias. Por el contrario, en las eosinofilias clonales los eosinófilos o sus precursores forman parte del clon tumoral y constituyen el objeto de este trabajo de tesis doctoral.

1.2. Biología de los eosinófilos

Los eosinófilos son células efectoras de estirpe granulocítica que producen y almacenan moléculas biológicamente activas, que incluyen citotoxinas, proteínas citoestimuladoras, lípidos, péptidos quimiotácticos y citoquinas. Los gránulos de los eosinófilos humanos contienen cuatro proteínas principales: la proteína catiónica eosinofílica (ECP), la proteína básica mayor (MBP), la neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN) y la peroxidasa eosinofílica (POE) (Rosenberg et al, 2013). Otras características destacadas de eosinófilos es que tienen gránulos primarios que contienen cristales de Charcot-Leyden (ricos en galectina 10 y en lisofosfolipasa) y cuerpos lipídicos, que son los sitios de síntesis de los cisteinil leucotrienos, los tromboxanos y las prostaglandinas. (Gleich GJ, 2000; Kita H, 2011).

En ciertas condiciones, los eosinófilos secretan sus mediadores granulares y de este modo provocan la inflamación y remodelación del tejido. En caso de una activación masiva y permanente, los mediadores de los eosinófilos pueden inducir cambios sustanciales como fibrosis tisular o trombosis y, por lo tanto, daño orgánico (Hogan et al, 2008; Kita, 2011).

1.3. Ontogenia y mecanismos de regulación de los eosinófilos

Los eosinófilos derivan de las células precursoras hematopoyéticas multipotentes y comprometidas. Los modelos actuales apuntan al papel primordial de la interleucina-5 (IL-5), con alguna contribución del factor estimulante de colonias IL-3 y del GM-CSF, en la promoción de la expansión de la estirpe de los eosinófilos a partir de los progenitores comprometidos en la médula ósea (Figura 1) (Valent et al, 2012; Ackerman y Bochner, 2007).

Numerosos estudios se han centrado en analizar las rutas de activación y en la expresión jerárquica de los factores de transcripción que promueven el desarrollo de los eosinófilos y se ha descrito la presencia de interacciones notables que implican a miembros de la familia de proteínas de unión a GATA (GATA1 y GATA2), así como de potenciadoras de unión CCAAT (por ejemplo, C/EBP y C/EBP ϵ) y de PU.1. La expresión de GATA1 o de GATA2 promueve el compromiso hacia el linaje eosinófilico y el desarrollo de las células progenitoras mieloides. La pérdida de un sitio potenciador de unión a GATA en el ratón GATA1 da lugar a una pérdida exclusiva del linaje de eosinófilos y se ha observado la presencia de interacciones funcionales entre GATA1, PU.1 y C/EBP ϵ en líneas celulares de eosinófilos y de promielocitos. Además se han identificado isoformas de C/EBP ϵ , tanto activadoras como represoras, que modulan la diferenciación de las células progenitoras CD34⁺ en los eosinófilos *in vitro* (Bedi et al, 2009). Sin embargo, no hay factores de transcripción conocidos que regulen en exclusiva la diferenciación de los eosinófilos, aunque recientemente se han identificado en la médula ósea (MO) humana una serie de progenitores comprometidos hacia la línea eosinofílica (Mori et al, 2009). Estos progenitores son células CD34 + CD38 + IL-3R α + CD45RA-IL-5R α + y generan solo eosinófilos en condiciones de cultivo *ex vivo* enriquecidas en CSF, IL-3, IL-5, GM-CSF, eritropoyetina y trombopoyetina. Las células progenitoras comprometidas de linaje IL-5R α ⁺ son descendientes directas de los

progenitores mieloides IL-5R α -comunes y constituyen un linaje distinto al producido a partir de los progenitores de los granulocitos-macrófagos (GMPs), que dan lugar a los neutrófilos y basófilos en el cultivo (Southam et al, 2005).

Los eosinófilos también pueden desarrollarse a partir de células progenitoras CD34 + que se encuentran fuera de la médula ósea, en particular en el tejido pulmonar en un proceso que depende de IL-5. La movilización de progenitores CD34 + de la médula ósea a los pulmones se ha observado en modelos de ratón con inflamación alérgica de las vías respiratorias. (Figura 1) (Southam et al, 2005).

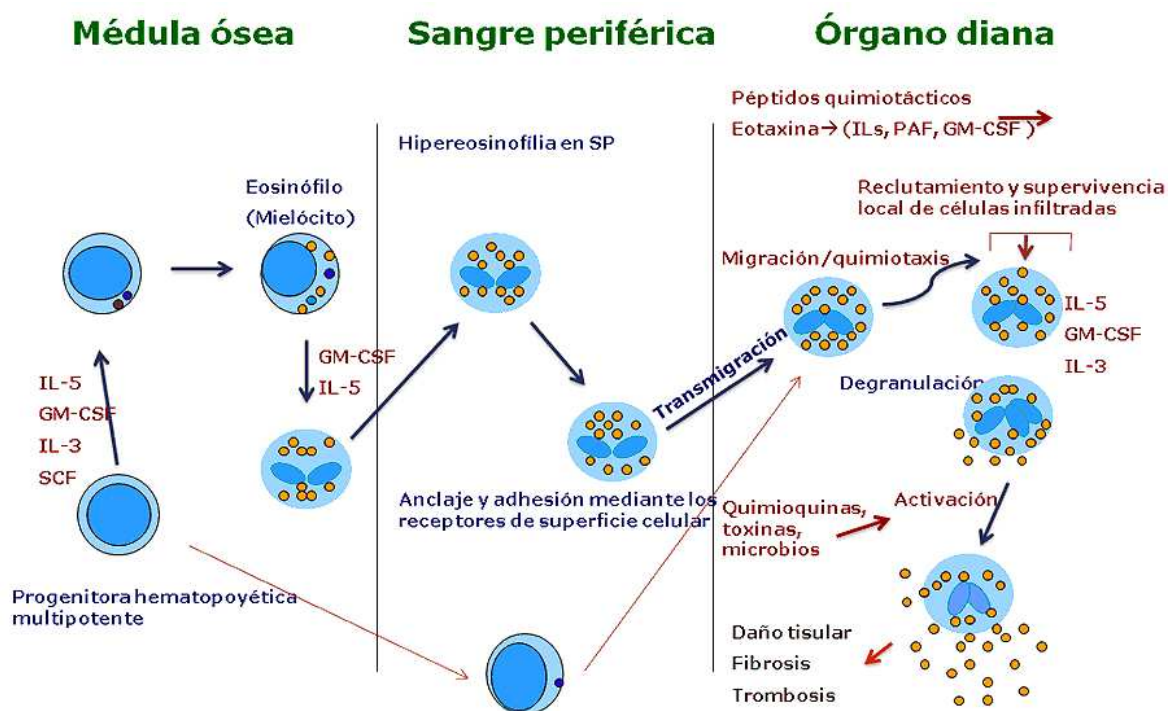


Figura 1. Modelo de desarrollo de los eosinófilos y de la hipereosinofilia reactiva

Los eosinófilos están originados por células progenitoras hematopoyéticas multipotentes comprometidas. Los progenitores eosinófilos residen en la médula ósea y pueden ser detectados en la sangre periférica. El desarrollo de los eosinófilos está regulado por las citoquinas eosinófilas (IL-3, GM-CSF y IL-5) localizadas en la médula ósea. La HE inducida por las citoquinas en la sangre periférica está acompañada por HE tisular. La activación de los eosinófilos y de las células endoteliales contribuye a la trans migración endotelial y a la infiltración de tejido inflamatorio. La migración y la acumulación de los eosinófilos en los tejidos están mediadas por los péptidos quimiotácticos (quimioquinas), citoquinas y otros mediadores. La acumulación de los eosinófilos se produce por una apoptosis disminuida y por otros mecanismos mediados por citoquinas en los tejidos. La activación de los eosinófilos permite la degranulación y la secreción de estos en los tejidos, como consecuencia el daño tisular está acompañado de fibrosis y trombosis.

HE: Hipereosinofilia; GM-CSF: Factor estimulador de colonias de Granulocitos/Macrófagos; IL: Interleucinas, PAF: Factor activador de plaquetas; SCF: *Stem cell factor* (Valent et al, 2012)

Además de los factores de crecimiento clásicos relacionados con los eosinófilos, otras citoquinas, tales como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y

el factor de crecimiento neural (NGF), pueden desempeñar un papel en la regulación del desarrollo de los eosinófilos y en su función (Noga et al, 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Citoquinas, péptidos y receptores que regulan el crecimiento y la regulación de los eosinófilos
(modificado de Valent et al, 2012)

Citoquina/Péptido	Efectos sobre los eosinófilos	Receptor/es conocido/s
IL-2	Activación de eosinófilos CD25+	† IL-2RA/CD25
IL-3	Diferenciación, supervivencia, adhesión, migración, activación, preparación	IL-3R/CD123+βC
IL-4	Preparación para los efectos de las quimiotaxinas	IL-4R/CD124
IL-5	Diferenciación, supervivencia, adhesión, migración, activación, preparación	IL-5R/CD125+βC
GM-CSF	Diferenciación, supervivencia, adhesión, migración, activación, preparación	GMCSFR/CD116+βC
IL-10	Inhibidora (activación, supervivencia)	IL-10R
IL-12	Inhibidora (activación)	IL-12R
IL-13	Desconocido	IL-13R
IL-16	Activación, preparación	CD4,CD9(?),CCR3
IL-25	Supervivencia, activación	IL-25R
IL-27	Supervivencia, activación	IL-27R
IL-33	Adhesión, migración, activación	IL-33R/ST2
VEGF	Quimiotaxis, activación	VEGFR-1/FLT-1
Angiopoyetina-1	Quimiotaxis, activación?	Tie-2/TEK
PDGF	Activación?	PDGFRA/B
FGF	Activación?	FGFR1
TGF-β1	Inhibidora (diferenciación, activación)	TGF-β1R
TGF-β2	Inhibidora (diferenciación, activación?)	TGF-β2R
IFN-α	Inhibidora (crecimiento)	IFN-α-R
IFN-γ	Inhibidora (crecimiento, migración)	IFN-γ-R
RANTES (CCL5)	Quimiotaxis, activación	CCR3
MCP-3 (CCL7)	Quimiotaxis, activación	CCR
MCP-4 (CCL13)	Quimiotaxis, activación	CCR3
Eotaxina (CCL11)	Quimiotaxis, activación	CCR3
Eotaxina-2 (CCL24)	Quimiotaxis, activación	CCR3
Eotaxina-3 (CCL26)	Quimiotaxis, activación	CCR3
SDF-1 (CXCL12)	Quimiotaxis	CXCR4
PAF	Quimiotaxis, activación	PAF-R
Factores del Complemento	Quimiotaxis, activación	C3aR, C5aR, C3a y C5a
Receptor Toll-like	Supervivencia, activación	TLR1, 4, 7, 9, 10
VIP	Quimiotaxis	VIP-Rs
GCs	Inhibidora (activación)	GC R

IL: Interleucina; CCL: ligando de quimioquina; GC: Glucocorticosteroide; GM-CSF: Factor estimulante de colonias Granulocítas/macrófagos; MCP: Proteína quimiotáctica del monocito; PAF: Factor activador plaquetario; R: Receptor; VIP: Péptido vasointestinal.

† Los eosinófilos derivados de los enfermos con SHE suelen expresar CD25.

Otras citoquinas y ligandos de quimioquinas (CCL), tales como la IL-16, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el CCL5 (RANTES), la CCL11 (eotaxina), la CCL24 (eotaxina-2), la CCL26 (eotaxina-3) y el factor de activación plaquetario (PAF), que induce la migración y la quimiotaxis de eosinófilos, pueden contribuir a la regulación de los eosinófilos (Valent et al, 2012). La mayor parte de estos mediadores peptídicos también provocan la activación de eosinófilos, pudiéndose alterar las propiedades de adherencia de estas células (Tabla 2).

Generalmente, la eosinofilia reactiva y la paraneoplásica están provocadas por una respuesta secundaria a las citoquinas eosinopoyéticas, como la IL5 o el GM-CSF, mientras que los eosinófilos clonales son resultado de la fusión genética o de una mutación, que activa constitutivamente los receptores de algunas citoquinas, como *PDGFR* o *FGFR* (Tefferi et al, 2006; Bain, 2010).

Por último, el crecimiento, la supervivencia y la función de los eosinófilos en la sangre son controlados por varios reguladores negativos, como Siglec-8, y otros receptores inhibitorios. También se ha descrito que el TGF- β , el IFN- α y el IFN- γ suprimen el crecimiento inducido por citoquinas y la diferenciación de los eosinófilos humanos *in vitro* (Tabla 1). Estos inhibidores solubles, como el IFN- γ , contrarrestan la migración de los eosinófilos inducida por citoquinas. Todos estos efectos de las citoquinas están mediados por receptores específicos expresados en eosinófilos (Figura 2). Los eosinófilos también poseen receptores para glucocorticoides (GC), que inhiben el crecimiento y la función de los eosinófilos. El número de receptores GC detectables en los eosinófilos se correlaciona con la respuesta de estas células a los GCs (Rosenberg et al, 2013).

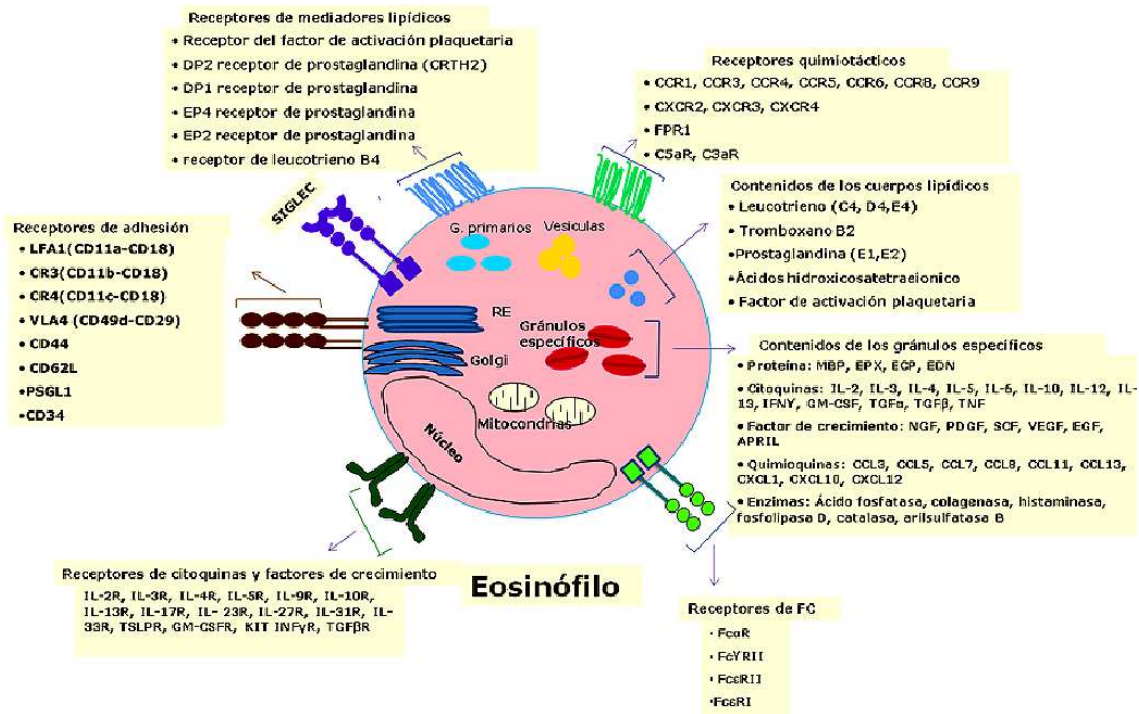


Figura 2. Receptores que modulan la adhesión, el crecimiento, la supervivencia y la migración de los eosinófilos (Rosenberg et al, 2013)

En la Tabla 2 se describen los efectos de los productos de los eosinófilos en los procesos inflamatorios observados en los tejidos, si bien en el daño orgánico producido en el SHE el papel patogénico de los mediadores derivados de eosinófilos y citoquinas está poco determinado. Se ha demostrado que los eosinófilos promueven la fibrosis y la trombosis tanto mediante la activación de las células endoteliales y/o de las plaquetas a través de las acciones mediadas por la expresión de los mediadores protrombóticos, como de la liberación de antifibrinolíticos o del inhibidor del activador del plasminógeno-2. De hecho, los eosinófilos activados y los eosinófilos neoplásicos son una fuente particularmente rica de citoquinas proinflamatorias, angiogénicas y fibrogénicas. Estos mediadores derivados de los eosinófilos pueden actuar juntos para causar el daño tisular en los enfermos con HE (Valent et al, 2012).

Tabla 2. Componentes principales de los eosinófilos y su papel en el desarrollo de la hipereosinofilia
(Valent et al, 2012)

Sustancia dal eosinófilo	Efectos producidos en el daño orgánico relacionado con la eosinofilia
Proteínas básicas	
MBP	Efecto tóxico directo, citoestimulador
ECP	Efecto tóxico directo, secreción mucosa, fibrosis
EDN	Efecto tóxico directo, efectos de lignado de TLR2, RNasa
EPO	Efecto tóxico directo, citoestimulador
Enzimas	
Lisofosfolipasa	Efecto tóxico directo
Fosfolipasa D	Adhesión dependiente de LFA
Arilsulfatasa B	Hidrolasa lisosómica
Histaminasa	Degradación de la histamina
Catalasa	Efecto tóxico directo
Fosfatasa ácida	Efecto tóxico directo
Esterasas inespecíficas	Efecto tóxico directo
Hexosaminidasa	Efecto tóxico directo
Citoquinas	
IL-1 α	Activación endotelial, inflamación
IL-2	Activación de los linfocitos T
IL-3	Amplificación de la eosinofilia
IL-4	Maduración de la célula B y activación del mastocito
IL-5	Amplificación de la eosinofilia
IL-6	Maduración linfocitaria
IL-8	Incremento y activación de los leucocitos
IL-13	Hiperreactividad bronquial, mucosecreción y maduración de las células B
GM-CSF	Activación leucocitaria/eosinofílica
TGF- α	Fibrosis, inhibición del crecimiento
TGF- β	Fibrosis, inhibición del crecimiento
TNF- α	Activación endotelial, inflamación, caquexia
OSM	Fibrosis, angiogénesis
Quimioquinas	
MIP-1 α (CCL3)	Incremento y activación de los leucocitos
RANTES (CCL5)	Incremento y activación de los leucocitos
Eotaxina (CCL11)	Incremento de los leucocitos
Mediadores derivados de membrana	
LTC4	Mucosecreción
PAF	Broncoconstricción, edema
15-HETE	Efectos sobre las células sanguíneas y tisulares

1.4. La eosinofilia en las enfermedades mieloproliferativas

La aparición de eosinofilia es un hallazgo relativamente frecuente en las hemopatías mieloides. De ellas, las que suelen presentar con mayor frecuencia esta alteración son la leucemia mieloide crónica (LMC), las neoplasias mieloproliferativas con mutación de *JAK2*, algunos tipos de leucemia mieloblástica aguda (LMA) y la mastocitosis sistémica avanzada (MS). Todas ellas están integradas dentro de las neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP) en la clasificación de la OMS. En estos pacientes los eosinófilos generalmente pertenecen al clon maligno. Por el contrario, en los pacientes con neoplasias linfoides y en los tumores sólidos los eosinófilos son células no neoplásicas (Valent, 2009; Cross y Reiter, 2008).

1.4.1. Clasificaciones de la hipereosinofilia

En 2006, el grupo de trabajo de las Enfermedades Hipereosinofílicas de la Sociedad Internacional de Eosinófilos (IES) propuso un algoritmo de clasificación para estos trastornos, que incluye las siguientes categorías: (1) Mieloproliferativas, (2) Linfocítica, (3) Familiar, (4) De solapamiento (eosinófilos $\geq 1,500/\mu\text{L}$ con afectación de solo un órgano), (5) Asociadas, donde se observa un número de eosinófilos $\geq 1,500/\mu\text{L}$ en el contexto de otro diagnóstico como la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome linfoproliferativo autoinmune, en el que la eosinofilia rara vez produce afectación orgánica. (Klion et al, 2006).

Sin embargo, la descripción de una serie de hallazgos moleculares característicos de algunos tipos de eosinofilia, tales como los reordenamientos de los genes *PDGFRB* y *FGFR1* o la fusión *PDGFRA/FIP1L1* motivó, en el año 2008, una nueva clasificación de estas enfermedades por la OMS. (Bain et al, 2008). De esta manera, las neoplasias mieloides y linfoides asociadas con eosinofilia clonal y alteraciones de los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1* se clasificaron en una nueva categoría (Vardiman, 2010), si bien es cierto que estas enfermedades están estrechamente relacionadas con el resto de las NMP (Tabla 3).

Por su parte, la OMS divide los trastornos mieloides asociados con eosinofilia en dos subgrupos: (1) las neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia asociada con los reordenamientos de *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1* y (2) Leucemia Eosinofílica Crónica (LEC) no especificada (NOS). Los criterios de LEC (NOS) son: (a) recuento de eosinófilos $\geq 1.500/\mu\text{L}$; (b) ausencia de fusión BCR/ABL o de los reordenamientos de *PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*; (c) recuento de células blásticas en la sangre periférica o en la medula ósea $<20\%$ y ausencia de *inv(16)(p13q22)*, *t(16;16)(p13;q22)* u otro criterio de diagnóstico de leucemia mieloide aguda; (d) presencia de una citogenética clonal o anomalía genética molecular, o de células blásticas $>2\%$ en la sangre periférica o $>5\%$ en la medula ósea.

En la propuesta de la OMS el SHE idiopático se define como la presencia de eosinofilia $>1.500/\mu\text{L}$ durante más de 6 meses con disfunción orgánica, sin otras causas primarias o secundarias de la eosinofilia. La duración de 6 meses de eosinofilia es arbitraria y, en muchas ocasiones, se puede hacer un diagnóstico de SHE con una eosinofilia mantenida más de un mes y con afectación orgánica. Se prefiere usar el

término de hipereosinofilia idiopática cuando no hay daño tisular y se descarta la presencia de un clon progenitor patológico mieloide.

En la clasificación revisada del grupo IES (Simon et al, 2010) el SHE se definió como la presencia de eosinofilia en la sangre $\geq 1.500 \mu/L$ al menos en dos ocasiones o la presencia de eosinofilia marcada en la sangre con evidencia de síntomas motivados por la infiltración tisular por los eosinófilos una vez descartadas otras causas secundarias de eosinofilia, tal como infecciones parasitarias y virales, enfermedades alérgicas inducidas por fármacos o químicos, eosinofilia inducida por neoplasia e hipoadrenalismo. En esta clasificación revisada, además de los síndromes linfoproliferativos T asociados con SHE, los pacientes que tienen hipereosinofilia en el contexto de una linfoproliferación de células T se han incluido en las formas linfocitarias de SHE. Además se incluyen casos clasificados como no-definido, con solapamiento o la forma de “similar a SHE” con aumento de linfocitos (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las neoplasias eosinofílicas mieloproliferativas de la OMS (2008) y del grupo IES (2010)

Adaptado de “Eosinophilic Myeloproliferative Disorders” (Klion, 2011) y “Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms” (Cazzola et al, 2011)

OMS 2008	Grupo de trabajo IES
<ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias Mieloides y Linfoides asociadas con hipereosinofilia y alteraciones de <i>PDGFRA</i> • Neoplasias Mieloides y Linfoides asociadas con hipereosinofilia y alteraciones de <i>PDGFRB</i> • Neoplasias Mieloides y Linfoides asociadas con hipereosinofilia y alteraciones de <i>FGFR1</i> • Leucemia eosinofílica crónica, sin otra especificación (<i>LEC-NOS</i>) • <i>SHE</i> idiopático • Hipereosinofilia idiopática 	<ul style="list-style-type: none"> • Variantes Mieloproliferativas <i>SHE</i> Mieloproliferativas <i>LEC</i> (incluye los casos con fusión <i>FIPIL1/PDGFRA</i>) • Variantes Linfocíticas Asociadas a <i>SLP-T</i> clonal Sin clonalidad <i>T</i> • Superpuestos: Trastornos eosinofílicos con afectación orgánica • Indefinido Benigno Episódica otros • Asociado • Familiar

Ambas clasificaciones tienen sus limitaciones: la clasificación de la OMS no incluye las categorías linfocítica y familiares y no establece un diagnóstico concreto para los pacientes con mastocitosis sistémica asociada con el aumento de los eosinófilos

(MS-eo) (Bain et al, 2008). En cambio, en la clasificación de la IES los pacientes con eosinofilia mieloproliferativa no se definen bien y el grupo de eosinofilias asociadas a reordenamientos de los genes *PDGFRB* o *FGFR1* no están contemplados. (Klion et al, 2006).

1.4.2. Epidemiología del SHE

La incidencia y la prevalencia del SHE no están bien definidas. La presencia de anomalías genéticas, como los reordenamientos de los genes *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*, solo se observa en una minoría de estos pacientes. En los Estados Unidos, la incidencia de las neoplasias mieloproliferativas con fusión *FIP1L1-PDGFRB*, se ha extrapolado a partir del programa SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) y se ha estimado que la tasa ajustada por la edad es de 0,036 casos por cada 100.000 personas al año. La proporción hombre/mujer es de 1,47, la mediana de edad de presentación se sitúa entre 65 y 74 años, y es excepcional en niños (Crane et al, 2010; Rives et al, 2005). Por razones desconocidas, la mayoría de los pacientes con fusión *FIP1L1-PDGFRB* o de las variantes mieloproliferativas de SHE son hombres, mientras que los demás tipos de eosinofilia no presentan esta preferencia de género (Baccarani et al, 2007; Jovanovic et al, 2007). Los estudios más amplios han revelado que la fusión *FIP1L1-PDGFRB* puede estar presente hasta en el 15% de los enfermos con eosinofilia idiopática en países desarrollados (Jovanovic et al, 2007; Pardanani et al, 2006).

1.4.3. Clínica y tratamiento del SHE

En la mayoría de las ocasiones la clínica de los enfermos con SHE o las entidades relacionadas dependen de los órganos infiltrados por los eosinófilos. Generalmente, el daño se limita a ciertos órganos como el corazón, los pulmones, la piel o el tracto gastrointestinal. Son frecuentes la trombosis y la fibrosis endomiocárdica. Todavía se desconoce la causa por la que la LEC con fusión *PDGFRA/FIP1L1* tiende a causar alteraciones endomiocárdicas, mientras que otros órganos, como el tubo digestivo, se afectan con menos frecuencia.

El tratamiento de inicio de estos enfermos ha sido el uso de esteroides a altas dosis, que suele ser eficaz en la mayoría de los casos. Sin embargo, los enfermos con fusión *PDGFRA/FIP1L1* o con reordenamientos del gen *PDGFRB* suelen responder a los inhibidores tirosina kinasa (Gleich et al, 2002; Metzgeroth et al, 2008; David et al,

2007). En el primer caso las dosis usadas son bajas y generalmente con 100 mg/d de imatinib es suficiente para lograr la respuesta y en muchos casos se obtiene una remisión molecular. (Klion et al, 2004). Sin embargo, los enfermos con reordenamiento de *PDGFRB* necesitan, por regla general, dosis más altas de imatinib. Se ha descrito la aparición de resistencias al tratamiento, pero son poco frecuentes. (Lierman et al, 2009; Cools et al, 2003; Von Bubnoff et al, 2011). Por el contrario, los enfermos con eosinofilia en ausencia de la alteración en el receptor del PDGF no suelen responder al imatinib.

1.4.4. Patogenia del SHE

La descripción de reordenamientos en los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* en los enfermos con LEC ha motivado que una gran parte de la investigación acerca de los mecanismos implicados en la producción de estas enfermedades se centre en el estudio de estos receptores.

A finales de los setenta, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) se purificó de los extractos de plaquetas y se caracterizó como un mitógeno para los fibroblastos y las células de origen mesenquimal. En los seres humanos, varias isoformas diméricas se producen a partir de cuatro genes diferentes: PDGFR-A, -B, -C y -D.

Los receptores de PDGF pertenecen al grupo III de la familia de receptores tirosina kinasa, que también incluye c-KIT, FLT3 y el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (Toffalini y Demoulin, 2010). *PDGFRA* y *PDGFRB* son dos genes homólogos que codifican para los receptores α y β . Ahora bien, mientras que *PDGFRA* se une a todos los ligandos salvo PDGF-D, *PDGFRB* se une solamente a PDGF-B y D. Los dos receptores del PDGF comparten un dominio común que consta de cinco dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un solo dominio transmembrana y un dominio *Split-TK* intracelular, que se divide en dos lóbulos conectados por un enlazador polipeptídico flexible (Figura 3).

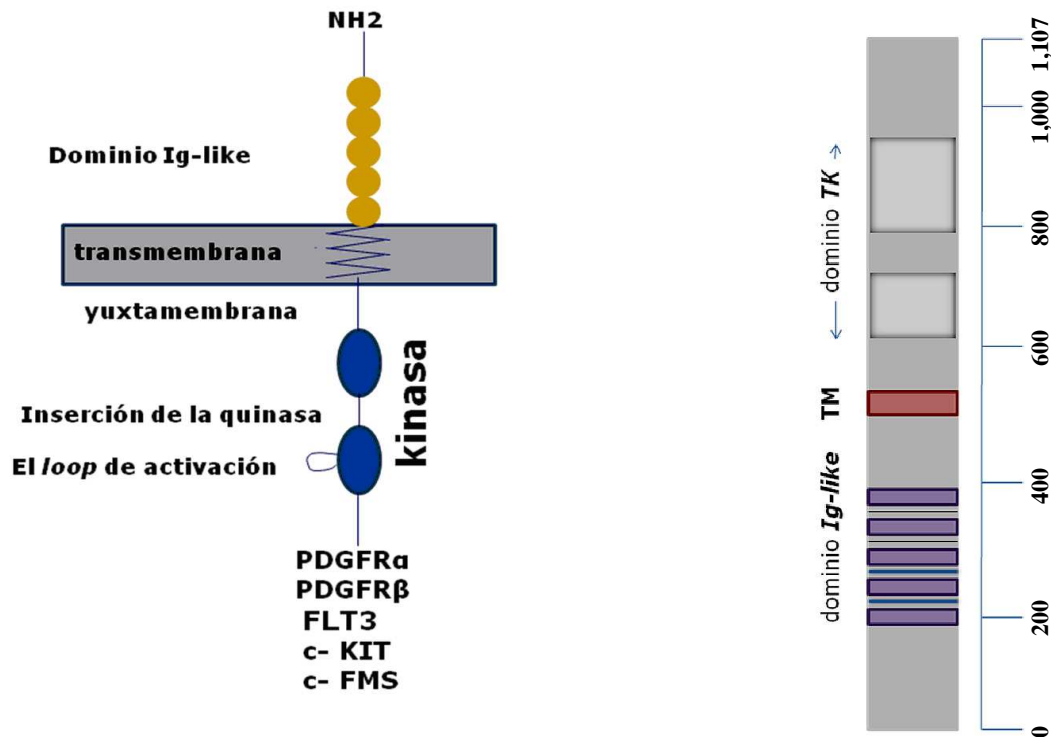


Figura 3. Esquema representativo del gen PDGFR.

Dominio Ig-like: dominio extracelular de Ig-like, que se implica en la interacción proteína-ligando; TM: dominio transmembrana; El dominio Split-TK es una RTK de clase III del dominio quinasas citoplasmáticas con una inserción de 70 a 100 residuos hidrofílicos (modificado de Toffalini et al, 2010)

En ausencia de ligando, las tres regiones del dominio quinasas: el dominio yuxtamembrana intracelular, el *loop* de activación del dominio quinasas y la cola C-terminal, se mantienen en un estado inactivo (Griffith et al, 2004; Chiara et al, 2004). El "loop" de activación, en particular, impide el paso de la señalización a la forma activa.

El PDGF es un ligando dimérico, que forma un complejo con dos moléculas de receptor de PDGF, es decir que el PDGF interactúa con los tres primeros dominios similares a Ig. Por lo tanto, la unión de PDGF induce la dimerización del receptor, que se facilita por el dominio *Ig-like*. Los estudios más recientes sugieren que el receptor también sufre algunos cambios conformacionales tras la unión de ligando (Yang et al, 2008). Este proceso lleva dos dominios quinasas próximos entre sí y estabiliza la conformación activa, lo que conduce a la transfosforilación de restos tirosinas de la parte citoplasmática, que son críticos para la regulación del bucle de activación del núcleo catalítico y del dominio yuxtamembrana (Yuzawa et al, 2007).

Estas fosfotirosinas actúan como sitios de anclaje de los dominios SH2 (*Src Homology 2*) de una variedad de proteínas de transducción de señales intracelulares, que incluyen la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la fosfolipasa C (PLC) y varias quinasas de la familia Src, que son compartidos por los RTK de tipo III.

PDGFRA/FIP1L1, que se observa en torno al 15% de las eosinofilia clonales, la fusión *PDGFRB/ETV6* y la fusión *ZMYM2-FGFR1*. La mayoría de ellas sólo se han descrito en casos aislados.

Tabla 4. Alteraciones moleculares más frecuentes en las enfermedades mieloides y linfoides asociadas con eosinofilia

Gen de fusión defecto molecular/ mutación	Anomalía citogenética	Frecuencia estimada en la NMP-eo (%)	Frecuencia estimada en la LEC (%)
Anomalías del gen PDGFRA			
<i>FIP1L1-PDGFR</i>	del(4q12)	5	10–20
<i>STRN-PDGFR</i>	t(2;4)(p22;q12)	<5	<5
<i>CDK5RAP2-PDGFR</i>	ins(9;4)(q33;q12;q25)	<5	<5
<i>KIF5B-PDGFR</i>	t(4;10)(q12;p11)	<5	<5
<i>BCR-PDGFR</i>	t(4;22)(q12;q11)	<5	<5
<i>ETV6-PDGFR</i>	t(4;12)(q12;p13)	<5	5
Anomalías del gen PDGFRB			
<i>TPM3-PDGFRB</i>	t(1;5)(q21;q33)	<1	<1
<i>PDE4DIP-PDGFRB</i>	t(1;5)(q23;q33)	<1	<1
<i>SPTBN1-PDGFRB</i>	t(2;5)(p16;q33)	<1	<1
<i>WDR48-PDGFRB</i>	t(3;5)(p22;q33)	<1	<1
<i>GOLGA4-PDGFRB</i>	t(3;5)(p22;q33)	<1	<1
<i>PRKG2-PDGFRB</i>	t(4;5;5)(q23;q23;q31)	<1	<1
<i>HIP1-PDGFRB</i>	t(5;7)(q33;q11)	<1	<1
<i>KANK1-PDGFRB</i>	t(5;9)(q33;p24)	<1	<1
<i>CCDC6-PDGFRB</i>	t(5;10)(q33;q21)	<1	<1
<i>CAPRIN1-PDGFRB</i>	t(1;5;11)(p34;q33;p13)	<1	<1
<i>ERC1-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;p13)	<1	<1
<i>BIN2-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;q13)	<1	<1
<i>ETV6-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;p13)	<1	<1
<i>SART3-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;q24)	<1	<1
<i>GIT2-PDGFRB</i>	t(5;12)(q33;q24)	<1	<1
<i>CCDC88C-PDGFRB</i>	t(5;14)(q33;q32)	<1	<1
<i>TRIP11-PDGFRB</i>	t(5;14)(q33;q32)	<1	<1
<i>NIN-PDGFRB</i>	t(5;14)(q33;q24)	<1	<1
<i>TP53BP1-PDGFRB</i>	t(5;15)(q33;q22)	<1	<1
<i>NDE1-PDGFRB</i>	t(5;16)(q33;p13)	<1	<1
<i>SPECC1-PDGFRB</i>	t(5;17)(q33;p11)	<1	<1
<i>MYO18A-PDGFRB</i>	t(5;17)(q33;q11)	<1	<1
<i>RABEP1-PDGFRB</i>	t(5;17)(q33;p13)	<1	<1
Anomalías del gen FGFR1			
<i>FGFR1OP-FGFR1</i>	t(6;8)(q27;p11)	<1	<1
<i>TRIM24-FGFR1</i>	t(7;8)(q34;p11)	<1	<1
<i>CEP110-FGFR1</i>	t(8;9)(p12;q33)	<1	<1
<i>CPSF6-FGFR1</i>	t(8;12)(p11;q15)	<1	<1
<i>FGFR1OP-FGFR1</i>	t(6;8)(q27;p11)	<1	<1
<i>NUP98-FGFR1</i>	t(8;11)(p11;p15)	<1	<1
<i>HERVK-FGFR1</i>	t(8;19)(p11;q13)	<1	<1
<i>FGFR1OP2-PDGFR</i>	ins(12;8)(p11;p11p22)	<1	<1
<i>ZMYM2-FGFR1</i>	t(8;13)(p11;q12)	<1	<1
<i>MYO18A-FGFR1</i>	t(8;17)(p11;q23)	<1	<1
<i>CUX1-FGFR1</i>	t(7;8)(q22;p11)	<1	<1
<i>LRRFIP1-FGFR1</i>	t(2;8)(q37;p11)	<1	<1
<i>BCR-FGFR1</i>	t(8;22)(p11;q11)	<1	<1

Gen de fusión defecto molecular/ mutación	Anomalía citogenética	Frecuencia estimada en la NMP-eo (%)	Frecuencia estimada en la LEC (%)
Anomalías y mutaciones en otros genes			
<i>PCM1-JAK2</i>	t(8;9)(p21;p24)	<1	<1
<i>ETV6-JAK2</i>	t(9;12)(p24;p13)	<1	<1
<i>BCR-JAK2</i>	t(9;22)(q11;p24)	<1	<1
<i>SPTBN1-FLT3</i>	t(2;13)(p16;q12)	<1	<1
<i>ETV6-FLT3</i>	t(12;13)(p13;q12)	<1	<1
<i>ETV6-ACSL6</i>	t(5;12)(q33;p12)	<1	<1
<i>CBF-MYH11</i>	inv(16)	<1	<1
<i>BCR-ABL1</i>	t(9;22)(q34;q11)	<1	<1
<i>KIT D816V</i>	-	<1	<1
<i>JAK2 V617F</i>	-	<1	<1
<i>PDGFRA Y849S/N659S</i>	-	<1	<1

(Modificado de Valent et al, 2012).

LEC: leucemia eosinofílica crónica; NMP-eo: Neoplasia mieloproliferativa con eosinofilia asociada

Se desconocen los mecanismos por los que se produce la alteración en el locus de *PDGFR*, aunque se ha sugerido que pueda existir una alteración en la reparación final del ADN no homólogo. Además, los genes implicados en las fusiones tienden a agruparse en los sitios cromosómicos frágiles (Gandhi et al, 2010; Burrow et al, 2009). Respecto al gen *PDGFRB*, sus puntos de rotura, como en la mayoría de otros genes de fusión, se producen en los exones grandes, (Novo y Vizmanos, 2006). Por el contrario, los puntos de interrupción de *PDGFRA* se localizan en el exón 12, que codifica el dominio yuxtamembrana, cuya interrupción activa la proteína de fusión. En la fusión oncogénica, el otro gen que se fusiona siempre reemplaza al extremo 5' de *PDGFRA* o *PDGFRB*. Por consiguiente, la expresión del producto oncogénico de la fusión está controlada por el gen promotor del otro gen que se fusiona. Por lo tanto, las proteínas de fusión pueden ser sobreexpresadas en las células que normalmente no expresan los receptores naturales de PDGF. Además de generar un oncogén constitutivamente activado, esta sobreexpresión es una consecuencia importante del proceso de la fusión del gen y su medida en la sangre de los enfermos puede orientar el diagnóstico y la respuesta al tratamiento (Erben et al, 2010).

La activación tirosina kinasa del producto de la fusión puede ocurrir mediante dos mecanismos diferentes (Figura 5). La primera consiste en la oligomerización de la proteína híbrida y generalmente se encuentra en las fusiones de *PDGFRB*. El otro mecanismo se basa en la pérdida del dominio inhibidor yuxtamembrana, y se encuentra en todas las fusiones de *PDGFRA* así como en un subgrupo pequeño de los productos de translocación del *PDGFRB*. Los productos de la fusión de PDGFR se encuentran en

el citosol. Este hallazgo explica que, aunque se activan constitutivamente, se escapan de la ubiquitinación y de la degradación normal por el lisosoma lo que aumenta su potencial de transformación (Toffalini et al, 2009).

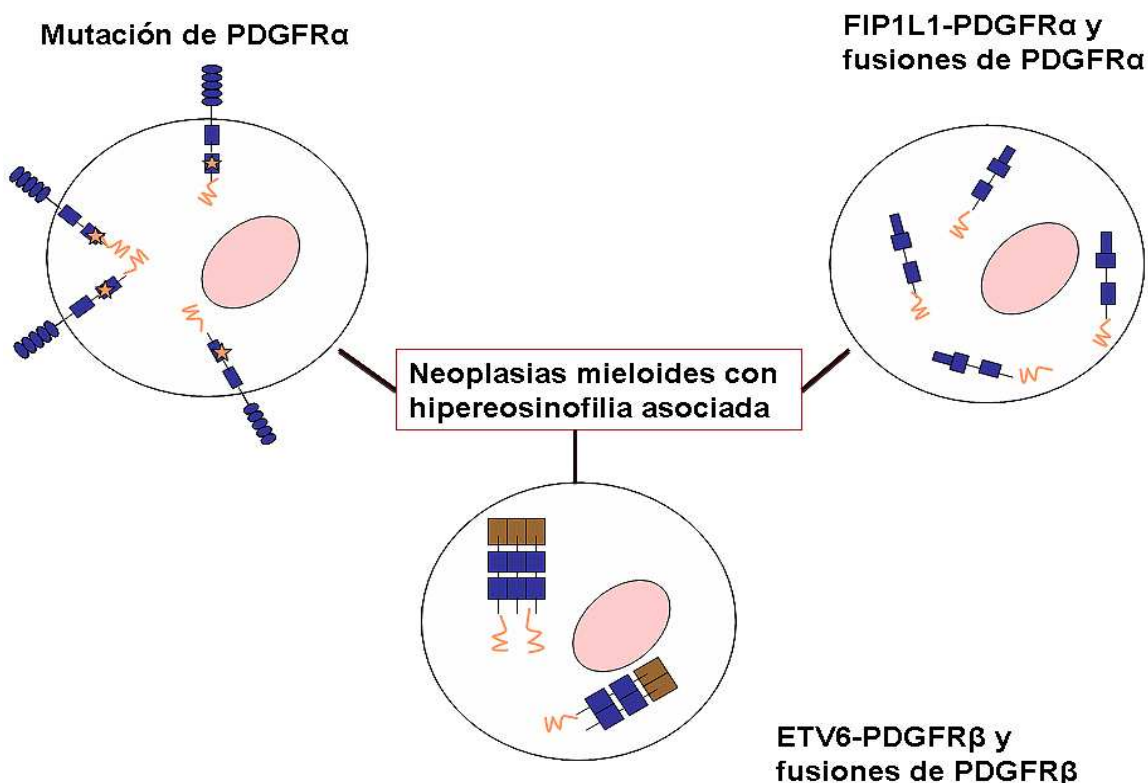


Figura 5. Activación de los receptores de PDGF en las neoplasias hematológicas

(Modif. de Demoulin y Montano-Almendras, 2012)

Recientemente se han descrito otras mutaciones en el gen *CSF3R*, que suelen observarse en enfermos con LNC o LMC atípica (Maxson et al, 2013) y en el gen *CALR* (Nangalia et al, 2013). Aún se desconoce si estas mutaciones pueden estar presentes en enfermos con SHE.

1.4.5. Las Neoplasias Mieloides asociadas con eosinofilia y anomalías del gen *PDGFRA*

La identificación de una pérdida en el brazo largo del cromosoma 4, de una pequeña región de tan sólo 800kb, que da lugar a la fusión de los genes *PDGFRA* y *FIP1L1*, fue un hallazgo trascendental en el conocimiento de las hipereosinofilias mieloproliferativas (Cools et al, 2003). Los puntos de rotura en *FIP1L1* son variables y normalmente están situados en una región de 40kb de longitud, que abarca los intrones 7-10 del gen. En cambio, los puntos de interrupción en *PDGFRA* se restringen al exón 12 (Figura 6).

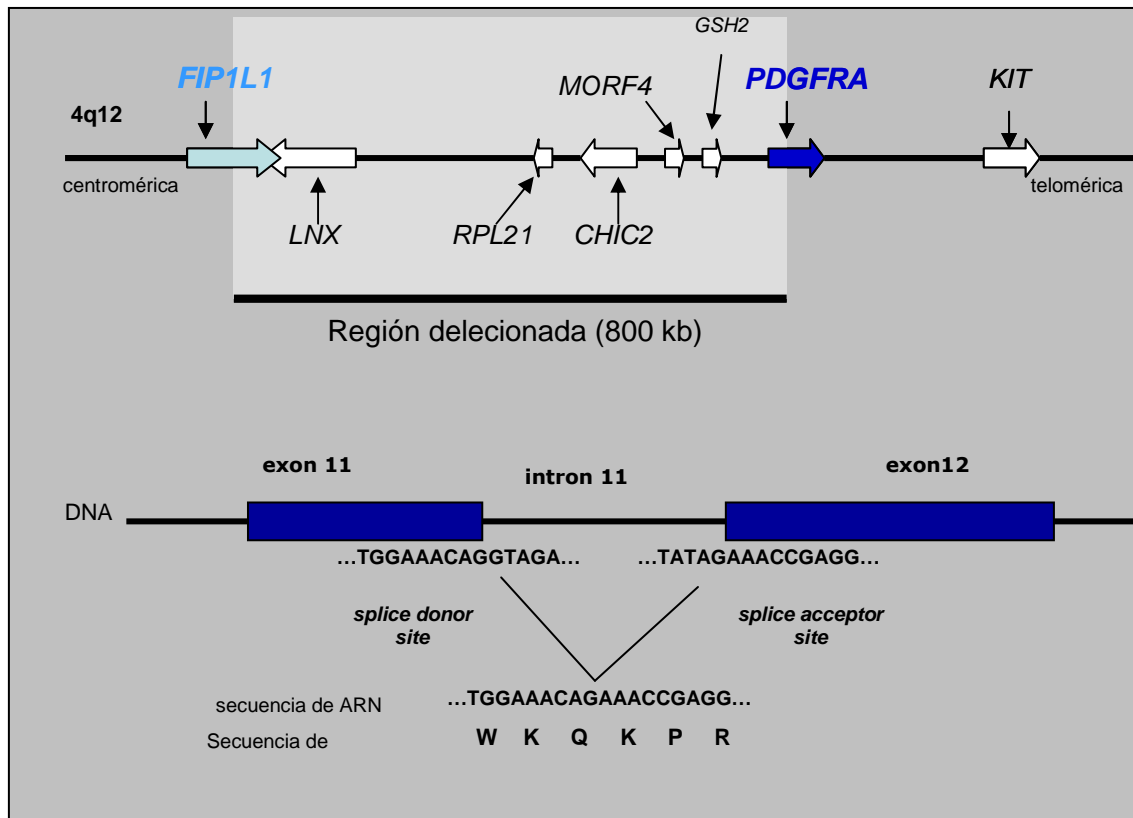


Figura 6. Puntos de ruptura en los genes *PDGFRA* y *FIP1L1*

(modificado de Cools *et al*, 2003)

El reordenamiento *FIP1L1-PDGFRA* se puede detectar mediante FISH o RT-PCR. La detección de la fusión *FIP1L1-PDGFRA* mediante PCR se puede hacer tanto en la sangre periférica como en la médula ósea y es conveniente usar una PCR anillada para identificar la fusión de manera fiable (Score *et al*, 2006). La deleción del locus *CHIC2* en el cromosoma 4q12 se detecta por la FISH y sirve para analizar esta fusión génica. (Pardanani *et al*, 2003; Fink *et al*, 2009).

La presencia de la *FIP1L1-PDGFRA* es característica de las eosinofilias clonales, aunque no exclusiva, ya que es posible observarla en algunos casos de leucemia mieloblástica aguda y de linfoma linfoblástico de células T (Metzgeroth *et al*, 2007; Hiwatari *et al*, 2008; Monma *et al*, 2006). Sin embargo, se ha demostrado que, en las LAM, las mutaciones no son capaces de activar constitutivamente el receptor.

Las NMP con fusión *FIP1L1-PDGFRA* son un trastorno multisistémico. Las manifestaciones de la enfermedad son secundarias a la infiltración eosinofílica del tejido, la liberación de los mediadores pro-inflamatorios y de los productos tóxicos de

gránulos. Se observa esplenomegalia en el 63% de los casos (Vandenberghe et al, 2004; Ogbogu et al, 2009). La complicación más grave es la fibrosis endomiocárdica con síntomas de miocardiopatía restrictiva. También se pueden producir fibrosis secundarias a la cicatrización de las válvulas mitral y tricúspide, que pueden dar lugar a insuficiencia valvular y a la formación de trombos intracardíacos (Kleinfeldt et al, 2010). En ocasiones puede afectarse el parénquima pulmonar y producirse una enfermedad restrictiva u obstructiva pulmonar (Dulohery et al, 2011). En estos enfermos es frecuente la trombosis arteriales o venosas.

Los eosinófilos pueden presentar un amplio espectro de anomalías morfológicas, como granulación escasa con áreas claras de citoplasma, vacuolización citoplasmática, tamaño anormal de los gránulos y núcleos hiper o hiposegmentados. Son frecuentes la presencia de anemia y de trombocitopenia (Bain et al, 2008; Vandenberghe et al, 2004). La médula ósea es hipercelular, con aumento de eosinófilos y de sus precursores. La maduración de los eosinófilos es completamente normal. Se observa un aumento en los niveles de triptasa sérica y de vitamina B12 en la mayoría de los enfermos. Antes de iniciar el tratamiento, es conveniente determinar el nivel sérico de troponina y realizar un ecocardiograma porque en los pacientes con SHE un aumento del nivel de troponina cardíaca en el suero se correlaciona con la presencia de cardiomegalia.

El tratamiento de elección es el imatinib. La dosis inicial recomendada es 100 mg/día. Los enfermos con fusión *FIP1L1/PDGFR*A son más sensibles a la inhibición por imatinib que los enfermos con fusión *BCR-ABL*. La concentración requerida de imatinib para inhibir las células Ba/F3 que expresan *FIP1L1-PDGFR*A en un 50% (IC₅₀) es 3,2 nmol/L, mientras que para *BCR-ABL* es 582 nmol/L (Cools et al, 2003). Estos resultados *in vitro* se correlacionan estrechamente con los hallazgos clínicos. La mayoría de los expertos recomienda una dosis de mantenimiento de 100 mg/día de forma indefinida, aunque también se han usado con éxito dosis de 100 y 200 mg a la semana (Helbig et al, 2008). Imatinib solo suprime el clon *PDGFR1/FIP1L1*, pero no lo elimina; por esta razón, la interrupción del fármaco produce la recaída de la enfermedad, si bien los enfermos responden a la reintroducción de imatinib (Klion et al, 2007).

La gran mayoría de los enfermos con LEC y fusión *PDGFR1/FIP1L1* obtienen remisiones hematológicas, mientras que solo un 14% de los enfermos con SHE sin fusión *PDGFR1/FIP1L1* responden a imatinib. En estos enfermos la respuesta puede

perderse con el tiempo (Baccarani et al, 2007). Los pacientes con intolerancia a imatinib pueden ser tratados con otros ITK como dasatinib y nilotinib con resultados similares (Imagawa et al, 2011; Tabouret et al, 2011). En los pacientes con cardiomiopatía evidente por eosinófilos y en pacientes con otras comorbilidades cardiacas, se recomienda el uso de corticoesteroides antes del tratamiento con ITK (Pitini et al, 2003).

La aparición de resistencia primaria a imatinib es poco frecuente en estos enfermos porque el dominio kinasa de *PDGFRA* contiene una cantidad limitada de residuos. Aún así se han descrito casos aislados con dos mutaciones en la secuencia de *PDGFRA*, resultado de la modificación de dos aminoácidos dentro del dominio kinasa: S601P y L629P, que pueden responder a imatinib (Simon et al, 2008; Elling et al, 2011). Sin embargo, la presencia de otras mutaciones como la T674I, la D842V y la mutación combinada de T674I-T874I suelen ser resistentes a los ITK (Von Bubnoff et al, 2011; Lierman et al, 2009). En estos enfermos con mutaciones que confieren resistencia a imatinib la mediana de aparición de la resistencia suele ser de 5 meses y se acompaña de un aumento en el número de blastos en la MO (Metzgeroth et al, 2012). De todos los cambios observados en el ADN, la mutación T674I es la más resistente, por lo que se la ha comparado con la mutación T315I en los enfermos con fusión *BCR/ABL*. Estos enfermos no responden bien al uso de otros ITK, como nilotinib, o a otros agentes como sorafenib o midostaurina (Metzgeroth et al, 2012).

En algunos casos las células resistentes a imatinib, tienen hipermetilada la región promotora del gen *PTEN*. En estos casos podría plantearse el uso de agentes hipometilantes como tratamiento adyuvante a los ITK (Nishioka et al, 2010).

Además del uso de ITK de segunda generación, en los pacientes que desarrollan resistencia al imatinib, puede considerarse el trasplante alogénico hematopoyético, tanto mieloablativo como de intensidad reducida. (Halaburda et al, 2006; Ueno et al, 2002). El uso de interferón-alfa se ha abandonado en la práctica clínica (Pardanani et al, 2004; Schoffski et al, 2000).

1.4.6. Las Neoplasias Mieloides con eosinofilia asociada y anomalías del gen *PDGFRB*

Las alteraciones del gen *PDGFRB* son una causa infrecuente de eosinofilia clonal (David et al, 2007). Una característica especial de estas enfermedades es la gran

cantidad de genes que pueden fusionarse con *PDGFRB*, de manera que se han descrito más de 20 parejas de fusión (Figura 8) y dan lugar, en algunos casos, a enfermedades con características especiales. La fusión más frecuente de *PDGFRB* se observó por primera vez en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), donde este gen se fusiona a *ETV6*, en la t(5;12)(p12;q31-33) (Golub et al, 1994; Apperley et al, 2002). Esta neoplasia es más común en los hombres que las mujeres (2:1), con una mediana de edad de aparición en torno a los 65 años (Steer y Cross, 2002). En la fusión *PDGFRB/ETV6* se une la parte N-terminal (PNT) del factor de transcripción *ETV6* (el dominio puntual) al dominio kinasa de *PDGFRB* (Carroll et al, 1996). El dominio puntual es necesario para la activación constitutiva del dominio kinasa e induce la oligomerización de la proteína, lo que produce la activación inducida por el ligando. Además, el gen quimérico *PDGFRB/ETV6* conserva el dominio de transmembrana, necesario para la transformación celular (Toffalini y Demoulin, 2010).

La expresión de este oncogén en las células hematopoyéticas, tales como las células Ba/F3, estimula el crecimiento mediante la activación de varias vías de señalización como PI3K, STAT5 y NF- κ B (Carroll et al, 1996; Dierov et al, 2002; Sternberg et al, 2001; Besancon et al, 1998). Además, la sobreexpresión de *PDGFRB-ETV6* también puede inducir la apoptosis de las células Ba/F3 en la presencia de IL-3.

La fusión *ETV6-PDGFRB* induce un trastorno mieloproliferativo grave en la médula ósea del ratón, aunque en los ratones no se produce eosinofilia (Fukushima et al, 2009). El desarrollo de una neoplasia mieloproliferativa depende de la presencia de múltiples sitios de fosforilación de tirosina en la parte del gen *PDGFRB* que se fusiona (Tomasson et al, 2000) y en los ratones deficientes en STAT5 se retrasa la aparición de la enfermedad (Cain et al, 2007). Por el contrario, las células progenitoras CD34+ humanas transducidas con *ETV6-PDGFRB* proliferan en ausencia de citoquinas y se diferencian a eosinófilos, en un proceso dependiente de NF- κ B (Montano-Almendras et al, 2012). La fusión *ETV6-PDGFRB* también activa las vías de STAT1, STAT3 y STAT5 en estas células (Dobbin et al, 2010).

En modelos *in vivo*, se ha observado que la fusión *ETV6-PDGFRB* induce una leucemia con una latencia más corta en las células de médula ósea deficientes en STAT1, lo que sugiere que STAT1 tiene un papel supresor sobre las células tumorales (Cain et al, 2007).

A diferencia de la fusión *ETV6-PDGFRB*, ninguno de las otras fusiones afectan al dominio PNT. Los dominios de oligomerización más frecuentes en las fusiones *PDGFRB*, son los de hélice, en los que se han localizado 18 de los 23 productos de fusión (Medves y Demoulin, 2012). La afectación del dominio hélice está bien documentada, pero su papel en las fusiones de *PDGFR* no ha sido estudiado en profundidad excepto en dos fusiones: *KANK1-PDGFRB*, donde la trimerización se hace por las hélices o por la unión de otro dominio exclusivo de una manera redundante (Medves et al, 2011) y en la fusión *HIP-PDGFRB* donde las hélices son indispensables para la homodimerización (Ross y Gilliland, 1999).

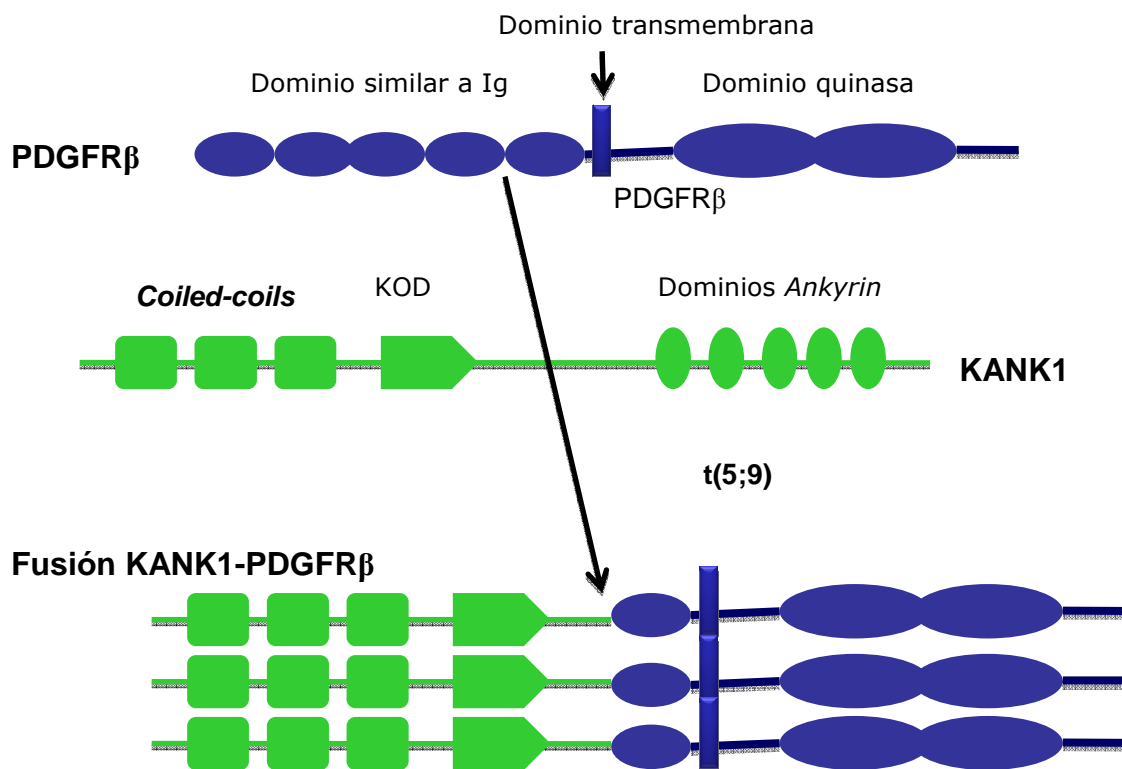


Figura 7. Representación esquemática de la fusión *KANK1-PDGFRB* (Demoulin y Montano-Almendras, 2012; Medves y Demoulin, 2012)

La unión a los receptores de PDGF no solo induce la dimerización, sino que también producen un cambio conformacional, particularmente en el cuarto dominio similar a Ig (Yang et al, 2008). Estos cambios podrían ayudar a interrumpir el dominio inhibidor yuxtamembrana y orientarse adecuadamente al dominio kinasa. De acuerdo con estas observaciones, se ha demostrado que la dimerización de *ETV6-PDGFRB* y de *KANK1-PDGFRB* no es suficiente para inducir la transformación celular. De hecho, las

secuencias situadas entre la oligomerización del dominio del gen translocado y el dominio kinasa de *PDGFRB* son fundamentales para determinar la óptima conformación de ambas proteínas de fusión (Bell et al, 2000; Medves et al, 2011).

Los pacientes con fusión *ETV6-PDGFRB* son sensibles a imatinib. La IC_{50} para imatinib es similar en las líneas celulares que expresan *ABL*, por lo que la dosis recomendada de imatinib es de 400 mg/día (Carroll et al, 1997). Nilotinib, a una dosis de 400 mg/12 h, es eficaz en los pacientes que recaen después de haber alcanzado una remisión citogenética completa con imatinib (Nand et al, 2009). En los enfermos que no responden a ITK puede realizarse un TPH alogénico (Chmielecki et al, 2012).

La mayoría de las fusiones de *PDGFRB* ocasionan NMP con eosinofilia, pero se han descrito otras fusiones que pueden dar lugar a otras enfermedades. Así se ha identificado la fusión del gen *CEP85L*, que codifica una proteína centrosomal de 85KD, en pacientes diagnosticados de linfoma linfoblástico T y una neoplasia mieloproliferativa asociada con eosinofilia. (Chmielecki et al, 2012; Winkelmann et al, 2013). Estos enfermos suelen ser varones y pueden responder al tratamiento con imatinib.

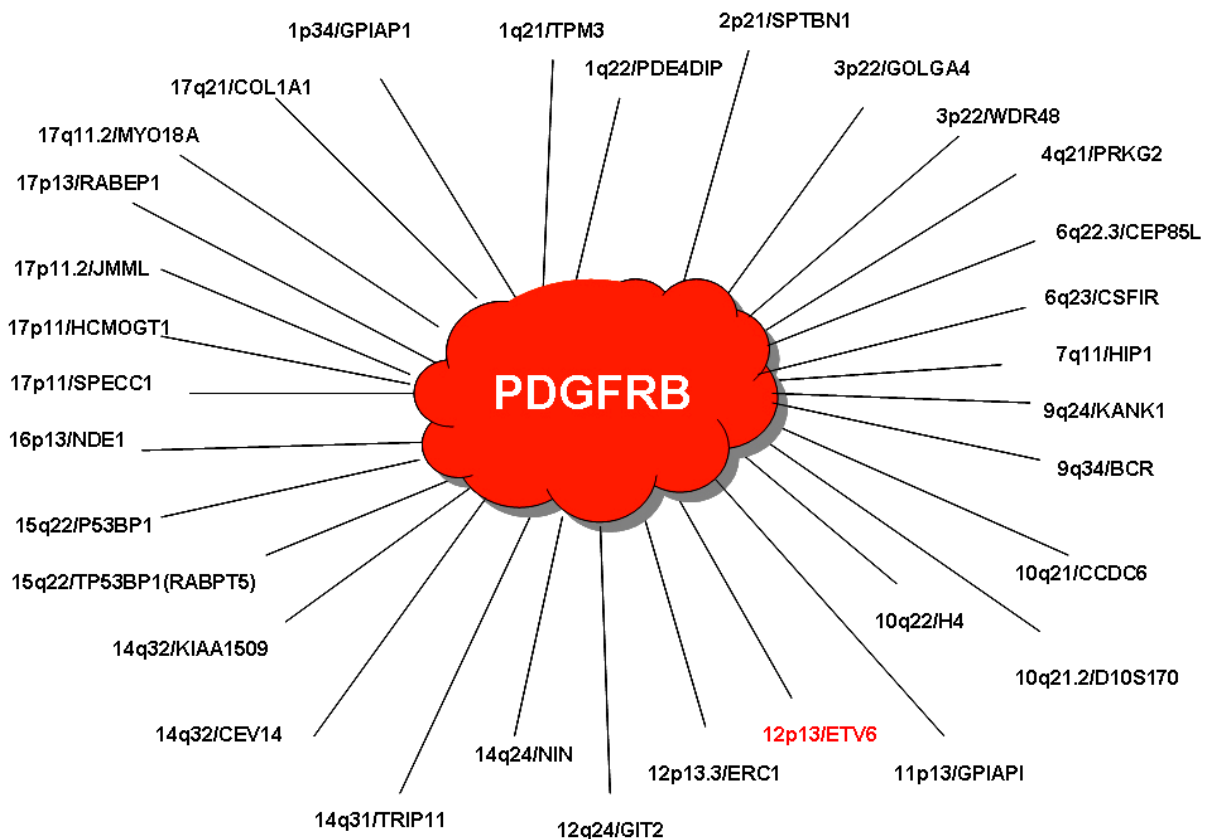


Figura 8. Regiones cromosómicas y genes que se traslocan con *PDGFRB*

1.4.7. Las Neoplasias Mieloides y Linfoides con eosinofilia y anomalías de *FGFR1*

Las alteraciones de 8p11 en los síndromes mieloproliferativos suelen asociarse con translocaciones del gen *FGFR1* y causan una eosinofilia periférica en el contexto de una leucemia/linfoma linfoblástico (Jackson et al, 2010). Aunque el mecanismo molecular es similar al que se produce en las leucemias eosinofílicas con reordenamiento de *PDGFRA* o de *PDGFRB*, las hemopatías asociadas con translocaciones de *FGFR1* tienen características clínicas distintas. El Síndrome Mieloproliferativo con reordenamiento de 8p11 (EMS) afecta a enfermos de cualquier edad con un ligero predominio masculino (Aguiar et al, 1995; Jackson et al, 2010). El origen de la célula podría estar tanto a nivel de las células progenitoras tempranas como de los precursores de las células T, que se han retenido en la fase de diferenciación de la serie mieloide. Los pacientes presentan eosinofilia y la médula ósea es hiper celular con un incremento variable en los eosinófilos. Suelen cursar con linfadenopatías y se asocian con mal pronóstico.

La característica molecular de la EMS está definida por el reordenamiento del gen *FGFR1*, que produce una proteína quimérica con activación tirosina kinasa de forma constitutiva. La translocación más frecuente es la t(8;13)(p11;q12) e implica el gen *ZNF198* en el cromosoma 13q12. También pueden observarse la t(8;9) y la t(6;8), con una incidencia menor. Se han descrito hasta 11 variantes, siempre con la implicación del fragmento C-terminal del gen *FGFR1*. (<http://atlasgeneticsoncology.org/>)

Los enfermos con t(8;13)(p11;q12)(*ZNF198/FGFR1*), suelen presentar clínica de linfoma linfoblástico. A menudo, los pacientes con t(8;22)(p11;q11)(*BCR/FGFR1*), presentan leucocitosis y basofilia en lugar de eosinofilia. Por el contrario, en la EMS asociada con la t(8;9)(p11;q34) suele haber afectación de las amígdalas con monocitosis asociada (Jackson et al, 2010).

Estos enfermos no responden a imatinib, aunque se han descrito casos aislados de respuestas a midostaurina (Chen et al, 2004). Por tanto, el pronóstico de la EMS es muy malo, ya que la enfermedad responde muy mal a la quimioterapia y solo se ha logrado la supervivencia en algunos enfermos sometidos a un TPH (Jackson et al, 2010).

1.5. Leucemia Eosinofílica Crónica-NOS y de SHE

Por último, un grupo heterogéneo de eosinofilias clonales están clasificados por la OMS como la leucemia eosinofílica crónica, sin otra especificación (LEC-NOS) (Swerdlow et al, 2008). Este diagnóstico está reservado para pacientes que tienen evidencia de enfermedad clonal y que cumplen los siguientes criterios: (1) cifra de eosinófilos $\geq 1.500/\mu\text{L}$ (2) Ausencia de reordenamiento de *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*; (3) Ausencia de t(9;22); (4) Menos de 20% de blastos en la médula ósea; y (5) (a) Más de 5% de blastos en la MO, o (b) más de 2% de blastos en la sangre periférica, o (c) anomalías citogenéticas clonales, o (d) alteraciones moleculares clonales.

Para realizar el diagnóstico de SHE es preciso que exista eosinofilia persistente superior a $1.500/\mu\text{L}$ durante 6 meses, con daño tisular secundario a la eosinofilia y además descartarse que haya una eosinofilia secundaria y otras patologías como leucemia mieloblástica aguda (LAM), síndrome mielodisplásico (SMD), NMP, NMP/SMD y mastocitosis sistémica. Además es preciso excluir la presencia de células T con fenotipo aberrante. (Bain et al, 2008). Los casos que no tengan daño tisular pueden diagnosticarse de hipereosinofilia idiopática (Bain et al, 2008).

2. Los microarrays genómicos

Los microarrays genómicos son herramientas de análisis genético que permiten un análisis global de las ganancias y pérdidas de ADN. Esta técnica se basa en los mismos principios que la CGH convencional, pero en vez de cromosomas se utilizan sondas de ADN, sobre las que se hibrida el ADN del tumor (Solinas-Toldo et al, 1997; Pinkel et al, 1998; Pollack et al, 1999). Pueden incluir sondas de varios tamaños, desde 100-200 kb (BACs y PACs) a sondas de menor tamaño pero mayor especificidad, como los oligonucleótidos (25-80 bases), que pueden cubrir regiones cromosómicas concretas o todo el genoma completo (Snijders et al, 2001). Las ventajas y las limitaciones de los arrays genómicos dependen de la plataforma elegida. Por ello, tanto la cantidad de clones depositados en el array como la manera de amplificarlos es crucial para la sensibilidad final y la calidad del análisis. El uso de clones de grandes insertos como son los BAC y PAC proporciona una intensidad de señal suficiente para detectar cambios en una sola copia y las alteraciones pueden ser inmediatamente relacionadas con los marcadores genéticos (Oostlander et al, 2004).

Esta tecnología ha resultado de gran utilidad para delimitar áreas de ganancia y pérdida genómica en enfermedades de origen genético, hereditario y tumoral, así como para caracterizar los perfiles genómicos de varios procesos tumorales con una mayor resolución que la que se conseguía con las técnicas disponibles hasta el momento, como la CGH convencional (Martinez-Climent et al, 2003; Veltman et al, 2003; Fritz et al, 2002; Peiffer et al, 2006; Grubor et al, 2009; de Leeuw et al, 2004; Kohlhammer et al, 2004; Rubio-Moscardo et al, 2005; Tyybakinoja et al, 2006).

En este trabajo de tesis doctoral hemos aplicado para el análisis genético de las eosinofalias un BAC-array con una resolución de 1Mb diseñado y fabricado en nuestro laboratorio, que contiene más de 7.000 sondas, 176 de los cuales contenían genes relacionados con cáncer (oncogenes o genes supresores de tumores). El resto de los clones están distribuidos a lo largo del genoma humano, espaciados a intervalos de aproximadamente 1 Mb. Además hemos usado microarrays de oligonucleótidos para confirmar los resultados observados por el BAC array.

Hipótesis

La definición de nuevas entidades nosológicas en el cáncer siempre supone un reto diagnóstico. En el caso de las neoplasias mieloproliferativas esta situación ha permanecido estable durante muchos años; sin embargo, en la última década, el hallazgo de la mutación V617F del gen *JAK2*, de los reordenamientos de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* y, más recientemente, de los genes *SETBP1* y *CALR*, ha modificado sustancialmente el diagnóstico de estas enfermedades.

Por ello, y como paso previo, nos planteamos la creación de un Registro Español de Eosinofilias que fuera el punto de partida que estimulara un aumento del interés por estos procesos entre los profesionales médicos. No hay que olvidar que las eosinofilias suelen ser valoradas por diferentes especialidades de Medicina Interna (alergólogos, neumólogos, especialistas en aparato digestivo e internistas) por lo que el diagnóstico de las eosinofilias clonales es casi siempre difícil. Por consiguiente, en primer lugar nos propusimos hacer una llamada de atención sobre estos procesos para abarcar la mayoría de las especialidades médicas con el fin de poder disponer del mayor número de casos posible. Éramos conscientes de la dificultad que plantea establecer una incidencia real de estos procesos, pero al menos podríamos tener una estimación de ella si hacemos un análisis sistemático de todas las enfermedades recibidas con la sospecha de neoplasias mieloproliferativas como síndromes mieloproliferativos (SMP), SMP/SMD o con el diagnóstico de eosinofilia crónica.

Por lo tanto intentamos determinar la incidencia real de estos procesos y si el estudio de hibridación “in situ” con fluorescencia (FISH) con sondas específicas puede poner de manifiesto la existencia de estas enfermedades.

En segundo lugar nos propusimos usar las nuevas técnicas de análisis genético, que facilitan el estudio del genoma de manera global y que pueden constituir una herramienta de gran utilidad para el estudio de las alteraciones genéticas en las NMP. En este sentido, los microarrays genómicos permiten analizar, en un solo experimento, la presencia de ganancias y pérdidas de cualquier segmento del genoma y, gracias a su gran resolución, delimitar regiones genómicas implicadas en los procesos neoplásicos que podrían pasar inadvertidas mediante otras técnicas de citogenética molecular. Los microarrays se han aplicado en pocas ocasiones en el estudio de las NMP por lo que su uso puede contribuir a definir nuevas regiones implicadas en estas enfermedades. No hay que olvidar que las alteraciones genéticas clonales son muy raras en estas

enfermedades, por lo que es necesario profundizar en la descripción de nuevas regiones implicadas en estos procesos.

Para ello, en el presente trabajo de tesis doctoral hemos analizado una serie amplia de pacientes con eosinofilia crónica (teniendo en cuenta su baja prevalencia y las dificultades expuestas previamente) combinando las técnicas de FISH con las de análisis masivo, como son los microarrays genómicos. Nuestra hipótesis se basa en que el uso de estas metodologías puede ayudar a diagnosticar este nuevo grupo de enfermedades, a la vez que puede determinar la existencia de regiones no implicadas previamente en estos procesos.

Objetivos

Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de la incidencia y de las características clínicas y biológicas de las neoplasias mieloides asociadas con eosinofilia y reordenamientos de los genes *PDGFRA* o *PDGFRB*.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de reordenamientos de los genes *PDGFRA* y *PDGFRB* en enfermos con eosinofilia crónica.
2. Analizar las características clínicas y biológicas de los enfermos con fusión *PDGFRA/FIP1L1* y su respuesta al tratamiento con inhibidores tirosina kinasa.
3. Analizar las características clínicas y biológicas de los enfermos con reordenamiento del gen *PDGFRB* y su respuesta al tratamiento con inhibidores tirosina kinasa.
4. Estudiar la presencia de nuevas regiones genéticas alteradas en los enfermos con eosinofilia mediante la aplicación de microarrays genómicos (CGH arrays).

Artículos científicos

Capítulo 1

Arefi et al.

**Incidence and clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms
displaying a PDGFRB rearrangement.
Eur J Haematol. 2012; 89: 37-41.**

ORIGINAL ARTICLE

Incidence and clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms displaying a *PDGFRB* rearrangement

Maryam Arefi¹, Juan L. García², María J. Peñarrubia¹, José A. Queizán³, Lourdes Hermosín⁴, Lucía López-Corral⁵, Marta Megido⁶, Pilar Giraldo⁷, Natalia de las Heras⁸, Raúl J. Vanegas⁹, Norma C. Gutiérrez⁵, Jesús M. Hernández-Rivas^{2,5,10}

¹Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain; ²Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IESCYL), Salamanca, Spain; ³Servicio de Hematología, Hospital General de Segovia, Salamanca, Spain; ⁴Servicio de Hematología, Hospital del SAS, Jerez, Spain; ⁵Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁶Servicio de Hematología, Hospital Camino de Santiago, Ponferrada, Spain; ⁷Servicio de Hematología, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ⁸Servicio de Hematología, Hospital Virgen Blanca, León, Spain; ⁹Servicio de Hematología, Hospital General de Ciudad Real, Ciudad Real, Spain; ¹⁰IBSAL, IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain

Abstract

Objectives: The myeloproliferative neoplasms displaying a *PDGFRB* rearrangement are rare diseases derived from a haematopoietic stem cell. The goals of the study were to assess the incidence of these disorders and to define the clinical and biological characteristics as well as the response to the imatinib therapy. **Methods:** A total of 556 patients with myeloproliferative neoplasms were studied by means of molecular cytogenetics. **Results:** The incidence of myeloproliferative neoplasms (MPN) with *PDGFRB* rearrangement was low (10 cases, 1.8% of all MPN). Most of the patients showed moderate anaemia (median Hb was 10.0 gr/dL; range from 7.5 to 13 g/dL), leukocytosis (median white blood cells was $21.7 \times 10^9/L$ with a range from 4 to $43 \times 10^9/L$) and eosinophilia (median circulating eosinophils was $2.4 \times 10^9/L$ with a range of 1.1 – $5.7 \times 10^9/L$) with a median of bone marrow infiltration cells displaying *PDGFRB* rearrangement of 55% (range, 37–85%). In three cases, a t(5;12) was observed while two patients showed rearrangements of 17q21 region. In two cases, a del(5)(q31) was observed. Most of the patients responded to standard dosage of imatinib, and the response was maintained in the time in those patients with a follow-up higher than 9 years. **Conclusions:** The incidence of patients with *PDGFRB* rearrangement is low. These patients showed leukocytosis with eosinophilia and anaemia. The efficacy of imatinib therapy in patients showing *PDGFRB* rearrangement is high. For this reason, in all patients with MPN without any other molecular aberration, *PDGFRB* rearrangement should be ascertained.

Key words myeloproliferative neoplasms (MPNs); atypical CML (aCML); chronic myelomonocytic leukaemia (CMML); *PDGFRB* rearrangement; cytogenetics; fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)

Correspondence Jesús María Hernández, Servicio de Hematología y Departamento de Medicina, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58, 37007 Salamanca, Spain. Tel: +34923291100; Fax: +34923294624; e-mail: jmhr@usal.es

Accepted for publication 30 April 2012

doi:10.1111/j.1600-0609.2012.01799.x

Myeloid malignancies are stem cell haematopoietic disorders characterised by expansion and excess proliferation in myeloid lineages including acute myeloid leukaemia (AML), myelodysplastic syndromes (MDS) and myeloproliferative neoplasms (MPNs) (1). The incorporation of molecular markers as well as histological, clinical and laboratory data provided a new classification for MPNs in 2008. Thus, rear-

rangements of the genes *PDGFRA*, *PDGFRB* and *FGFR1* were grouped into a new category: myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of *PDGFRA*, *PDGFRB* or *FGFR1* genes (2,3).

In general, the molecular pathogenesis of MPNs BCR-ABL negative is incompletely understood. Most patients display normal karyotype, and only a small portion of patients

present an acquired reciprocal chromosomal translocations involving recurrent breakpoints at chromosome bands 4q12, 5q31–33, 8p11, 9p24 and 13q12 corresponding to the location of genes *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *JAK2* and *FLT3*, respectively. The results of these chromosomal translocations produce constitutive enzymatic activity (tyrosine kinase activity) and deregulate haematopoiesis in the same way of *BCR-ABL1* in chronic myelogenous leukaemia (CML) (4,5).

Clinical and haematological findings in patients with a rearrangement of the *PDGFRB* gene are heterogeneous, and based on common findings, the patients usually have been previously diagnosed as atypical CML (aCML), chronic myelomonocytic leukaemia (CMML), myelodysplastic/myeloproliferative disorders (MDS/MPN) or juvenile myelomonocytic leukaemia (JMML).

Golub *et al.* in 1994 for the first time described the fusion of the genes *ETV6* and *PDGFRB* in patients with CMML displaying a t(5;12)(q33;p13). The fusion enables the homodimerisation domain of *ETV6* to dimerise the tyrosine kinase domain of platelet-derived growth factor receptor beta (*PDGFRB*), subsequently leading to its catalytic activation. Clinically, this fusion has been demonstrated in association with aCML, CMML, unclassified MPN and AML (6–10). Subsequently, more than 20 *PDGFRB* fusion partners have been reported with eosinophilia-associated myeloproliferative neoplasms. Although these rearrangements are infrequent, the patients with *PDGFRB* responded to imatinib mesylate and detection of abnormalities is critical for management and survival of patients (10,11).

In this study, our goals were (i) to identify the incidence of MPNs with *PDGFRB* gene rearrangement, (ii) to characterise the variant translocations that disrupt the platelet-derived growth factor receptor β (*PDGFRB*) gene in patients with eosinophilia-associated myeloproliferative neoplasms, and (iii) to analyse the clinical characteristics of these patients and the response to imatinib.

Patients and methods

Patients characteristics

We have conducted a prospective study in the bone marrow of 556 patients with MPNs, according to the new classification of World Health Organization (3), at the Molecular Cytogenetic Unit of the Centre of Cancer Research in Salamanca (Spain). The samples were analysed by routine cytogenetics and fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) by specified probes for the genes *PDGFRB*, *PDGFRA/FIP1L1* and *FGFR1*. Totally, we have identified 10 patients with rearrangement of *PDGFRB* gene, having the initial diagnosis of CMML, aCML or chronic myeloproliferative disorder (CMPD) (Table 1). The study was approved by the local ethics committee, and written consent was obtained from

each of the patients before their clinical data were recorded and then updated.

Cytogenetic and fluorescence *in situ* hybridisation analysis

Bone marrow samples were cultured for 24 and 48 h with and without stimulating factor, G-CSF, following standard procedures, as previously described (12). When possible, 20 or more metaphases were analysed to detect clonal abnormalities. The karyotypes were then described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009) (13).

FISH analysis was carried out as previously described (14). In brief, chromosome spreads were treated with RNAse (100 mg/mL) and pepsin (0.1 mg/mL) and fixed in formaldehyde 1%. We used cosmids 9–4 and 4–1 for using *PDGFRB* gene in 5q31–33 region as well as probes for the *PDGFRA/FIP1L1* fusion (these probes were kindly provided by Professor. Peter Marynen, Centre for Human Genetics, Leuven, Belgium). In addition, a specific probe for the detection of *FGFR1* rearrangements (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, the Netherlands) was also used. The hybridisation mixture contained Cot-1 DNA, alcohol 100% and acetate sodium 3 m, pH: 5.2, and 250–300 ng/IU labelled BAC was precipitated at -80°C (30 min). Hybridisation signals were analysed by at least two independent observers on an Olympus BX60 coupled to a Cytovision Ultra system (Applied Imaging, Sunderland, UK) using a cooled, charge-coupled camera.

For evaluation of interphase cells, we used two-colour split-apart FISH assay to determine the *PDGFRB* rearrangement with 2 cosmids: 9–4 and 4–1. For the split-apart FISH test, the two cosmids were differentially labelled and cohybridised to test interphase cells. Evaluation of the results was according to the separation of the red and green signals. In a normal individual, cells would be expected to carry two fused pairs of signals, whereas in *PDGFRB* rearranged cells, one fused pair and one separated pair would be seen (8). *PDGFRA* rearrangements were assessed by dual-colour FISH assay on interphase and metaphase cells from bone marrow using BAC clone 120K16 (mapping centromeric to *FIP1L1*) and BAC clone 3H20 (mapping between *FIP1L1* and *PDGFRA*) and BAC clone 24O10 (mapping telomeric to *PDGFRA*). In total, 300 cells were analysed. The cut-off point was established in 4% of cells displaying false-positive rate such as separated pair or fusion.

Results

The incidence of MPN with *PDGFRB* rearrangement was low (1.8% of all MPN). We have identified 10 patients who presented with MPNs showing this rearrangement involving chromosome bands 5q31–5q33 (Fig. 1; Table 1). Eight

Table 1 Clinical and biological characteristics and outcome of patients with MPN showing *PDGFRB* rearrangement

Code	Age	Sex	Diagnosis	Karyotype ¹	FISH	Hb (g/dL)	WBC ($\times 10^9/L$)	Eosinophils ($\times 10^9/L$)	Treatment	Response	Follow-up (months)
1	44	M	aCML	t(5;10)	67%	10	43	1.1	Imatinib ²	CCR	116
2	44	M	MPN	t(5;17;22)	70%	10	31	2.2	Imatinib	CCR	114
3	70	M	CMML	No Mitosis	37%	7.5	38	3	Imatinib	NA	2 (died after septic shock)
4	86	F	MDS	der(17)t(5;17)	64%	9.1	11	1.8	Support therapy	NA	2 (died after diagnosis)
5	75	M	PMF	46,XY	38%	8	5	1.9	Imatinib	CCR	5
6	61	M	CMML	t(5;12)	53%	9.8	19	2	Imatinib	CCR	16
7	77	M	MPN	del(5q)	56%	13	15	4.2	Imatinib	CCR	12
8	53	F	PMF	del(5q)	45%	10	4	1.3	HTP	CCR	19
9	61	M	Atypical CML	t(5;12)	85%	12.8	38.3	1.2	Imatinib	CCR	22
10	40	M	MPN	t(5;12)	65%	12.2	13.3	5.7	Imatinib	CCR	17

aCML, atypical chronic myelogenous leukaemia; MPN, myeloproliferative neoplasm; CMML, chronic myelomonocytic leukaemia; MDS, myelodysplastic syndrome; PMF, primary myelofibrosis; HTP, haematopoietic transplantation, CHR, complete haematological response, CCR, complete cytogenetic response, FISH, fluorescence *in situ* hybridisation; NA, not available.

¹Conventional cytogenetics in abnormal cytogenetic cases were as follows:

Case 1: 46,XY,t(5;10)(q31;q21) [17]

Case 2: 46,XY,t(5;17;22)(q32;q21;q21) [15]/46,XY [5]

Case 4: 59,XX,+X,+1,+7,+9,+10,+11,-13,+14,+15,del(17)(p12) [7]/54,XX, der(17)t(5;17)(q33;q21),+18,+19,+20,+21,+22,+3mar [8]

Case 6: 46,XY,t(5;12)(q33;p13) [11]/46,XY [9]

Case 7: 46,XY,add(7)(q21),add(20)(q11) [15] 46,idem,del(5)(q23q32) (5)

Case 8: 48,XX,del(5)(q13q31),i(7)(q10),+8,add(11)(p15) [11]/46,XX (6)

Case 9: 46,XY,t(5;12)(q33;p13) [17]/46,XY [8]

Case 10: 46,XY,t(5;12)(q33;p13) [15]/46,XY [5]

²In all patients, imatinib was used at 400 mg/d.

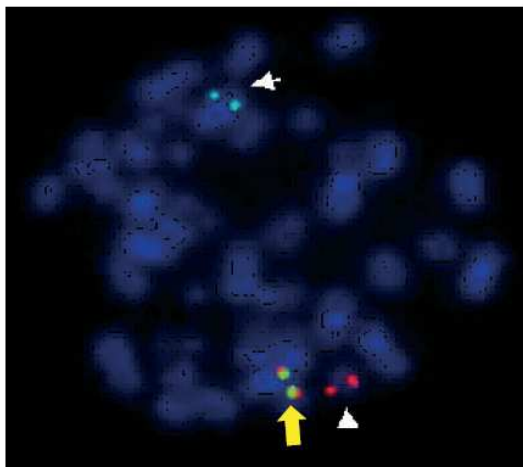


Figure 1 Multicolour fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) in case no. 10 showing a t(5;12)(q33;p13) with *PDGFRB/ETV6* fusion in metaphase. Yellow arrow indicates the presence of *PDGFRB/ETV6* fusion.

patients were male and two were female, with median age of 61 years (range, 44–86 years). One case had a normal karyotype (case 5); three patients (cases 6, 9 and 10) presented a t(5;12)(q33;p13); two cases showed translocations

involving 5q33 with chromosome 17 (cases 2 and 4, Fig. 2), while the case 1 presented a t(5;10). This case has been previously published (15). The cases 7 and 8 had losses on 5q associated with other cytogenetic abnormalities while the remaining patient (case 3) failed to show any mitosis (Table 1). None of the 10 patients showed *BCR-ABL1* fusion, *JAK2* mutations, *PDGFRA/FA/FIP1L1* fusion or *FGFR1* rearrangement.

All patients except three cases (cases 7, 9 and 10) presented with anaemia (median Hb was 10.0 g/dL with a range from 7.5 to 13 g/dL), and most of them (except the cases 5 and 8) had leucocytosis [White blood cells (WBC) of $21.7 \times 10^9/L$ with a range from 4 to $43 \times 10^9/L$]. All patients presented with eosinophilia ($2.4 \times 10^9/L$ of eosinophils with a range of 1.1 – $5.7 \times 10^9/L$), although in three cases (cases 1, 8 and 9) the number of eosinophils was below $1.5 \times 10^9/L$. Regarding outcome, eight of the 10 patients received imatinib and seven achieved a complete cytogenetic and haematological response, maintained with a median follow-up of 19 months. The remaining patient (case no. 3) received imatinib at an advanced stage of the disease with very poor performance status and was not evaluable for response. It should be noted that two patients (cases 1 and 2) had a long follow-up (more than 9 years) after the start of imatinib therapy, and both remain in complete cytogenetic response with an imatinib dose of 400 mg/d (Table 1).

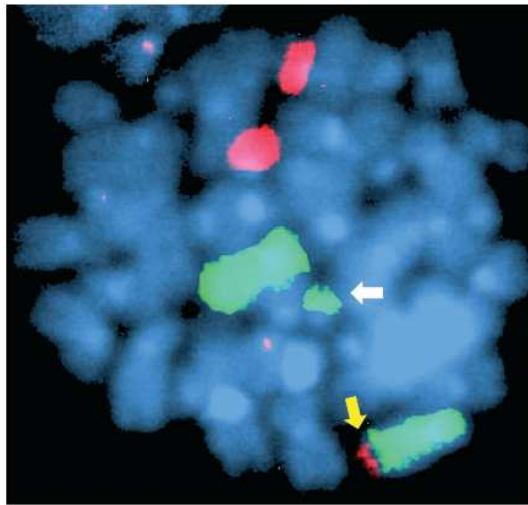


Figure 2 Painting fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) case no. 2, displaying a 46,XY,t(5;17;22)(q32;q21;q21), with libraries for chromosome 5 (green colour) and 17 (red colour) showing the presence of material from chromosome 17 in a der(5) (yellow arrow) as well as the presence of genetic material from chromosome 5 in a chromosome 22 (white arrow), confirming the cytogenetic results.

Discussion

This study reports on a series of patients, studied at the same institution, with MPN and *PDGFRB* rearrangement. This is a rare entity, with the clinical characteristics being similar in the whole series. All but one patient treated with imatinib obtained a haematological and cytogenetic response. Interestingly, two patients had a very long follow-up with sustained response, indicating that imatinib is an effective and safe therapy in these patients and suggesting that the

presence of resistance to imatinib is uncommon in patients displaying rearrangements of *PDGFRB* gene. (16–18).

All patients here described displayed a rearrangement in *PDGFRB* gene, fused with different other genes, characterised by the deregulation and constitutive *PDGFRB* activation (19). The presence of *PDGFRB* rearrangements has male predominance, leukocytosis and eosinophilia, and our results are in accordance with these observations. In addition, this report shows the presence of anaemia as a recurrent biological feature in these patients (20).

All of tyrosine kinase fusion genes except for the cytogenetically invisible *FIPILI-PDGFRB* fusion have been cloned following chromosome aberration finding with chromosome involvement bands such as 5q31–33 (*PDGFRB*), 8p11 (*FGFR1*), 9p24 (*JAK2*) or 13q12 (*FLT3*). Therefore, cytogenetic and FISH analysis is an important tool in the diagnostic work-up of patients with *BCR-ABL1*-negative MPNs, as they can demonstrate the presence of gene rearrangements that could respond to tyrosine kinase inhibitors (5).

The breakpoints in the long arm of the chromosome 5 are variable and usually have been assigned at 5q31–33. The involvement of *PDGFRB* gene can be neither confirmed nor excluded by cytogenetic analysis alone (21). Therefore, we have used two-colour FISH method to detect rearrangement of this gene. Separation of the two probe signals on metaphase or interphase cells is a strong evidence for the disruption of *PDGFRB* and can be used not only at diagnosis but also in the monitoring of the residual disease.

More than 20 distinct *PDGFRB* partner fusions have been identified, with *ETV6* gene being the most common partner (Fig. 3). Three of the 10 cases included in the present series also showed this rearrangement (6). In addition, we also observed two cases with involvement of 17q21 (*COL1A1*) and a remaining case in which *PDGFRB* was fused to *H4* in a t(5;10) (15). All these rearrangements usually respond to

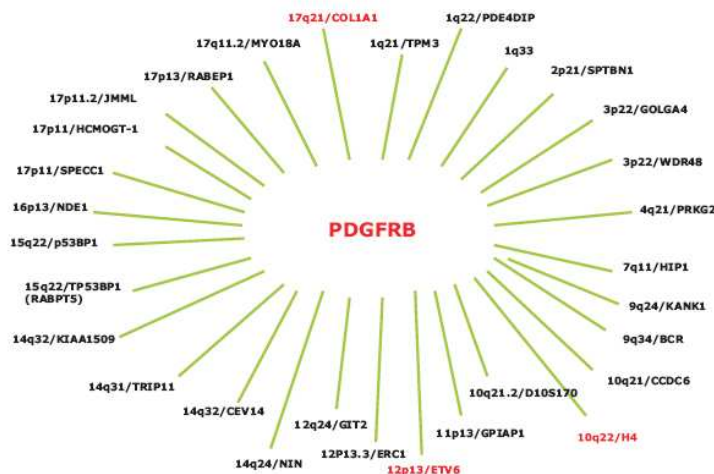


Figure 3 The network of the partner chromosomal regions and genes rearranged with *PDGFRB*.

tyrosine kinase inhibitors as in our patients. In the other cases, we failed to demonstrate the presence of fusions because of the absence of analysable mitosis or the material to be analysed by other molecular approaches. However, in all cases the presence of rearrangement of either *PDGFRA* or *FGFR1* was excluded by FISH. Recently, a new fusion *KANK1/PDGFRBeta* has been described in cases showing myelodysplastic features and thrombocytopenia. These cases also achieved a good response to imatinib (18).

In summary, patients with myeloid neoplasms, anaemia and eosinophilia should be screened for the presence of *PDGFRB* rearrangements. The dual-colour FISH studies is a simple approach that allows the diagnosis in these patients and should be added into the diagnostic work-up. Therefore, this assessment should be included in the clinical setting because these patients respond to imatinib therapy, and sustained responses have been observed.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants from Spanish 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' FIS 09/01543, 'Proyectos de investigación del SACYL' 106/A/06 and 355/A/09, 'Fondo Social Caja de Burgos de Investigación Clínica', and by the joint research activities under the framework of the European Program for Cooperation in Science and Technology (COST, Action BM0801, EuGESMA). We thank Isabel M Isidro, Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, M^a Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo and Vanesa Gutiérrez of the 'Centro de Investigación del Cáncer', Salamanca, Spain, for their technical assistance.

References

1. Tefferi A. Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:215–37.
2. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol* 2010;**91**:174–9.
3. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009;**115**:3842–7.
4. Cross NC, Reiter A. Tyrosine Kinase fusion genes in chronic myeloproliferative disease. *Leukemia* 2002;**16**:1207–12.
5. Walz C, Metzgeroth G, Haferlach C, *et al.* Characterization of three new imatinib-responsive fusion genes in chronic myeloproliferative disorders generated by disruption of the platelet-derived growth factor receptor beta gene. *Haematologica* 2007;**92**:163–9.
6. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994;**77**:307–16.
7. Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, *et al.* Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative disease with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 2002;**347**:481–7.
8. Baxter EJ, Kulkarni S, Vizmanos JL, *et al.* Novel translocations that disrupt the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRB) gene in BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2003;**120**:251–6.
9. Jones AV, Cross NC. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 2004;**61**:2912–23.
10. Reiter A, Walz C, Cross NC. Tyrosine kinases as therapeutic targets in BCR-ABL negative chronic myeloproliferative disorders. *Curr Drug Targets* 2007;**8**:205–16.
11. Erben P, Gosenca D, Muller MC, *et al.* Screening for diverse PDGFRA or PDGFRB fusion genes is facilitated by generic quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Haematologica* 2010;**95**:738–44.
12. Hernández JM, del Cañizo MC, Cuneo A, García JL, Gutiérrez NC, González M, Castoldi G, San Miguel JF. Clinical, hematological and cytogenetic characteristics of atypical chronic myeloid leukemia. *Ann Oncol* 2000;**11**:441–4.
13. ISCN. In: Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, Marilyn L, Lynda J, Campbell LJ, eds. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: Karger Paper back; 2009: pp 1–138. ISBN 3805589859
14. Hernández JM, González MB, Granada I, Gutiérrez N, Chillon C, Ramos F, Ribera JM, González M, Feliu E, San Miguel J. Detection of inv(16) and t(16;16) by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia M4Eo. *Haematologica* 2000;**85**:481–5.
15. García JL, Font de Mora J, Hernandez JM, Queizan JA, Gutierrez NC, Hernandez JM, San Miguel JF. Imatinib mesylate elicits positive clinical response in atypical chronic myeloid leukemia involving the platelet-derived growth factor receptor beta. *Blood* 2003;**102**:2699–700.
16. Pardanani A, Tefferi A. Imatinib therapy for hypereosinophilic syndrome and eosinophilia-associated myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 2004;**28**:47–52.
17. Cross NC, Reiter A. Fibroblast growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor abnormalities in eosinophilic myeloproliferative disorders. *Acta Haematol* 2008;**119**:199–206.
18. David M, Cross NC, Burgstaller S, *et al.* Durable responses to Imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL –negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007;**109**:61–4.
19. Steer EJ, Cross NCP. Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31–35: role of the platelet-derived growth factor receptor Beta. *Acta Haematol* 2002;**107**:113–22.
20. Lierman E, Cools J. TV6 and PDGFRB: a license to fuse. *Haematologica* 2007;**92**:145–7.
21. Yagasaki F, Jinnai I, Yoshida S, *et al.* Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukaemia with t(5;12)(q31;p13). *Genes Chromosomes Cancer* 1999;**26**:192–202.

Capítulo 2

Arefi et al.

Response to imatinib mesylate in patients with hypereosinophilic syndrome.

Int J Hematol. 2012; 96: 320-6.

Response to imatinib mesylate in patients with hypereosinophilic syndrome

Maryam Arefi · Juan L. García · M. Montserrat Briz · Felipe de Arriba · Juan N. Rodríguez · Guillermo Martín-Núñez · Joaquín Martínez · Javier López · Julio G. Suárez · M. José Moreno · M. Ángeles Merino · Norma C. Gutiérrez · Jesús María Hernández-Rivas

Received: 15 December 2011 / Revised: 22 June 2012 / Accepted: 27 June 2012
© The Japanese Society of Hematology 2012

Abstract Idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES) is a rare disorder characterized by unexplained, persistent hypereosinophilia associated with multiple organ dysfunctions. The cause of HES is unknown and shows clinical heterogeneity. FIP1L1–PDGFRA fusion is a clonal marker for the diagnosis and treatment of HES. We prospectively studied 78 patients with chronic eosinophilia. In all cases, the most salient clinical and biological characteristics as well as the response to the therapy were ana-

lyzed. In addition, we performed conventional cytogenetics and fluorescent in situ hybridization (FISH) with three BACs covering the FIP1-like-1 (FIP1L1)/platelet-derived growth factor receptor- α gene (PDGFRA) fusion. Nineteen of 78 patients (24 %) presented criteria of HES. The majority of patients were male (18) with median age of 49 years (range 19–84 years). FIP1L1–PDGFRA fusion was found in eight patients. Patients with FIP1L1–PDGFRA fusion presented with more bone marrow eosinophils

M. Arefi
Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, Spain
e-mail: maryamarefi2002@yahoo.co.uk

J. L. García
Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL), HUSAL, Salamanca, Spain
e-mail: jlgarcia@usal.es

J. L. García · N. C. Gutiérrez
IBSAL IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, Spain
e-mail: normagu@usal.es

M. M. Briz
Hospital Sierrallana, Torrelavega, Spain
e-mail: montsebrizb@eresmas.com

F. de Arriba
Hospital Morales Meseguer, Murcia, Spain
e-mail: farriba@um.es

J. N. Rodríguez
Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva, Spain
e-mail: jnicolasr@gmail.com

G. Martín-Núñez
Hospital Virgen Del Puerto, Plasencia, Spain
e-mail: guillermo.martin@ses.juntaextremadura.net

J. Martínez
Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain
e-mail: jmartinezlo@yahoo.es

J. López
Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain
e-mail: jlopezj.hrc@salud.madrid.org

J. G. Suárez
Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá, Spain
e-mail: igarcia.hupa@salud.madrid.org

M. J. Moreno
Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain
e-mail: hematologia.hvv.sspa@juntadeandalucia.es

M. Á. Merino
Hospital Costa del Sol, Marbella (Málaga), Spain
e-mail: amerino@hcs.es

N. C. Gutiérrez · J. M. Hernández-Rivas (✉)
Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58, 37007 Salamanca, Spain
e-mail: jmhr@usal.es

J. M. Hernández-Rivas
IBSAL IBMCC, Centro de Investigación del Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, CSIC, Salamanca, Spain

and peripheral blood eosinophilia as well as anemia, leukocytosis and thrombocytopenia. Using of low-dose imatinib mesylate (100 mg/day) a hematological and molecular remission in all patients displaying the *FIP1L1*–*PDGFRA* fusion gene was observed. Therefore, imatinib may be effective for use in the treatment of chronic eosinophilic leukemia, and patients should be treated before tissue damage.

Keywords Hypereosinophilic syndrome · Chronic eosinophilic leukemia · *FIP1L1*–*PDGFRA* fusion · Imatinib · Cytogenetic · Fluorescent in situ hybridization (FISH)

Introduction

Acquired eosinophilia can be classified in two ranges of hematologic disorders such as primary, clonal, and secondary or reactive type. According to the WHO classification, primary eosinophilic disorders encompass hypereosinophilic syndrome (HES), Chronic eosinophilic leukemia (CEL), myeloid neoplasms associated eosinophilia and *PDGFR* rearrangements, not otherwise specified (CEL-NOS) and other myeloid malignancy with prominent blood eosinophilia [1–4]. HES is predominantly observed in males and is usually diagnosed between 25 and 55 years with reported cases from 7 to 77 years [3]. In HES the clinical features are different from other atypical chronic myeloid leukemia and can be variable from leukemia-related disease symptoms such as fatigue, weight loss, pruritus and bruising until organ damage including respiratory, cardiac or gastrointestinal symptoms [3, 5].

In a low number of cases a constitutively activated fusion tyrosine kinase on chromosome 4q12, derived from an interstitial deletion that fuses the platelet-derived growth factor receptor- α gene (*PDGFRA*) to a newly described human gene *FIP1*-like-1 (*FIP1L1*), have been demonstrated. These patients are more appropriately classified as F/P^+ CEL [6, 7]. For this reason patients with criteria of HES must be studied at molecular level because these cases respond to imatinib mesylate.

Imatinib mesylate, a tyrosine-kinase inhibitor, is effective in the treatment of chronic myeloid leukemia and other disorders with activation of tyrosine-kinase family genes [8]. The *FIP1L1*–*PDGFRA* positive cases respond to imatinib mesylate with rapid, sustained and complete hematological remissions that have been observed at lower doses than used for treating chronic myelogenous leukemia [9–12].

The goals of this present study were the evaluation of response to imatinib in patients with HES/CEL and the molecular basis of the response.

Methods

Patients

A total of 78 patients with peripheral blood eosinophil were screened from 2002 to 2008 at the Molecular Cytogenetic Unit of the Centre of Cancer Research in Salamanca (Spain). The study was approved by the local ethics committee of the University Hospital of Salamanca (Spain) and written consent was obtained from each of the patients before have their clinical data was recorded and then updated. Nineteen cases fulfilled the criteria of HES. Most of them (18) were male. The median age was 49 years (range 19–84 years). The diagnosis and classifications of patients were established according to the World Health Organization classification Criteria [2]. In all patients both the most relevant clinical and biological data were recorded.

Cytogenetic analysis

Bone marrow cells were cultured for 24 and 48 h following standard procedures. Metaphases were G-banded with Wright stain. When possible, 20 or more metaphases were analyzed to detect clonal abnormalities. The karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009) [13].

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH for the *CHIC2* gene deletion was used as a diagnostic test for *FIP1L1*–*PDGFRA* fusion as previously described [14]. Detection of the 4q12 fusion, resulting in the fusion of the 5'part of *FIP1L1* to the 3'part of *PDGFRA* was performed by dual-color FISH assay on interphase and metaphase cells from bone marrow using BAC clone 120K16 (mapping centromeric to *FIP1L1*) and BAC clone 3H20 (mapping between *FIP1L1* and *PDGFRA*) and BAC clone 24O10 (mapping telomeric to *PDGFRA*).

Hybridizations were carried out as previously described [14]. In brief, BAC clones were isolated from human genomic library RP11-24O10, RP11-120K16, RP11-3H20 (these probes were kindly provided by Dr Peter Marynen, Centre for Human Genetics, Leuven, Belgium). According to this method after the extraction, the DNA was labeled by Nick Translation Kit (Abbott Molecular). The hybridization mixture containing (Cot-1 DNA, alcohol 100 %, and acetate sodium 3 M pH 5.2); 250–300 ng/IU labeled BAC was precipitated at -80°C (30 min). After the denaturalizing at 75°C (7.5 min) the probes allowed to reannealing with unlabeled human Cot-1DNA. The slides were incubated overnight at 37°C . After the cover slips had been removed, the slides were washed in the post-hybridization solutions. Hybridization signals were analyzed by at least

FIP1L1/PDGFR α fusion in HES**Table 1** Clinical and hematological characteristics of patients with HES/CEL

Characteristics	FIP1L1-PDGFR α (+) (n = 8)	FIP1L1-PDGFR α (-) (n = 11)
Male/female	7/1	11/0
Age (years)	58 (22–84)	46 (19–81)
Splenomegaly and/or hepatomegaly (yes/no)	6/2	4/7
Skin lesions (yes/no)	2/6	8/3
Cardiac disease (yes/no)	5/3	3/8
Pulmonary disease (yes/no)	5/3	3/8
Gastrointestinal tract (yes/no)	3/5	3/8
Karyotype (abnormal/normal)	2/6	0/9 + 2 (no mitosis)
Response to imatinib 100 mg/day (yes/no)	8/0	NA
Response to combination therapy (yes/no)	NA	7/3+ (1 case treated only with prednisone)
WBC ($\times 10^9/L$)	21.1 (10–45.5)	15.9 (6.8–35.9)
HGB (g/L)	10.4 (7.9–12.1)	13.1 (9–16.8)
PLT ($\times 10^9/L$)	103.1 (72–135)	230 (97–373)
Peripheral blood eosinophils (%)	51.65 (25–76)	41.7 (11–72)
Bone marrow eosinophils (%)	49.1 (32.9–73)	36 (22–72)
Elevation of IgE (Yes/No)	0/8	9/2
Elevation of vit B12 (yes/no)	4/5	5/5
Hypergammaglobulinemia (yes/no)	0/8	8/3
Elevation of LDH (yes/no)	4/4	6/5

Combination therapy: Imatinib 400 mg/day + prednisone
NA not available

two independent observers on an Olympus BX60 coupled to a Cytovision Ultra system (Applied Imaging, Sunderland, UK) using a cooled, charge-coupled camera.

The appearance of either a yellow color signal as the result of the overlapped green/red signals (3H20-green signal and 120K16-red signal and 24O10-red signal) or a combined green/red signals indicate normal chromosome 4, while, the red signal alone (absence of probe 3H20: green) indicates a presence of crypt deletion on the chromosome 4. Based on the study of 15 controls the cut-off point to assess the presence of *FIP1L1-PDGFR α* fusion was established in 5 %.

Results

Patient's characteristics

Table 1 shows the salient clinical and hematological data of the nineteen patients fulfilling the HES diagnostic criteria. The patients displaying *FIP1L1-PDGFR α* fusion had more leukocytosis, eosinophils count and bone marrow eosinophil infiltration, as well as more anemia and thrombocytopenia than patients without *FIP1L1-PDGFR α* fusion. In addition, the patients with *FIP1L1-PDGFR α* fusion had a tendency to have more hepatosplenomegaly, cardiac disease, and pulmonary disease than the patients

lacking the *FIP1L1-PDGFR α* , while this last group of patients showed more skin lesions in comparison with the rearranged patients showing *FIP1L1-PDGFR α* group. IgE and gammaglobulin levels were increased in patients lacking *FIP1L1-PDGFR α* fusion (Table 1).

Cytogenetics and FISH

A normal karyotype was identified by conventional cytogenetic analysis in 15 out of the nineteen patients. In two patients an abnormal karyotype was observed: Case no. 2 had 47,XY,+del(3)(q13),del(7)(q32)[7]/46,XY[10] while case no. 8 showed 47,XY,+8[4]/46,XY[15]. In the remaining two cases karyotype failed to show any mitosis (Table 2).

Double color FISH studies with specific probes to analyze the *FIP1L1-PDGFR α* fusion were carried out in all patients. The result showed that *FIP1L1-PDGFR α* fusion was observed in 8 of the 19 patients. These patients with *FIP1L1-PDGFR α* fusion were considered as having a CEL (cases 1–8) (Table 2).

All patients showing *FIP1L1-PDGFR α* fusion associated normal karyotype received low dose of imatinib (100 mg/d) and achieved a complete hematological remission. Moreover, two patients from this group with abnormal karyotype showed both complete hematological remission and complete cytogenetic response after receiving low dose of imatinib.

Table 2 Characteristics of patients with primary eosinophilia

Case	FIP/LLJ- PDGFRA fusion ^a	Cytogenetics	Splenomegaly and/or hepatomegaly	End-organ damage	BM eosinophils (%)	PDGFRA/ FIP/LLJ (%)	Treatment	Time to reach response (weeks)	Follow- up (months)	Response to treatment
1	Present	46,XY	±	Gastrointestinal tract	57	8	Imatinib 100 mg/day	2	22	CHR
2	Present	47,XY,+del(3)(q13),del(7)(q32)[7]/ 46,XY[10]	±	Gastrointestinal tract/Lung/Heart	65	45	Imatinib 100 mg/day	6	23	CHR, CCR
3	Present	46,XY	+/+	Gastrointestinal tract/lung/ lymphadenopathy	73	74.5	Imatinib 100 mg/day	3	19	CHR
4	Present	46,XY	-/-	Lung	35	43	Imatinib 100 mg/day	2	22	CHR
5	Present	46,XY	+/+	Skin/Heart	42	35	Imatinib 100 mg/day	3	22	CHR
6	Present	46,XY	+/+	Skin/Lung/Heart, bone marrow	50	45	Imatinib 100 mg/day	3	19	CHR
7	Present	46,XY	-/-	Heart	32.9	22	Imatinib 100 mg/day	4	19	CHR
8	Present	47,XY,+8[4]/46,XY[15]	±	Heart/Lung	38	27	Imatinib 100 mg/day	2	22	CHR, CCR
9	Absent	46,XY	±	Skin/Heart	72	2	Prednisone + imatinib 400 mg/day	3	18	CHR
10	Absent	46,XY	-/-	Gastrointestinal tract	38	0	Prednisone + imatinib 400 mg/day	4	20	CHR
11	Absent	46,XY	-/-	Heart/ Gastrointestinal tract/skin	32	1	Prednisone + imatinib 400 mg/day	Cardiac Infarction		No response
12	Absent	46,XY	-/-	Skin	22	0	Prednisone + imatinib 400 mg/day	2	9	CHR
13	Absent	46,XY	±	Liver	27	1	Prednisone + imatinib 400 mg/day	3	21	CHR
14	Absent	46,XY	-/-	Skin	37	1	Prednisone	Eos > 1600/ mm ³ after 9 months	9	No response
15	Absent	No mitosis	+/+	Heart/lung/skin	45	0.5	Imatinib 400 mg/ day + prednisone	2	20	CHR
16	Absent	46,XY	-/-	Skin	21	1.5	Imatinib 400 mg/ day + prednisone	3	20	CHR
17	Absent	No mitosis	-/-	Lung/Skin/ Gastrointestinal tract	35	1	Imatinib 400 mg (2 weeks) + prednisone	No response	8	No response
18	Absent	46,XY	+/+	Liver/Spleen/Bone marrow	27		Prednisone + imatinib 400 mg/day	2	48	CHR

Table 2 continued

Case	FIP1L1– PDGFR α fusion ^a	Cytogenetics	Splenomegaly and/or hepatomegaly	End-organ damage	BM eosinophils (%)	PDGFR α / FIP1L1 (%)	Treatment	Time to reach response (weeks)	Follow- up (months)	Response to treatment
19	Absent	46,XY	–/–	Lung/Skin	41		Imatinib 400 mg/ day + prednisone	No response	9	No response

NA Not available, CCR complete cytogenetic response, CHR complete hematologic response, CI cardiac infarction

^a In total, 200 nuclear cells were analyzed by FISH for each patient; PDGFR α /FIP1L1: % of interphase nuclei showing the fusion gene. The cut-off point was established in 2 % of cells displaying false positive rate such as FIP1L1–PDGFR α fusion

We did not find mutation point of PDGFR α in F/P(–) HES. In addition, ten of eleven FIP1L1–PDGFR α negative patients were treated with a combination of therapy based on 400 mg/day of imatinib and prednisone. Initial therapeutic of prednisone performed with 1 mg/kg/daily doses. After then, the progressive decrease doses of prednisone realized after a few weeks until a maintenance regimen to lower dose.

Three out of ten patients (cases 11, 17 and 19) failed to obtain a hematological response, despite receiving higher doses of imatinib (300–400 mg/day). By contrast, seven cases achieved a hematological response after the treatment (Table 2). The response to the treatment in cases with FIP1L1–PDGFR α fusion was rapid and sustained with a median follow-up 2 years. We did not observe any relapse.

Discussion

The assessment of FIP1L1–PDGFR α fusion has produced an important advance in the knowledge of molecular pathogenesis, diagnosis and classification of HES/chronic myeloid neoplasm associated with eosinophilia. In addition, the presence of PDGFR α gene rearrangements have modified the prognosis of the disease by using of effective molecular target therapy such as tyrosine kinase inhibitors (imatinib, dasatinib, and nilotinib) [15].

CEL can be differing from HES by the presence of more than 2 % of blast cells in peripheral blood, more than 5 % bone marrow blast cells or by the presence of cytogenetic abnormalities. Diagnosis of HES, also, requires the absence of clonal T lymphocytes. Efficacy of imatinib in patients with HES/CEL has led to the identification of FIP1L1–PDGFR α fusion as a pathogenetically relevant tyrosine kinase. These findings could improve biologic and clinical characterization of this eosinophilic disease [16].

We have used cytogenetic and interphase FISH method to detect the del(4)(q12) resulting in a FIP1L1–PDGFR α fusion as a clonality marker on 19 cases that had diagnostic criteria of HES. In our series, we have demonstrated the presence of FIP1L1–PDGFR α in 8 out of the nineteen cases analyzed (42 %) which is comparable to the previous data [17].

By conventional cytogenetics only two cases demonstrated the presence of a clonal abnormality. Therefore, the use of FISH in the screening of HES leads to the detection of an increasing number of patients displaying clonality.

Both HES and clonal eosinophilia can show an eosinophil-mediated tissue injury as pneumonitis, cardiomyopathy, dermatitis, gastrointestinal inflammation, peripheral neuropathy, thromboembolism or sinusitis. In addition, the presence of either cytopenia or hepatosplenomegaly is usually seen in patients with clonal eosinophilia [18].

Several reports have shown the early initiation of imatinib therapy in *FIP1L1-PDGFR*A fusion can be improved to reverse eosinophil-related organ damage [19, 20]. Therefore, the use of imatinib in the treatment of HES is related to the presence of organ involvement. Improvements in skin disease, hepatosplenomegaly and both peripheral blood eosinophil and bone marrow eosinophil findings have also been reported in *FIP1L1-PDGFR*A-positive CEL [21]. The present study is in agreement with these reports. Indeed, the use on imatinib improved the pulmonary function testing, as well as promoted the achievement of a complete hematologic response (CHR) and complete cytogenetic response (CCR) with imatinib, including CHR and CCR in patients with other karyotype abnormalities as previously described. However, patients with heart involvement especially congestive heart failure did not get a cardiac improvement [19, 23].

Imatinib mesylate is the first effective drug in the clonal eosinophilia associated with *FIP1L1-PDGFR*A fusion, and it could be used at low dose (100 mg/day) [22, 23]. The majority of patients with CEL and *FIP1L1-PDGFR*A fusion respond very well to imatinib mesylate (tyrosine kinase inhibitor) therapy. In addition, the present study showed a set of patients displaying an HES, but lacking in the presence of *FIP1L1-PDGFR*A fusion that could also achieve a response by using imatinib therapy. The seven patients who responded to imatinib did not show any *PDGFR* rearrangement. However, the presence of activation of other tyrosine kinase proteins could not be excluded. Indeed the response to imatinib therapy in this group of patients is supporting the possibility of the presence of other molecular abnormalities activating a tyrosine kinase product. It should be noted that all patients who achieved a response usually were treated with high dose of imatinib (400 mg/day) instead the usual dose of imatinib (100 mg/day) for the leukemias showing the *FIP1L1-PDGFR*A fusion [24, 25]. The presence of refractory cases is unusual and it could be due to molecular mechanisms involving either the juxtamembrane domain or the presence of mutations such as *FIP1L1-PDGFR*A D842V [26, 27]. Moreover, in drug-refractory cases allogeneic hematopoietic cell transplant can be considered as another therapeutic option [28, 29].

In conclusion, this study has confirmed that the identification of *FIP1L1-PDGFR*A fusion through FISH method is a valuable tool that must be added in a clinical setting in the screening for cases referring with predominant eosinophilia and should be used at time of diagnosis in the patients with HES/CEL. These patients should be treated with tyrosine kinase inhibitors as first line therapy.

Acknowledgments Partially supported by grants from Spanish "Fondo de Investigaciones Sanitarias" FIS 09/01543; "Fondo Social

Caja de Burgos de Investigación Clínica", "Proyectos de investigación del SACYL" 106/A/06 and 355/A/09 and by the joint research activities under the framework of the European Program for Cooperation in Science and Technology (COST, Action BM0801, EuGE-SMA). We thank Isabel M Isidro, Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, M^a Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo and Vanesa Gutiérrez of the Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, Spain, for their technical assistance.

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Tefferi A, Gotlib J, Pardanani A. Hypereosinophilic syndrome and clonal eosinophilia: point-of-care diagnostic algorithm and treatment update. *Mayo Clin Proc.* 2010;85:158–64.
2. Bain BJ, Gilliland DG, Horny HP, Vardiman JW. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of *PDGFR*A, *PDGFR*B or *FGFR*1. In: World Health classification of tumors: pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2007. pp 68–73.
3. Bain BJ, Fletcher SH. Chronic eosinophilic leukemias and the myeloproliferative variant of the hypereosinophilic syndrome. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007;27:377–88.
4. Pardanani A, Tefferi A. Primary eosinophilic disorders: a concise review. *Curr hematol Malig Rep.* 2008;3:37–43.
5. Hernández JM, Cañizo MC, Cuneo A, García JL, Gutiérrez NC, González M, et al. Clinical, hematological and cytogenetic characteristics of atypical chronic myeloid leukemia. *Ann Oncol.* 2000;11:441–4.
6. Gotlib J, Cools J, Malone JM 3rd, Schrier SL, Gilliland DG, Coutre SE. The *FIP1L1-PDGFR*alpha fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood.* 2004;103:2879–91.
7. Roufosse FE, Goldman M, Cogan E. Hypereosinophilic syndromes. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;1:2–37.
8. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukaemia—advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003;349:1451–64.
9. Cools J, Stover EH, Wlodarska I, Marynen P, Gilliland DG. The *FIP1L1-PDGFR*alpha kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2004;11:51–7.
10. Pardanani A, Ketterling RP, Li CY, Patnaik MM, Wolanskyj AP, Elliott MA, et al. *FIP1L1-PDGFR*A in eosinophilic disorders: prevalence in routine clinical practice, long-term experience with imatinib therapy, and a critical review of the literature. *Leuk Res.* 2006;30:965–70.
11. Helbig G, Stella-Holowiecka B, Majewski M, Calbecka M, Gajkowska J, Klimkiewicz R, et al. A single weekly dose of imatinib is sufficient to induce and maintain remission of chronic eosinophilic leukaemia in *FIP1L1-PDGFR*A-expressing patients. *Br J Haematol.* 2008;141:200–4.
12. Intermesoli T, Delaini F, Acerboni S, Salmoiraghi S, Spinelli O, Guerini V, et al. A short low-dose imatinib trial allows rapid identification of responsive patients in hypereosinophilic syndromes. *Br J Haematol.* 2009;147:681–5.
13. Brothman AR, Persons DL, Shaffer LG. Nomenclature evolution: changes in the ISCN from the 2005 to the 2009 edition. *Cytogenet Genome Res.* 2009;127:1–4.

14. Gonzalez MB, Hernandez JM, Garcia JL, Lumbreras E, Castellanos M, Fernandez-Calvo J, et al. The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica*. 2004;89:1213–8.
15. Gotlib J, Berubé C, Growney JD, Chen CC, George TI, Williams C, et al. Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816 V KIT mutation. *Blood*. 2005;106:2865–70.
16. Bain BJ. Relationship between idiopathic hypereosinophilic syndrome, eosinophilic leukemia and systemic mastocytosis. *Am J Hematol*. 2004;77:82–5.
17. Pardanani A, Brockman SR, Paternoster SF, Flynn HC, Ketterling RP, Lasho TL, et al. FIP1L1–PDGFR α fusion: prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. *Blood*. 2004;104:3038–45.
18. Gleich GJ, Leiferman KM. The hypereosinophilic syndromes: current concepts and treatments. *Br J Haematol*. 2009;145:271–85.
19. Klion AD, Robyn J, Akin C, Noel P, Brown M, Law M, et al. Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to Imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood*. 2004;103:473–8.
20. Ascione L, De Michele M, Accadia M, Spadaro P, Rumolo S, Tuccillo B. Reversal of cardiac abnormalities in a young man with idiopathic hypereosinophilic syndrome using a tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Echocardiogr*. 2004;5:386–90.
21. Muller AM, Martens UM, Hofmann SC, Bruckner-Tuderman L, Mertelsmann R, Lubbert M. Imatinib mesylate as a novel treatment option for hypereosinophilic syndrome: two case reports and a comprehensive review of the literature. *Ann Hematol*. 2006;85:1–16.
22. Pardanani A, Tefferi A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood*. 2004;104:1931–9.
23. Jovanovic JV, Score J, Waghorn K, Cilloni D, Gottardi E, Metzgeroth G, et al. Low-dose Imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1–PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood*. 2007;109:4635–40.
24. Wolf D, Gastl G, Rumpold H. Complete remission of an idiopathic hypereosinophilic syndrome while using Imatinib. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004;129:2104–6.
25. Butterfield JH. Success of short-term, higher-dose imatinib mesylate to induce clinical response in FIP1L1–PDGFR α -negative hypereosinophilic syndrome. *Leuk Res*. 2009;33:1127–9.
26. Stover EH, Chen J, Folens C, Lee BH, Mentens N, Marynen P, et al. Activation of FIP1L1–PDGFR α requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFR α and is FIP1L1-independent. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:8078–83.
27. Lierman E, Michaux L, Beullens E, Pierre P, Marynen P, Cools J, et al. FIP1L1–PDGFR α D842V, a novel panresistant mutant, emerging after treatment of FIP1L1–PDGFR α T674I eosinophilic leukemia with single agent sorafenib. *Leukemia*. 2009;23:845–51.
28. Halaburda K, Prejzner W, Szatkowski D, Limon J, Hellmann A. Allogeneic bone marrow transplantation for hypereosinophilic syndrome: long-term follow-up with eradication of FIP1L1–PDGFR α fusion transcript. *Bone Marrow Transplant*. 2006;38:319–20.
29. Ueno NT, Anagnostopoulos A, Rondón G, Champlin RE, Mikhailova N, Pankratova OS, et al. Successful non-myeloablative allogeneic transplantation for treatment of idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol*. 2002;119:131–4.

Capítulo 3

Arefi et al.

Genomic analysis of clonal eosinophils by CGH arrays reveals new genetic regions involved in chronic eosinophilia.

(Eur J Haematol, 2014)

Genomic analysis of clonal eosinophils by CGH arrays reveals new genetic regions involved in chronic eosinophilia

Maryam Arefi¹, Cristina Robledo², María J Peñarrubia¹, Alfonso García de Coca¹, Miguel Cordero³, Jesús M. Hernández-Rivas^{*2,4}, Juan Luis García^{*4,5}

1 Dept. Hematology, Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain

2 IBSAL, IBMCC, Centre of Cancer Research, Universidad de Salamanca-CSIC, Spain

3 Dept. Internal Medicine, Hospital Universitario Salamanca, Spain

4 Dept. Hematology, Hospital Universitario Salamanca, Spain

5 Instituto de Ciencias de la salud de Castilla y León (IESCYL), Salamanca, Spain

* Shared authorship

Correspondence

Jesús María Hernández, Servicio de Hematología y Departamento de Medicina, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58, 37007 Salamanca, Spain. Tel: +34923291100; Fax: +34923294624; e-mail: jmhr@usal.es

Key words: myeloproliferative neoplasms (MPN), eosinophilia, CGH array.

Abstract

To assess the presence of genetic imbalances in patients with myeloproliferative disorders (MPD) a total of 38 patients with chronic eosinophilia were studied by array CGH: seven had a chronic myelogenous leukaemia, *BCR-ABL1* positive (CML), nine patients had a Myeloproliferative disorder Ph- (myeloproliferative neoplasms), three had a myeloid neoplasm associated with *PDGFRB* rearrangement and the remaining two cases were Lymphoproliferative T neoplasias associated with eosinophilia. In addition seventeen had a secondary eosinophilia and were used as controls. In all cases an eosinophilic enrichment was carried out. Genomic imbalances were found in 76% of MPN patients. Losses on 20q were the most frequent genetic abnormality showed in MPN, affecting all the three types of MPN studied, mainly CML patients (43% of cases). The present study also showed losses at 11q13.3 in 24% of patients with MPN and in 19p13.11 in two out of the three patients with a MPN associated with *PDGFRB* rearrangement. In addition patients with CML had losses on 8q24. In summary, aCGH shows clonality in eosinophils in most of the MPN, and could be a technique used for defined clonality in these diseases. The lost of new genes located in these regions could provide new insights in the knowledge of these MPN associated with eosinophilia.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are heterogeneous group of clonal haematopoietic malignancies with abnormal proliferation of panmyelosis lineage (granulocytic, erythroid and megakaryocytic), result of a genetically altered haematopoietic stem cells with a downstream selective proliferative advantage in late myeloid differentiation, whose etiology is poorly understood [1]. In 2008 the World Health Organization (WHO) adopted a combination of morphology, immunophenotype, genetics, clinical findings and biologic features to refine the criteria of some entities for define disease of clinical significance. Therefore, the WHO divided MPNs associated with eosinophilia in three major groups, each one with its own characteristics: i. MPNs associated with eosinophilia and presence of the rearrangement of genes *PDGFRA*, *PDGFRB* and *FGFR1*. ii. Chronic Eosinophilic Leukaemia, Not Otherwise Specified (CEL- NOS) and iii. Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome (HES) [2,3,4].

Protein tyrosine kinases (PTKs) play a central role in the pathogenesis of MPNs by the activation of constitutive PTKs pathways and the deregulation in proliferation and survival of cells. Therefore, molecular abnormalities of PTKs in MPN, such as *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*, *ABL1*, *KIT*, *JAK2* and *MPL* genes have been used as the basis for diagnosis, classification, and targeted therapy [5,6,7].

Some cytogenetic abnormalities have been related to the MPN, such as trisomies of chromosomes 8 and 9, or loss of chromosomes 5 and 7. In addition the MPN could also been associated to the presence of a deletion of the long arm of chromosome 20. Del(20q) is not specific of MPN because this chromosomal abnormality could be also present in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML) [8,9].

The presence of rearrangements in *PDGFRA*, *PDGFRB* or *FGFR1* genes is a rare event in patients with chronic eosinophilia. Consequently, in most patients, the clonality of eosinophils lacking specific markers is difficult to demonstrate. Therefore new genetic markers are needed for these rare diseases. The limited resolution of conventional cytogenetics has hampered the identification of genetic submicroscopic abnormalities due to the presence of a microdeletion in these chromosomes. In contrast, molecular mapping techniques such as CGH arrays, allow defining the presence of gains or losses of genetic material providing new markers of clonality in these disorders.

In this study, we have applied Comparative Genome Hybridization (CGH) array as a molecular mapping methodology to assess the presence of gains and losses of genetic material in patients with MPN and eosinophilia in order to find new genetic markers associated to these diseases.

Material and Methods

Patients

Bone Marrow samples from 38 cases with chronic eosinophilia were analyzed. Twenty one patients had a diagnosis of haematologic neoplasms while seventeen had a secondary eosinophilia and were used as controls. According to the 2008 WHO classification, the diagnosis of patients with haematological malignancies was chronic myelogenous leukaemia, *BCR-ABL1* positive (CML) in seven cases, while nine patients had a myeloproliferative disorder Ph- (myeloproliferative neoplasms), three had a myeloid neoplasm associated with *PDGFRB* rearrangement and the remaining two cases were lymphoproliferative T neoplasias associated with eosinophilia. In all cases the presence of rearrangements in *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1* as well as the *BCR/ABL1* fusion gene was tested. Only CML and the MPD associated with *PDGFRB* rearrangement patients showed abnormalities in these genes.

The study protocol was approved by the local ethical committees and prior written informed consent was obtained from the patients. All the patients were studied before therapy. The main characteristics of the patients included in the study are reported in Table 1.

Table 1. The most salient clinical and biological characteristics of the MPN associated with eosinophilia

	MPN CML Ph(+)	MPN Ph(-)	MPN PDGFRB (+)	(LPN-T) associated eosinophilia*	Reactive eosinophilia (control)
	7	9	3	2	17
Sex (F/M)	2/5	5/4	1/2	1/1	6/11
Median age (F/M)	52/58.6	73.2/46	76/49.3	44/53	47/54
FISH Percentage (%)	87 (82-96)	-----	49.3(27-76)	-----	23.2(8-43)
HGB(g/L)	10.8(6.5-14)	14.9(12.7-19.8)	10.4(7.9-11.8)	13.4(12.8-14.1)	13.8(10.8-16.4)
WBC($\times 10^9/L$)	131.1(14.2-235)	9.41(7200-12500)	20.7(9.6-45)	10.8(8.7-12.9)	7.2(5.9-14.7)
PLT ($\times 10^9/L$)	465.2(254-722)	681.1(420-965)	103.4(72-135)	275(236-314)	219(142-319)

* LPN-T: (Lymphoproliferative neoplasm- T) associated eosinophilia; F: Female; M: Male; FISH: Fluorescence In situ Hybridization

Methods

Eosinophil DNA isolation

In all the BM samples, human eosinophils were isolated by depletion of non-eosinophils as well negative selection of eosinophilic population by using the “Eosinophil Isolation Kit” (Miltenyi-Biotec, Auburn, CA, USA) providing a purity >95%. The “Eosinophil Isolation Kit” is an indirect magnetic labelling system for the isolation of untouched eosinophils from human peripheral blood / BM. Non-eosinophils cells (i.e. T cells, B cells, NK cells, neutrophils, dendritic cells, monocytes and erythroid) were indirectly magnetically labelled with a cocktail of conjugated monoclonal antibodies against CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 and CD235a. The magnetically labelled non-eosinophils were depleted by retaining them on a MACS[®] column in the magnetic field of an AutoMACs separator system (Miltenyi-Biotec, Auburn), while the unlabeled eosinophils pass through the column. The enriched fraction of cells was frozen in RLT buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA) and then the nucleic acids of eosinophils were extracted using commercially available kits (All prep kit, Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer’s instructions. DNA quality and quantity were assessed using the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) and the ND-1000 Spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, USA), respectively.

Whole-Genome Amplification (WGA)

Whole genome amplification was used for aCGH studies. Whole genomic DNA of enriched fraction of eosinophils was amplified using GenomiPhi Kit (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) which used random primers to target the entire DNA template and Phi 29 DNA polymerase. Briefly, 1µl of template was mixed with 9µl of sample buffer. The mixture was denatured at 95°C for 3 minutes and immediately cooled at 4°C for a minimum of 10 minutes. A combination of 9µl of reaction buffer with 1µl of the enzyme was added to the cooled sample and then incubated at 30°C for 16 hours overnight. Inactivation of the enzyme was performed by heating the sample for 10 min at 65°C which was then cooled to 4°C. Post amplification cleanup was achieved by ethanol precipitation using the sodium acetate/EDTA (1.5M sodium acetate pH: 4.8 and 250mM EDTA) buffer.

Array CGH

A genomic-wide analysis of DNA copy number changes of patients was performed using BAC CGH-array. Slides containing 3,523 BACs spanning the genome (kindly provided by Dr. N. Carter, from the Sanger Centre, Cambridge, UK) were produced at the Centre of Cancer Research (Salamanca, Spain) as previously described [10]. Briefly, to test for labelling reactions, 2 µg of amplified genomic DNA, test (DNA of tumour) and reference material (placental DNA) were digested separately with *DpnII* restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA) and separately labelled using random primers (Bioprimer labelling kit, Invitrogen) and Cy5-dCTP and Cy3-dCTP (Amersham Biosciences) fluorescent dye for paired hybridization samples, respectively. The labelled nucleotide incorporation was quantified using the NanoDrop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Labelled test and reference DNA were mixed equitably, co-precipitated in presence of Cot-1 human DNA (Roche, Indianapolis, IN) with ethanol, washed, and diluted in hybridization solution (50% Formamide, 10% Dextran sulfate, 2X standard saline citrate, 10mM Tris pH 7.6, 2.7% sodium dodecyl sulfate and 10µg/µl of yeast tRNA). DNA mixtures were co-hybridized to the arrays in the GENETAC (Genomic Solutions) for 48 hours at 42°C according to the manufacturer's recommended protocol. Images and signal intensities were acquired using the GenePix 4000B (Axon Instruments, Burlingame, CA, USA) dual laser scanner in combination with the GenePix Pro4.0 (Axon Instruments) imaging software.

Array CGH analysis

Fluorescence ratios were normalized by using the median of the fluorescence ratios of every spot computed as \log_2 values. The \log_2 ratio of each clone was normalized to the median \log_2 ratio of the twenty control hybridizations, after which the median of triplicate spots was calculated, as previously described [10,11]. Data from two-colour hybridizations for both sets of DNA was normalized using the DN MAD module of the GEPAS software [12-14]. Regions of copy number gain and loss for the BAC CGH-array data were identified by creating sample specific thresholds [15]. A threshold level was described as mean plus or minus three or four times the SD [16,17]. Using three times the SD as a cut-off level, 99.7% of the fragments will fall within the normal range. This would result in ≈ 10 false-positive clones on an array with 3500 different loci. At least two contiguous BAC clones with a \log_2 ratio of less or more was defined as a gain region. Furthermore, spots with weak Cy3 or Cy5 intensity (below R^2

< 0.2) and clones with a standard deviation of more than 0.3 of triplicate spots were excluded from analysis. In total, approximately 10% of clones were excluded. All data sets were carefully reviewed for frequently affected chromosomal sites of physiologic copy number polymorphisms (CNP). Therefore every clone on the array was compared with the 'Database of Genomic Variants' (available at: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) and that of chromosomal imbalances and phenotype in humans using Ensemble Resources (DECIPHER: available at:

<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>).[15,18,19]

Validation studies by oligonucleotide microarrays

In order to confirm the results of the BAC aCGH analysis, a subset of 7 patients with chronic myelogenous leukaemia (CML) were also analyzed using a 12x135K Whole-Genome (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). This microarray platform provides measurements from 135,000 unique genomic loci. The hybridization, image analysis, extraction of fluorescence intensities and their \log_2 ratios, together with their subsequent normalization, were carried out as previously described [10,11]. Gender-matched human DNA was used as reference. Each of the two reference samples, one female and one male, consisted of a pool of DNA from normal lymphocytes from several healthy people (G147A-G152A; Promega, Madison, WI). Briefly, 500 ng of tumour and reference DNA were labelled with Cy3 and Cy5, respectively. They were combined (4 μg each) and dried by vacuum centrifugation. The DNA was resuspended in 3.3 μL of Sample Tracking Control and vortexed; 8.7 μL of NimbleGen hybridization solution was added to the tube, mixed well, and heated at 95°C for 5 min in the dark. Samples were hybridized for 16–20 h at 42°C, then washed with NimbleGen wash buffers and scanned at 10- μm resolution using the MS200 Scanner ((Roche NimbleGen, Madison, WI).

Data analysis

Data were extracted from scanned images using NimbleScan 2.5 extraction software (Roche NimbleGen, Madison, WI), which enables automated grid alignment, extraction, and generation of data files. Cy3 and Cy5 images were scanned independently through two separate channels and the quantified data were analyzed using the Cy5/Cy3 intensity ratio converted into \log_2 . For mapping genomic breakpoints the segMNT v1.1 CGH segmentation analysis algorithm were run as previously described [10,11].

Results

In 16 of 21 patients, genomic changes were observed (76%). All of the cases with a diagnosis of either a CML or a MPN with *PDGFB* rearrangement showed genomic imbalances. However, in the Ph-negative MPN and Lymphoproliferative T-cell disorder associated with eosinophilia the genomic changes were observed in six out of the nine and in one patient, respectively.

In total, abnormalities in 30 regions were present. Losses were most frequent than gains (24 vs 5). The genomic losses were located on 20q13.13, 11q13.3, 8q24.3, 17p11.3, 19p13.1 and 6q12, while the gains affected 11q13.4 and 6p21 (Table 2)

Table 2. Summary of the most frequent genomic imbalances in CMN by aCGH

Genomic imbalance	Incidence
Loss on 20q13.13	26%
Loss on 11q13.3	24%
Gain on 11q13.4	19%
Loss on 8q24.3	14%
Loss on 17p11.2	10%
Loss on 19p13.1	10%
Loss on 19p13.3	10%
Loss on 6q12	5%
Loss on 9q34.2	5%
Loss on 11p13.1	5%
Loss on 11q14.1	5%
Gain on 6p21	5%

In the Figure 1 a summary of the most relevant genomic imbalances in the different subgroups of MPN is shown. In the validation series, by using an oligonucleotide microarray, the main changes were confirmed. Thus losses on 20q13 were observed in 57% of cases. By contrast, none of the two patients with lymphoproliferative T-cell disorders showed genetic abnormalities in eosinophils. In addition, none of the patients in the control group, with reactive eosinophilias, showed genomic imbalances. Losses affected 20q13.13 region in 3 cases of CML, two cases of Ph-negative MPN and two additional cases with MPN and *PDGFRB* rearrangement.

In all cases a common region involving BAC probes dJ155G6 and dJ470L14, from 48254388 48448723 involving *CEIL (B4GALT5)* and *STAU1* genes was lost (Figure 2). It should be noted that losses affecting 11q13.3 were also recurrent in patients with Ph-negative MPN and MPN with *PDGFRB* rearrangement (Figure 2). In both types of diseases a common lost region involving BAC probes bA300I6 and bA804L21 was observed. In this region the genes *CCDN1*, *ORAOV1*, *FGF19*, *FGF4* and *FGF3* are located. Interestingly a common lost in region 19p13.11 involving the BAC probes bK1251H54 and bK1260F20 (from 18186716 to 19559041) was present.

Several genes are located in this region being the most relevant as *GATAD2A*, *PBX4*, *TSSK6*, *MAST3*, *PI3KR2*, *IFI30*, *RAB3A*, and *JUND*.

In addition losses on 8q24.3 were observed in three patients; two of them with a diagnosis of CML while the other was a Ph-negative MPD. In both cases the deleted region, from 144197593 to 145393572, was lost, containing the genes *LYH6*, *GPIHBP1*, *ZFP41*, and *GLI4* (Figure 2).

Discussion

The eosinophilias encompass a broad range of non haematologic (secondary or reactive) and haematologic (primary, clonal) disorders with potential for end-organ damage. An elevated blood eosinophil count may be associated with a number of reactive conditions or with clonal disorders of the bone marrow (BM). Three categories of blood eosinophilia have been described: Reactive (no clonal) eosinophilia, clonal disorders of the BM associated with eosinophilia and HES. Therefore the presence of demonstrable clonality is necessary to define these processes. Different approaches have been used to define the clonality as molecular tests, cytogenetics, Humara assay or the presence of increased blast cells [20,21]. However, our study was based in the eosinophils isolation and the detection of the genomic aberrations by aCGH in these purified cells. The clonality of this process detected by FISH or by combination of different technique ranged between 14% and 20% [20,22]. By contrast our study demonstrated the presence of genomic imbalances in 76% of MPN patients. Therefore aCGH showed clonality in eosinophils and could be a technique used to define the presence of clonality in these processes. It should be noted that none of the two patients with eosinophilia associated to lymphoproliferative T-cell disorders showed genetic abnormalities in eosinophils, consistent with the eosinophilic involvement in these disorders could be reactive and non-related to the T-cell clonal disease.

In the present study several regions of interest have been found to be associated with gains or losses of genetic material in MPN. All the different subtypes of MPN showed genomic imbalances (Figure 1). Deletion of the long arm of chromosome 20 (20q-) is a frequent recurring chromosomal abnormality associated with myeloid malignancies [8,9]. Del(20q) is observed in myelodysplastic syndromes (MDS), myeloproliferative neoplasms (MPN), and acute myeloid leukaemia (AML), but is rarely seen in lymphoid malignancies [8,9]. This abnormality has been reported associated with MDS and prognosis [23]. This deletion may result in loss of heterozygosity or haploinsufficiency of tumour suppressor gene(s), which could contribute to the pathogenesis of myeloid malignancies. However, the target gene(s) remain unknown. Interestingly, the present series showed that 20q- was the most frequent genetic abnormality showed in MPN, affecting all the three types of MPN studied, mainly CML patients (43% of cases). Two different commonly deleted regions in 20q (CDR) have been reported in MPN [24,25]. In our cases, in the eosinophils, CDR

was located in 20q13.13, placed more telomeric than the previously described [24]. Two genes have been localized in this region, *BAGALT* and *SLC9A8*. The gene *BAGALT* has been involved in the biosyntheses of N-glycans, O-glycans, and lactosylceramide and changes of the gene expression increases upon malignant transformation [25]. In our study loss of *STAU1* was also present. This gene is a member of the family of double-stranded RNA (dsRNA)-binding proteins involved in the transport and/or localization of mRNAs to different subcellular compartments and/or organelles [26]. Recently it has been suggested that two genes, located in 20q13, *LEMBTL* (41576467-41603949) and *SGK2* (4,161,100 to 41,647,687) are associated with a new mechanism associated with the acquisition of genomic deletions in myeloproliferative processes associated with 20q deletion [27]. Our results partially confirmed the involvement of this region in MPD disorders. However the BAC array did not cover this region because is placed between two BAC RP5-892M9 (3943713-39498633) and RP5-1028D15 (42873876-43010014) close to the reported deleted region in MPD [27].

The present study showed losses at 11q13.3 in 24% of patients with MPN. The region contains the genes as *CCDN1* and *FGF4* implicated in cancer however the localized of common fragile site FRA11 F could be cause of these losses [28]. Of note, two out of the three patients with a MPN associated with *PDGFRB* rearrangement showed losses in 19p13.11. These are infrequent diseases that usually respond to tyrosine kinase inhibitors [29]. Several genes are located in this region such as *TSSK6*, *MAST3*, *PI3KR2*, *RAB3A*, and *JUND*. It should be noted that no other MPN studied showed genomic changes in this region suggesting that losses in 19p13.11 could be associated with this rare type of MPN.

The presence of genomic changes in 8q24 is infrequent in MPN. Several changes in this region have been reported in CML patients treated with imatinib or associated with disease progression [30,31]. An interstitial deletion of 8q24 have been reported in cases of CD4+CD56+ haematodermic neoplasms a rare and aggressive disease related to the leukaemic counterparts of plasmacytoid dendritic cells [32]. In this region the genes *LYH6*, *GPIHBP1*, and *ZFP41* are located and, therefore, they could be implicated in this MPN.

In summary, aCGH shows clonality in eosinophils in most of the MPN, and could be a technique used for defined clonality in these diseases. In addition, the genomic changes on 20q13 could be a clonal marker in CML, Philadelphia-negative MPN and MPN associated to *PDGFRB* rearrangement with eosinophilia. The lost of

genes located in these regions could provide new insights in the knowledge of these MPN associated with eosinophilia.

Acknowledgements

The study was partially supported by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias, FIS 09/01543 and PI12/00281; RD12/0036/0069 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness & European Regional Development Fund (ERDF) “Una manera de hacer Europa”, “Consejería Educación, Junta Castilla y León, Spain” (HUS272U13), Proyectos de Biomedicina del SACYL (BIO/SA47/13 and BIO/SA31/13). We thank Isabel M Isidro, M^a Angeles Hernández, Irene Rodríguez, Sara González, Teresa Prieto, M^a Ángeles Ramos, Almudena Martín, Ana Díaz, Ana Simón, María del Pozo and Vanesa Gutiérrez of the ‘Centro de Investigación del Cáncer’, Salamanca, Spain, for their technical assistance.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol* 2011;**29**:573-582.
2. Gotlib J. World health Organization-defined eosinophilic disorders: 2011 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 2011;**86**:677-688.
3. Noel P. Eosinophilic myeloid disorders. *Semin Hematol* 2012;**49**:120-127.
4. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 2008;**184**:16-20.
5. Cross NC, Reiter A. Fibroblast growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor abnormalities in eosinophilic myeloproliferative disorders. *Acta Haematol* 2008;**119**:199-206.

6. Bain BJ. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB or FGFR1. *Haematologica* 2010;**95**:696-698.
7. Valent P, Horny HP, Bochner BS, Haferlach T, Reiter A. Controversies and open questions in the definitions and classification of the hypereosinophilic syndromes and eosinophilic leukemias. *Semin Hematol* 2012;**49**:171-181.
8. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. 2013. Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
9. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, Guignard JC, Jacquemot-Perbal MC, Labarussias M, Leberre V, Malo A, Morel-Pair C, Mossafa H, Potier JC, Texier G, Viguié F, Yau Chun Wan-Senon S, Zasadzinski A, Dessen P. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (DIM) in 2013. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:D920-924. Available at <http://Atlas Genetics Oncology.org>
10. Robledo C, García JL, Caballero D, Conde E, Arranz R, Flores T, Grande C, Rodríguez J, García E, Sáez AI, González M, Gutiérrez NC, Piris MA, Hernández JM, Spanish Lymphoma/ Autologous Bone Marrow Transplant Study Group (GEL-TAMO). Array comparative genomic hybridization identifies genetic regions associated with outcome in aggressive diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer* 2009;**115**:3728-3737.
11. Rodríguez AE, Robledo C, García JL, González M, Gutiérrez NC, Hernández JA, Sandoval V, García de Coca A, Recio I, Risueño A, Martín-Núñez G, García E, Fisac R, Conde J, de las Rivas J, Hernández JM. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann Oncol* 2012;**23**:2138-2146.
12. Herrero J, Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, Dopazo J. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:3461-3467.
13. Montaner D, Tárraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valla J, Pujana MA, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**:W486-491.

14. Conde L, Montaner D, Burguet-Castell J, Tárraga J, Medina I, Al-Shahrour F, Dopazo J. ISACGH: a web-based environment for the analysis of Array CGH and gene expression which includes functional profiling. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**:W81-85.
15. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Perqamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999;**23**:41-46.
16. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, Kestler HA, Haslinger C, Stilgenbauer S, Döhner H, Bentz M, Lichter P. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:1039-1044.
17. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L, Bobrow M, Carter NP. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability / mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004;**41**:241-248.
18. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 2004;**305**:525-528.
19. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004;**36**:949-951.
20. Tefferi A, Gotlib J, Pardanani A. Hypereosinophilic syndrome and clonal eosinophilia: point-of-care diagnostic algorithm and treatment update. *Mayo Clin Proc* 2010;**85**:158-164.
21. Bacher U, Reiter A, Haferlach T, Mueller L, Schnittger S, Kern W, Schoch C. A combination of cytomorphology, cytogenetic analysis, fluorescence in situ hybridization and reverse transcriptase polymerase chain reaction for establishing clonality in cases of persisting hypereosinophilia. *Haematologica* 2006;**91**:817-820.

22. Hasserjian RP, Dal Cin P. Deletion of chromosome 20q: friend or foe? *Leuk Res* 2011;**35**:844-845.
23. Huh J, Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Jasek M, Makishima H, Jankowska AM, Jiang Y, Verma A, Theil KS, McDevitt MA, Maciejewski JP. Characterization of chromosome arm 20q abnormalities in myeloid malignancies using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;**49**:390-399.
24. Okada M, Suto Y, Hirai M, Shiseki M, Usami A, Okajima K, Teramura M, Mori N, Motoji T. Microarray CGH analyses of chromosomal 20q deletions in patients with hematopoietic malignancies. *Cancer Genet* 2012;**205**:18-24.
25. Sato T, Furukawa K. Regulation of human β -1,4-galactosyltransferase V gene expression in cancer cells. *Yakugaku Zasshi* 2012;**132**:691-697.
26. Gong C, Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* 2011;**470**:284-288.
27. Aziz A, Baxter EJ, Edwards C, Cheong CY, Ito M, Bench A, Kelley R, Silber Y, Beer PA, Chng K, Renfree MB, McEwen K, Gray D, Nangalia J, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Kiladjian JJ, McMullin MF, Campbell PJ, Ferguson-Smith AC, Green AR. Cooperativity of imprinted genes inactivated by acquired chromosome 20q deletions. *J Clin Invest* 2013;**123**:2169-2182.
28. Functammasan A, Walsh E, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD. A genome-wide analysis of common fragile sites: what features determine chromosomal instability in the human genome? *Genome Res* 2012;**22**:993-1005.
29. Arefi M, García JL, Peñarrubia MJ, Queizán JA, Hermosín L, López-Corral L, Megido M, Giraldo P, de Las Heras N, Vanegas RJ, Gutiérrez NC, Hernández-Rivas JM. Incidence and clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms displaying a PDGFRB rearrangement. *Eur J Haematol* 2012;**89**:37-41.
30. Nadarajan VS, Phan CL, Ang CH, Liang KL, Gan GG, Bee PC, Zakaria Z. Identification of copy number alterations by array comparative genomic hybridization in patients with late chronic or accelerated phase chronic myeloid leukaemia treated with imatinib mesylate. *Int J Haematol* 2011;**93**:465-473.

31. Brazma D, Grace C, Howard J, Melo JV, Holyoke T, Apperley JF, Nacheva EP. Genomic profile of chronic myelogenous leukemia: Imbalances associated with disease progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;**46**:1039-1050.
32. Jardin F, Callanan M, Penther D, Ruminy P, Troussard X, Kerckaert JP, Figeac M, Parmentier F, Rainville V, Vaida I, Bertrand P, Duval AB, Picquenot JM, Chaperot L, Marolleau JP, Plumas J, Tilly H, Bastard C. Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease. *Leukemia* 2009;**23**:698-707

Discusión general

La presencia de eosinofilia asociada a las hemopatías malignas es conocida desde hace mucho tiempo y tanto en el linfoma de Hodgkin como en algunas neoplasias linfoproliferativas los eosinófilos no forman parte del clon tumoral. Sin embargo, las enfermedades neoplásicas con eosinofilia clonal son menos conocidas por su menor prevalencia y porque la definición de clonalidad en los eosinófilos es difícil de establecer en la mayoría de las ocasiones: a nivel inmunofenotípico los eosinófilos no expresan marcadores aberrantes por lo que su caracterización inmunológica es, en la mayoría de las ocasiones, difícil de realizar. Los eosinófilos forman parte del clon patológico en la leucemia aguda mieloblástica aguda (LMA) con inv(16) y en las neoplasias mieloproliferativas crónicas, como la leucemia mieloide crónica (LMC). En ambos casos la aparición de una alteración molecular, la fusión *MYH11/CBFB* en las LAM con inv(16) y la fusión *BCR/ABL* en la LMC, facilita el diagnóstico. Por el contrario, en otras hemopatías malignas ha sido mucho más difícil precisar la naturaleza clonal de los eosinófilos proliferantes. La primera evidencia de esta implicación fue la descripción de una fusión del gen *ETV6 (TEL)* (implicado en la leucemia aguda linfoblástica B, la más frecuente en la infancia) con el gen *PDGFRB*, un gen con actividad tirosina kinasa, en los enfermos con leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) con eosinofilia (Golub et al, 1994). Este hallazgo propició la búsqueda de nuevos genes que se fusionaran con *PDGFRB*. En la actualidad se han descrito más de veinte genes que se reordenan con este gen y ocasionan hemopatías con un importante componente eosinofílico. Posteriormente se describió un nuevo grupo de enfermedades en la que, mediante un mecanismo de pérdida y de fusión, se unían dos genes localizados en el brazo largo del cromosoma 4 (4q12,): el gen *PDGFRA*, con actividad tirosina kinasa, y el gen *FIP1L1*. Los enfermos que tenían esta fusión, o sus variantes, presentaban en muchas ocasiones datos clínicos y biológicos de SHE. Ambos procesos, junto con otras enfermedades caracterizadas por el reordenamiento del gen *FGFR1*, localizado en 8p11, con otros genes, fueron reconocidos en la clasificación de la OMS de 2008 como trastornos diferenciados del resto de las NMP, aunque emparentados con éstas.

En el presente trabajo de tesis doctoral hemos llevado a cabo un estudio amplio, sin restricciones geográficas, de las eosinofilias crónicas clonales. Para ello hemos propiciado la creación de un Registro Nacional de Eosinofilias Clonales en el que han podido participar cualquiera de los centros implicados este tipo de procesos. Uno de los

problemas iniciales con los que nos enfrentamos fue la escasa incidencia y el relativo desconocimiento de este tipo de enfermedades en nuestro entorno, por lo que fue preciso llevar a cabo, de manera paralela al registro, un proceso de educación sanitaria de los profesionales implicados. No hay que olvidar que el tratamiento de las eosinoflias crónicas recae sobre distintas especialidades médicas (Medicina Interna, Neumología, Dermatología, Alergología, Cardiología, etc), que no siempre solicitan la opinión del hematólogo. Algunos de los enfermos incluidos en nuestra serie estaban siendo tratados por médicos no hematólogos que tuvieron acceso al registro. Por ello, es muy difícil precisar la incidencia real de estos procesos en nuestro medio, aunque estimamos que ésta no debe diferir mucho de la propuesta por el programa SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*), que determinó que la tasa ajustada por la edad era de 0,036 casos por cada 100.000 personas al año (Crane et al, 2010). Es muy difícil establecer si esta incidencia está subestimada por el difícil diagnóstico de la enfermedad y porque es muy probable que en un futuro se conozcan nuevas lesiones moleculares que ayuden en la identificación de estos procesos.

En líneas generales tanto los casos con eosinofilia y fusión *PDFGRA/FIP1L1* como los casos con reordenamientos del gen *PDGFRB* presentaron las características clínicas y biológicas similares a las descritas. De un total de 556 pacientes analizados con sospecha de NMP, pudimos detectar diez enfermos con reordenamientos del gen *PDGFRB* en un periodo de recogida de muestras de 5 años. En cuanto al síndrome hipereosinofílico, diecinueve casos de un total de 78 pacientes con sospecha de SHE en un periodo de 6 años, cumplían los criterios de SHE y ocho de los 19 casos presentaron la fusión *PDFGRA/FIP1L1*. Por lo general, estas enfermedades afectan a hombres en edad media (fusión *PDFGRA/FIP1L1*) o más avanzada (en los enfermos con reordenamientos de *PDGFRB*). Además de la característica y constante eosinofilia, tienen otros datos similares al resto de enfermos con NMP, como la presencia de leucocitosis, aunque suelen presentar anemia y, en muchas ocasiones, cifra normal de plaquetas. Estos datos son mucho más característicos en los pacientes con reordenamientos de *PDGFRB*. La presencia de infiltración orgánica por los eosinófilos en los enfermos con fusión *PDFGRA/FIP1L1* fue otra característica diferencial, sin que haya un órgano que destaque por su mayor incidencia de afectación. Por consiguiente, la presencia de cualquiera de estas características debe orientar la sospecha diagnóstica en estos procesos. Por regla general, la existencia de un SHE suele preceder al

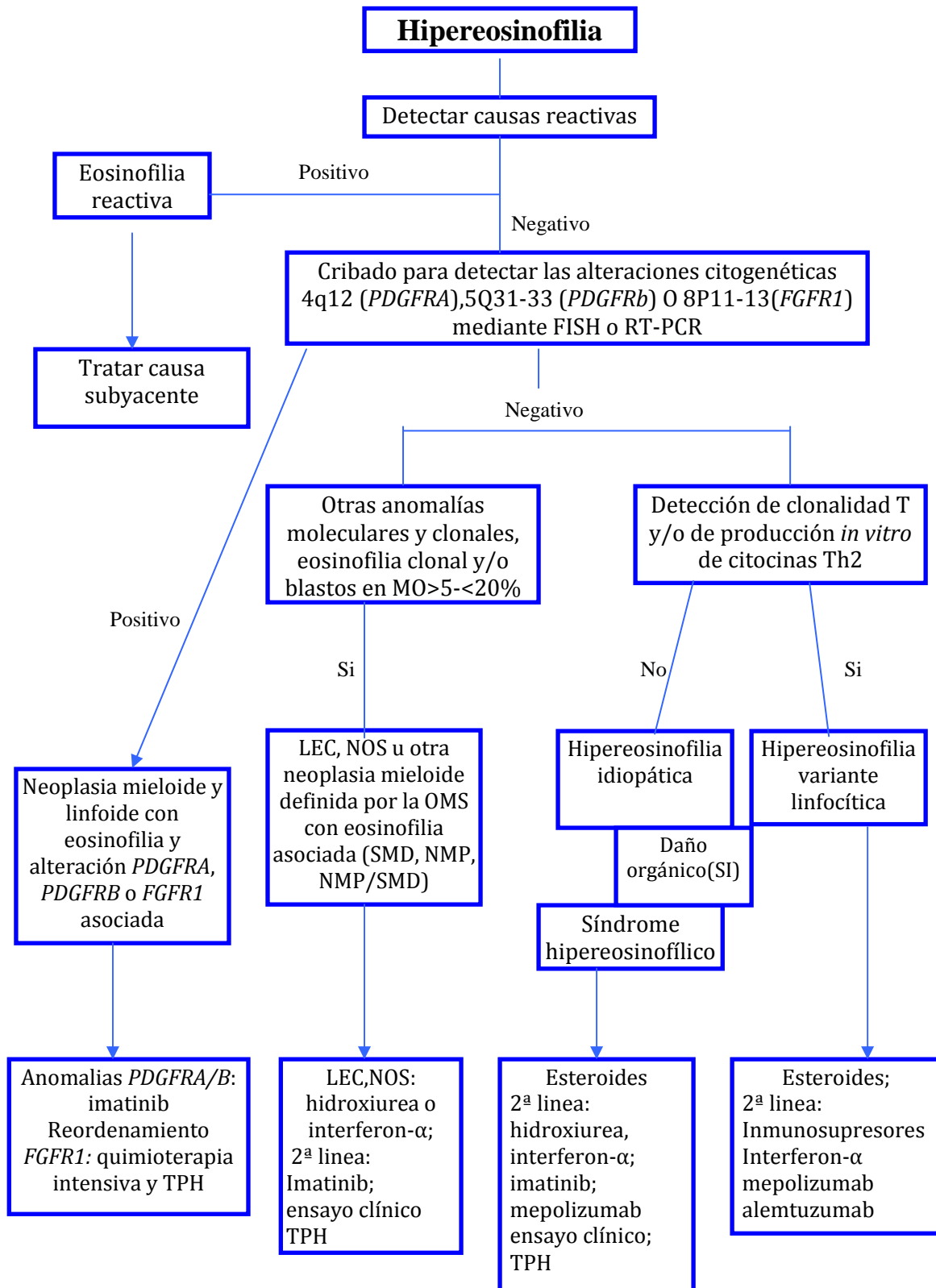
diagnóstico de un paciente con fusión *PDGFRB/FIP1L1*, mientras que una clínica de leucemia mieloide crónica atípica o de una LMMC debe poner en la pista del diagnóstico de un reordenamiento de *PDGFRB* y realizar el estudio de FISH indispensable para su diagnóstico. En el caso de los enfermos con fusión *PDGFRB/FIP1L1* se puede usar esta metodología o bien un análisis de esta fusión génica mediante PCR cuantitativa. Ambos métodos son, en nuestra experiencia, igualmente útiles.

La importancia de la detección de estas anomalías genéticas radica, de manera esencial, en las posibilidades terapéuticas. Es evidente que, como científicos, debemos aspirar a determinar los mecanismos moleculares implicados en las enfermedades, pero esta necesidad alcanza una mayor trascendencia cuando la identificación de las alteraciones genéticas condiciona el tratamiento y, más aún, una terapia casi curativa como en los procesos objeto de este trabajo doctoral. El uso de los inhibidores de la tirosina kinasa (ITK) ha revolucionado el tratamiento de la LMC y ha podido ser aplicado en las eosinofalias clonales con un gran número de respuestas. En nuestra serie, todos los enfermos con fusión *PDGFRB/FIP1L1* respondieron al tratamiento con dosis bajas de imatinib (100 mg/d). Todos ellos han mantenido la respuesta en el tiempo que ha durado el estudio y no se han producido recaídas ni efectos secundarios notables. En algunos casos el tratamiento fue precedido, como indican las guías de práctica clínica, del uso de esteroides, que fueron útiles para aliviar la sintomatología derivada de la infiltración eosinofílica, pero que no modificaron la evolución natural de la enfermedad a largo plazo en ningún enfermo. Cabe destacar que imatinib induce una respuesta hematológica y molecular completa y duradera, pero la reducción de la dosis o la interrupción del fármaco (solo durante varias semanas) puede provocar una recaída precoz (Jovanovic et al, 2007; Klion et al, 2007). Con el reinicio de imatinib se obtuvieron remisiones moleculares en todos los casos. Todos estos hallazgos indican que imatinib puede suprimir el clon *FIP1L1/PDGFRB* con eficacia, pero no lo elimina.

En los pacientes con reordenamiento de *PDGFRB* la dosis de imatinib usada con mayor frecuencia fue la habitual en la LMC (400 mg/d) con una eficacia similar. Los pacientes con esta dosis de imatinib alcanzan remisiones hematológicas y citogenéticas completas y duraderas. La FISH se utilizó para evaluar la respuesta al imatinib en los casos de reordenamiento de *PDGFRB* y *PDGFRB*. La mayoría de los enfermos respondieron al tratamiento, aunque en algún caso, el inhibidor de tirosina-

kinasas (ITK) se instauró en fases muy avanzadas de la enfermedad, con una hipertensión portal muy grave, lo que motivó el fracaso terapéutico. Cabe destacar que en esta serie se incluyen algunos de los primeros casos de enfermos con reordenamiento de *PDGFRB* tratados en nuestro país. De ahí que, especialmente en enfermos mayores, no se hayan usado los ITK como primera opción terapéutica. Algunos de estos enfermos llevan más de nueve años de tratamiento sin que se haya producido la recaída de la enfermedad. Por consiguiente, podemos sugerir que el uso de ITK en los enfermos con reordenamiento de *PDGFRB* podría ser tan útil como en la LMC. Durante la realización de este trabajo de tesis doctoral hemos asistido a un cambio en la percepción de este grupo de enfermedades lo que ha motivado que se soliciten con más frecuencia este tipo de análisis genéticos dadas las mejores perspectivas terapéuticas con el uso de ITK, que se prescriben en fases más tempranas del proceso con los que los resultados globales son mejores.

Por todo ello consideramos que es preciso realizar el estudio de la fusión *PDGFRA* así como del reordenamiento de *PDGFRB* en los enfermos con eosinofilia crónicas, en los que no se haya determinado la existencia de otras clonalidades. Para ello proponemos el siguiente algoritmo diagnóstico en el estudio de toda eosinofilia:



A nivel genético la evaluación de eosinofilia primaria debe comenzarse con la determinación de la fusión del gen *FIP1L1/PDGFR A* en la sangre periférica o en la médula ósea mediante la técnica de FISH o de RT-PCR (Cools et al, 2003). En el

presente trabajo todos los casos se analizaron en médula ósea. Dado que el gen *CHIC2* se encuentra en este segmento genético perdido, es habitual usar la prueba FISH para la detección de *CHIC2* (Pardanani et al, 2003). Se ha observado que algunos pacientes con NMP y fusión *FIP1L1-PDGFR*A tienen el polimorfismo rs4054760 (un SNP situado en la posición 5'UTR de la sub-unidad alfa del receptor de la IL-5) hallazgo asociado con el grado de eosinofilia en la sangre periférica y la presencia de infiltración en los tejidos (Burgstaller et al, 2007). Debemos hacer el diagnóstico diferencial con otros procesos neoplásicos hematológicos, ya que la fusión *FIP1L1/PDGFR*A se ha encontrado, de manera excepcional, en casos de LMA y de linfoma linfoblástico de células T con eosinofilia asociada (Metzgeroth et al, 2007). Si se descarta la presencia de una fusión *FIP1L1/PDGFR*A, deberán estudiarse otras anomalías moleculares recurrentes asociadas con la eosinofilia y, dentro de ellas, la identificación del reordenamiento *PDGFR*B es indispensable porque estos enfermos responden a los ITK (Greipp et al, 2004). No hay que olvidar que algunos enfermos pueden tener una afectación del gen *FGFR*1, asociado a la t(8p11-13), que se observa en los linfomas linfoblásticos con eosinofilia e hiperplasia mieloide.

Cabe mencionar que algunos pacientes presentan una hipereosinofilia durante años de evolución, sin que se encuentre una enfermedad subyacente ni estos enfermos evolucionen a un SHE. Una vez descartadas la presencia de cualquiera de las alteraciones moleculares descritas previamente, estos pacientes podrían ser diagnosticados como una nueva entidad, la denominada "hipereosinofilia de significado indeterminado" (USHE) en la clasificación de la OMS. En estos pacientes, es importante un seguimiento periódico para descartar la evolución del proceso patológico hacia una neoplasia mieloide o la aparición de otra enfermedad subyacente que justifique la presencia de la eosinofilia.

En la segunda parte de nuestro trabajo se llevó a cabo un estudio mediante microrarrays genómicos, o microarrays de CGH (aCGH), de la población de eosinófilos en los casos de hipereosinofilia asociada con procesos mieloproliferativos. En la actualidad en más de la mitad de todos los NMP no es posible demostrar la presencia de clonalidad. Por ello, es preciso explorar otros métodos de detección de clonalidad. En este sentido, la técnica de CGH-arrays ha permitido poder determinar la presencia de ganancias y pérdidas de material genómico en muchas hemopatías malignas, incluso de manera retrospectiva, mediante el uso de material parafinado y es capaz de detectar

alteraciones en regiones genómicas muy pequeñas. El nivel de la resolución del aCGH depende de la densidad del array, de la distribución de las sondas y de los algoritmos bioinformáticos utilizados para la detección de los cambios en el número de copias genéticas. El biochip que usamos en este trabajo doctoral consistía en más de 7.000 BACs específicos de las regiones del genoma humano, lo que permite el análisis con una resolución de 1 Mb e incluso para algunas regiones localizadas en los cromosomas 6, 11, 20 y 22, inferior a 300kb.

No se dispone de estudios relevantes que determinen la existencia de ganancias y de pérdidas de material genético en las NMP. Nuestro estudio reveló que un 76% de los enfermos tienen alteraciones genéticas en los eosinófilos seleccionados de los enfermos con NMP y además identificó la presencia de varias regiones no descritas previamente en estas enfermedades. Así, se observó una pérdida de la región **19p13.11** en los enfermos con reordenamiento del gen *PDGFRB*. Este hallazgo no se había descrito con antelación en estas enfermedades y abre la puerta al estudio de otros genes posiblemente afectados en esta rara entidad. Además, se observó la presencia de pérdidas en **8q24.3** en los enfermos con LMC. Esta alteración no era exclusiva de las LMC, ya que también se observó en otras NMP, por lo que serán necesarios más estudios enfocados al análisis específico de esta región para precisar su implicación en las NMP. Las pérdidas en **20q13** fueron la alteración genética más comúnmente asociadas con las NMP. Esta alteración ya se había descrito asociada a estos procesos, si bien se habían situado en una región más centromérica. Nuestros estudios corroboran en parte los recientemente publicados por el grupo inglés en el que se define una región de pérdida asociada con impronta genética en esta región en las NMP (Aziz et al, 2013), pero el presente trabajo de tesis doctoral ha delimitado que la región de pérdida se localiza en **20q13**. Las consecuencias funcionales de esta alteración aún no se han precisado, pero, sin duda, contribuirán a un mejor conocimiento de estas enfermedades.

Todos los hallazgos obtenidos en los estudios de CGH arrays sugieren que en las NMP hay más alteraciones genéticas que las fusiones génicas y orientan a que en estos procesos se producen muchos cambios genéticos. Esta heterogeneidad clonal también se observa en otras hemopatías malignas y en el cáncer en general y, por lo tanto, es necesario establecer las consecuencias que puedan tener en la evolución de los enfermos. El presente estudio demuestra que los aCGH ayudan a un correcto

diagnóstico de los enfermos con eosinofilia clonal y abre nuevas puertas para utilizar nuevos fármacos en estas enfermedades.

En resumen las neoplasias mieloides con la fusión del receptor *PDGF* y eosinofilia asociada son entidades clínicas bien establecidas y los pacientes pueden ser tratados con éxito con ITK. El SHE todavía es el diagnóstico prevalente en los pacientes con eosinofilia persistente, en el que no se ha identificado una causa primaria o secundaria de la eosinofilia. Con la determinación de las causas primarias y secundarias de eosinofilia persistente, las terapias cada vez son más dirigidas, los efectos secundarios son mínimos y el riesgo de desarrollar daños orgánicos irreversibles ha disminuido. Durante los últimos años, la clasificación de los trastornos eosinofílicos ha mejorado sustancialmente, de manera que parece ser razonable combinar los conceptos y los criterios en propuestas consensuadas multidisciplinarias. En este sentido, un primer paso ha sido la Conferencia de Trabajo del año 2011 sobre Síndromes y Trastornos Eosinofílicos donde se discutieron los criterios diagnósticos y las propuestas de la clasificación. El resultado de estas discusiones en estas enfermedades puede servir como base para una nueva revisión y una clasificación unificada en el futuro, preferiblemente coordinado por la OMS. Nuestros resultados corroboran que la terapia con el imatinib debe usarse en los casos con hipereosinofilia y reordenamientos de los genes *PDGFRA* o de *PDGFRB*. Un reto fundamental sigue siendo la identificación de las lesiones moleculares en casos de NMP sin reordenamientos de estos genes y determinar si en estos enfermos el uso de los ITK puede ser eficaz y, en este sentido se ha determinado la existencia de mutaciones somáticas en estos procesos en nuevos genes como *CSF3R* y *CALR* (Maxson et al, 2013; Nangalia et al, 2013). Todo ello facilitará el uso de tratamientos individualizados en estos enfermos.

En conclusión, la comprensión de las bases celulares y moleculares de los trastornos eosinofílicos se ha traducido en la aplicación de esquemas de clasificación biológicamente más orientados con implicaciones terapéuticas. Esta clasificación debe ser útil para la práctica clínica diaria, así como para las investigaciones científicas. En este sentido, los ITK han modificado el mal pronóstico de los pacientes diagnosticados como SHE /LEC. La detección de alteraciones secundarias en estos procesos llevará a su mejor comprensión y al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

Conclusiones

1. La presencia de eosinofilia crónica es un hallazgo poco frecuente, pero de gran relevancia clínica. Para su correcto enfoque diagnóstico y terapéutico es importante definir un algoritmo clínico en el que se deben incluir el estudio de las alteraciones de los genes *BCR*, *ABL1*, *JAK2*, *PDGFRA*, *PDGFRB* y *FGFR1*, así como descartar la presencia de clonalidad T.
2. Las hemopatías mieloides y linfoides con reordenamientos de los genes *PDGFRA* o *PDGFRB* son enfermedades poco frecuentes, pero no excepcionales. Es difícil determinar su incidencia en nuestro medio, pero podríamos estimarla en torno a 0,1/100.000 habitantes/año. Las NMP con fusión *FIP1L1-PDGFRA* son el 2,2% de todas las NMP, mientras que la incidencia de las NMP con reordenamiento del gen *PDGFRB* se sitúa en torno al 1,8% de todas las NMP.
3. Los enfermos con fusión *PDGFRA/FIP1L1* se caracterizan por ser varones de edad media, con hepatoesplenomegalia y a nivel biológico tienen leucocitosis con eosinofilia, anemia y trombopenia. En nuestra serie todos los enfermos tratados con imatinib a 100 mg/d respondieron al tratamiento y han mantenido la respuesta durante años.
4. Los enfermos con reordenamiento del gen *PDGFRB* suelen ser varones, de edad avanzada y a nivel biológico destaca la presencia de anemia y leucocitosis con eosinofilia. La alteración citogenética más frecuente es la t(5;12), con fusión de los genes *PDGFRB* y *ETV6*. En ocasiones los enfermos con reordenamientos de *PDGFRB* tienen pérdidas de 5q asociadas. En nuestra serie la mayoría de los enfermos tratados con imatinib respondieron a una dosis de 400 mg/d y la respuesta se ha mantenido en la mayoría de ellos.
5. La aplicación de los microarrays genómicos al estudio de las eosinofilias crónicas permite la detección de alteraciones cromosómicas en el 76% de los pacientes con enfermedades mieloproliferativas. Las alteraciones más frecuentes son las pérdidas genéticas, fundamentalmente en 20q13.13 y 11q13.3. Los enfermos con reordenamientos del *PDGFRB* tenían pérdidas en 19p13.11, mientras que en la leucemia mieloide crónica son frecuentes las pérdidas en 8q24.3. Estos cambios no se observan de los enfermos con eosinofilia asociada a LNH-T ni en las eosinofilias reactivas.

Bibliografía

- Ackerman SJ, Bochner BS. Mechanisms of eosinophilia in the pathogenesis of hypereosinophilic disorders. *Immunol Allergy Clin North Am* 2007; 27:357-375.
- Aguiar RC, Macdonald D, Manson PJ et al. Myeloproliferative disorder associated with 8p11 translocations. *Blood* 1995; 86:834-835.
- Apperley JF, Gardembas M, Melo JV et al. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative disease with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 2002; 347:481-487.
- Aziz A, Baxter EJ, Edwards C et al. Cooperativity of imprinted genes inactivated by acquired chromosome 20q deletions. *J Clin Invest* 2013; 123:2169-2182.
- Baccarani M, Cilloni D, Rondoni M et al. The efficacy of imatinib mesylate in patients with FIP1L1-PDGFRalpha-positive hypereosinophilic syndrome. Results of a multicenter prospective study. *Haematologica* 2007; 92:1173-1179.
- Bain BJ, Gilliland DG, Horny HP et al. Myeloid and lymphoid neoplasms with eosinophilia and abnormalities of PDGFRA, PDGFRB, or FGFR1. in: Swerdlow S, Harris NL, Stein H, Jaffe ES, Theile J, Vardiman JW, editors. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press 2008: 68-73.
- Bain BJ, Gilliland DG, Vardiman JW et al. Chronic eosinophilic leukaemia, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press 2008: 51-53.
- Bain BJ. Review: eosinophils and eosinophilic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol* 2010; 8:901-903.
- Bedi R, Du J, Sharma AK et al. Human C/EBP- epsilon activator and repressor isoforms differentially reprogram myeloid lineage commitment and differentiation. *Blood* 2009; 113:317-327.
- Bell CA, Tynan JA, Hart KC et al. Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* 2000; 11:3589-3599.
- Besancon F, Atfi A, Gespach C et al. Evidence for a role of NF-kB in the survival of hematopoietic cells mediated by interleukin 3 and the oncogenic TEL/platelet-derived growth factor receptor β fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8081-8086.

- Burgastaller S, Kreil S, Waghorn K et al. The severity of FIP1L1-PDGFR α - positive chronic eosinophilic leukaemia is associated with polymorphic variation at the IL5RA locus. *Leukemia* 2007; 21:2428-2432.
- Burrow AA, Williams LE, Pierce LC et al. Over half of breakpoints in gene pairs involved in cancer-specific recurrent translocations are mapped to human chromosomal fragile sites. *BMC Genomics* 2009; 10:59.
- Cain JA, Xiang Z, O'Neal J et al. Myeloproliferative disease induced by TEL-PDGFR β displays dynamic range sensitivity to St5 gene dosage. *Blood* 2007; 109:3906-3914.
- Carroll M, Tomasson MH, Barker GF et al. The TEL/platelet-derived growth factor β receptor (PDGFR β R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGFR β R kinase-dependent signalling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:14845-14850.
- Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S et al. GGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997; 90:4947-4952.
- Cazzola M, Malcovati L, Invernizzi R. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011:264-272.
- Chiara F, Bishayee S, Heldin CH et al. Autoinhibition of the platelet-derived growth factor beta-receptor tyrosine kinase by its C-terminal tail. *J Biol Chem* 2004; 279:19732-19738.
- Chmielecki J, Peifer M, Viale A et al. Systematic screen for tyrosine kinase rearrangements identifies a novel C6orf204-PDGFR β fusion in a patient with recurrent T-ALL and an associated myeloproliferative neoplasm. *Genes Chrom Cancer* 2012; 51:54-65.
- Cools J, De Angelo DJ, Gotlib J et al. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1201-1214.
- Crane MM, Chang CM, Kobayashi MG et al. Incidence of myeloproliferative hypereosinophilic syndrome in the United States and an estimate of all hypereosinophilic syndrome incidence. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:179-181.
- Cross NC, Reiter A. fibroblast Growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor abnormalities in eosinophilic myeloproliferative disorders. *Acta Haematol* 2008; 119:199-206.

- David M, Cross NC, Burgstaller S et al. Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 109:61-64.
- DeBrosse CW, Case JW, Putnam PE et al. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatr Dev Pathol* 2006; 9:210-218.
- De Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A et al. Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum Mol Genet* 2004; 13:1827-1837.
- Demoulin JB, Montano-Almendras CP. Platelet-derived growth factors and their receptors in normal and malignant hematopoiesis. *Am J Blood Res* 2012; 2:44-56.
- Dierov J, Xu Q, Dierova R et al. TEL/ platelet-derived growth factor receptor β activates phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase and requires PI3 kinase to regulate the cell cycle. *Blood* 2002; 99:1758-1765.
- Dobbin E, Graham C, Freeburn RW et al. Proteomic analysis reveals a novel mechanism induced by the leukemic oncogene Tel/PDGFR β in stem cells: activation of the interferon response pathways. *Stem Cell Res* 2010; 5:226-243.
- Dulohery MM, Patel RR, Schneider F et al. Lung involvement in hypereosinophilic syndromes. *Respir Med* 2011; 105:114-121.
- Elling C, Erben P, Walz C et al. Novel imatinib-sensitive PDGFRA- activating point mutations in hypereosinophilic syndrome induce growth factor independence and leukemia-like disease. *Blood* 2011; 117:2935-2943.
- Erben P, Gosenca D, Muller MC et al. Screening for diverse PDGFRA or PDGFRB fusion genes is facilitated by generic quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Haematologica* 2010; 95:738-744.
- Fink SR, Belongie KJ, Paternoster SF et al. Validation of a new three-color fluorescence in situ hybridization (FISH) method to detect CHIC2 deletion, FIP1L1/PDGFR α fusion and PDGFRA translocations. *Leuk Res* 2009; 33:843-846.
- Fritz B, Schubert F, Wrobel G et al. Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma. *Cancer Res* 2002; 62:2993-2998.
- Fukushima K, Matsumura I, Ezoe S et al. FIP1L1-PDGFR α imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 2009; 284:7719-7732.

- Gandhi M, Dillon LW, Pramanik S et al. DNA breaks at fragile sites generate oncogenic RET/PTC rearrangements in human thyroid cells. *Oncogene* 2010; 29:2272-2280.
- Gatault S, Legrand F, Delbeke M et al. Involvement of eosinophils in the anti-tumor response. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:1527-1534.
- Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:651-663.
- Gleich GJ, Leiferman KM, Pardanani A et al. Treatment of hypereosinophilic syndrome with imatinib mesilate. *Lancet* 2002; 359:1577-1578.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M et al. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ETS-like gene, TEL, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994; 77:307-316.
- Greipp PT, Dewald GW, Tefferi A. Prevalence, breakpoint distribution, and clinical correlates of t(5;12). *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 153:170-172.
- Griffith J, Black J, Faerman C et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004; 13:169-178.
- Grubor V, Krasnitz A, Troge JE et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood* 2009; 113:1294-1303.
- Halaburda K, Prejzner W, Szatkowski D et al. Allogeneic bone marrow transplantation for hypereosinophilic syndrome: long-term follow-up with eradication of FIP1L1-PDGFR α fusion transcript. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38:319-320.
- Helbig G, Stella-Holowiecka B, Majewski M et al. A single weekly dose of Imatinib is sufficient to induce and maintain remission of chronic eosinophilic leukaemia in FIP1L1-PDGFR α - expressing patients. *Br J Haematol* 2008; 141:200-204.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79:1283-1316.
- Hiwatari M, Ono R, Taki T et al. Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFR α gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 2008; 22:2279-2280.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:709-750.

- Horny HP, Sotlar K, Valent P. Eosinophil, basophil and mast infiltrates in the bone marrow: crossing the boundaries of diagnosis. *J Hematopathol* 2011; 4:101-111.
- Imagawa J, Harada Y, Yoshida T et al. Successful treatment with low-dose dasatinib in a patient with chronic eosinophilic leukemia intolerant to imatinib. *Rinsho Ketsueki* 2011; 52:546-550.
- Ishibashi S, Ohashi Y, Suzuki T et al. Tumor-associated tissue eosinophilia in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 1419-1424.
- Jackson CC, Medeiros LJ, Miranda RN. 8p11 myeloproliferative syndrome: a review. *Hum Pathol* 2010; 41:461-476.
- Jovanovic JV, Score J, Waghorn K et al. Low-dose Imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFR α - positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 2007; 109:4635-4640.
- Kaminski WE, Lindahl P, Lin NL et al. Basis of hematopoietic defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF β -receptor null mice. *Blood* 2001; 97:1990-1998.
- Kita H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev* 2011; 242:161-177.
- Kleinfeldt T, Nienaber CA, Kische S et al. Cardiac manifestation of the hypereosinophilic syndrome: new insights. *Clin Res Cardiol* 2010; 99:419-427.
- Klion AD, Robyn J, Akin C et al. Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood* 2004; 103:473-478.
- Klion AD, Bochner BS, Gleich GJ et al. Approaches to the treatment of hypereosinophilic syndromes: a workshop summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1292- 1302.
- Klion AD, Robyn J, Maric I et al. Relapse following discontinuation of Imatinib mesylate therapy for FIP1L1/PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia: implications for optimal dosing. *Blood* 2007; 110:3552-3556.
- Klion AD. Eosinophilic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011:257-263.

- Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 2004; 104:795-801.
- Lierman E, Michaux L, Beullens E et al. FIP1L1-PDGFRalpha D842V, a novel panresistant mutant, emerging after treatment of FIP1L1-PDGFRalpha T674I eosinophilic leukemia with single agent sorafenib. *Leukemia* 2009; 23:845-851.
- Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003; 101:3109-3117.
- Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med* 2013; 368:1781-1790.
- Medves S, Demoulin JB. Tyrosine kinase gene fusions in cancer: translating mechanisms into targeted therapies. *J Cell Mol Med* 2012; 16:237-248.
- Medves S, Noël LA, Montano-Almendras CP et al. Multiple oligomerization domains of KANK1-PDGFR β are required for JAK2-independent hematopoietic cell proliferation and signaling via STAT5 and ERK. *Haematologica* 2011; 96:1406-14.
- Metzgeroth G, Erben P, Martin H et al. Limited clinical activity of nilotinib and sorafenib in FIP1L1-PDGFR α positive chronic eosinophilic leukemia with imatinib-resistant T674I mutation. *Leukemia* 2012; 26:162-164.
- Metzgeroth G, Walz C, Erben P et al. Safety and efficacy of imatinib in chronic eosinophilic leukaemia and hypereosinophilic syndrome: a phase-II study. *Br J Haematol* 2008; 143:707-715.
- Metzgeroth G, Walz C, Score J et al. Recurrent finding of the FIP1L1-PDGFR α fusion gene in eosinophilia-associated acute myeloid leukemia and lymphoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21:1183-1188.
- Monma F, Nishii K, Lorenzo FT et al. Molecular analysis of PDGFR α/β genes in core binding factor leukemia with eosinophilia. *Eur J Haematol* 2006; 76:18-22.
- Montano-Almendras CP, Essaghir A, Schoemans H et al. ETV6-PDGFRB and FIP1L1-PDGFR α stimulate human hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation into eosinophils: the role of nuclear factor-kB. *Haematologica* 2012; 7:1064-1072.
- Mori Y, Iwasaki H, Kohno K et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* 2009; 206:183-193.

- Nand R, Bryke C, Kroft SH et al. Myeloproliferative disorder with eosinophilia and ETV6-ABL gene rearrangement: efficacy of second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Res* 2009; 33:1144-1146.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; 369:2391-2405.
- Nishioka C, Ikezoe T, Yang J et al. Long-term exposure of leukemia cells to multi-targeted tyrosine kinase inhibitor induces activations of AKT, ERK and STAT5 signaling via epigenetic silencing of the PTEN gene. *Leukemia* 2010; 24:1631-1640.
- Noel P. Eosinophilic myeloid disorders. *Semin Hematol* 2012; 49:120-127.
- Noga O, Englmann C, Hanf G et al. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1348-1354.
- Novo FJ, Vizmanos JL. Chromosome translocations in cancer: computational evidence for the random generation of double-strand breaks. *Trends Genet* 2006; 22:193-196.
- Ogbogu PU, Bochner BS, Butterfield JH et al. Hypereosinophilic syndrome: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:1319-1325.
- Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004; 66:488-495.
- Ostman A, Heldin CH. PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv Cancer Res* 2007; 97:247-274.
- Pardanani A, Brockman SR, Paternoster SF et al. FIP1L1-PDGFR α fusion: Prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. *Blood* 2004; 104:3038-3045.
- Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR et al. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR α fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 102:3093-3096.
- Pardanani A, Ketterling RP, Li CY et al. FIP1L1-PDGFR α in eosinophilic disorders: Prevalence in routine clinical practice, long term experience with imatinib therapy, and a critical review of the literature. *Leuk Res* 2006; 30:965-970.
- Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ et al. High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 2006; 16:1136-1148.

- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20:207-211.
- Pitini V, Arrigo C, Azzarello D et al. Serum concentration of cardiac Troponin T in patients with hypereosinophilic syndrome treated with imatinib is predictive of adverse outcomes. *Blood* 2003; 102:3456-3457.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; 23:41-46.
- Powell N, Walker MM, Talley NJ. Gastrointestinal eosinophils in health, disease and functional disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7:146-156.
- Rives S, Alcorta I, Toll T et al. Idiopathic hypereosinophilic syndrome in children: Report of a 7-year-old boy with FIP1L1-PDGFR α rearrangement. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27:663-665.
- Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:9-22.
- Ross TS, Gilliland DG. Transforming properties of the Huntingtin interacting protein 1/ platelet-derived growth factor β receptor fusion protein. *J Biol Chem* 1999; 274:22328-22336.
- Rubio-Moscardo F, Martínez-Climent JA, Siebert R et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005; 105:4445-4454.
- Schoffski P, Ganser A, Pascheberg U et al. Complete haematological and cytogenetic response to interferon alpha-2a of a myeloproliferative disorder with eosinophilia associated with a unique t(4;7) aberration. *Ann Hematol* 2000; 79:95-98.
- Simon D, Salemi S, Yousefi S et al. Primary resistance to Imatinib in Fip1-like 1-platelet-derived growth factor receptor alpha-positive eosinophilic leukemia. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1054-1056.
- Simon HU, Rothenberg ME, Bochner BS et al. Refining the definition of Hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126:45-49.
- Snijders AM, Nowak N, Seagraves R et al. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; 29:263-264.

- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20:399-407.
- Southam, DS, Widmer N, Ellis R et al. Increased eosinophil-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. *J. Allergy Clin. Immunol* 2005; 115:95–102.
- Steer EJ, Cross NC. Myeloproliferative disorders with translocations of chromosome 5q31-35: role of the platelet-derived growth factor receptor beta. *Acta Haematol* 2002; 107:113-22.
- Sternberg DW, Tomasson MH, Carroll M et al. The TEL/PDGFRβ fusion in chronic myelomonocytic leukemia signals through STAT5-dependent and STAT5-independent pathways. *Blood* 2001; 98:3390-3397.
- Su RJ, Zhang XB, Li K et al. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *Br J Haematol* 2002; 117:735-746.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- Tabouret E, Charbonnier A, Mozziconacci MJ et al. Low-dose nilotinib can maintain complete molecular remissions in FIP1L1/PDGFRα-positive hypereosinophilic syndrome. *Leuk Res* 2011; 35:136.
- Tefferi A, Patnaik MM, Pardanani A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *Br J Haematol* 2006; 133: 468–492.
- Toffalini F, Kallin A, Vandenberghe P et al. The fusion proteins TEL-PDGFRβ and FIP1L1-PDGFRα escape ubiquitination and degradation. *Haematologica* 2009; 94:1085-1093.
- Toffalini F, Demoulin JB. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases. *Blood* 2010; 116:2429-2437.
- Tomasson MH, Sternberg DW, Williams IR et al. Fatal myeloproliferation, induced in mice by TEL/PDGFRβ R expression, depends on PDGFRβ R tyrosines 579/581. *J Clin invest* 2000; 105:423-432.
- Tyybakinoja A, Saarinen-Pihkala U, Elonen E et al. Amplified, lost, and fused genes in 11q23-25 amplicon in acute myeloid leukemia, an array-CGH study. *Genes Chrom Cancer* 2006; 45:257-264.

- Ueno NT, Anagnostopoulos A, Rondon G et al. Successful non-myeloablative allogeneic transplantation for treatment of idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 2002; 119:131-134.
- Valent P. Pathogenesis, classification and therapy of eosinophilia and eosinophil disorders. *Blood Rev* 2009; 23:157-165.
- Valent P, Gleich GJ, Reiter A et al. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. *Expert Rev Hematol* 2012; 5:157-176.
- Valent P, Horny HP, Bochner BS et al. Controversies and open questions in the definitions and classification of the hypereosinophilic syndromes and eosinophilic leukemias. *Semin Hematol* 2012; 49:171-181.
- Vandenberghe P, Wlodarska I, Michaux L et al. Clinical and molecular features of FIP1L1-PDGFR α (+) chronic eosinophilic leukemias. *Leukemia* 2004; 18:734-742.
- Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 2010; 184:16-20.
- Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S et al. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* 2003; 63:2872-2880.
- Von Bubnoff N, Gorantla SP, Engh RA et al. The low frequency of clinical resistance to PDGFR inhibitors in myeloid neoplasms with abnormalities of PDGFR α might be related to the limited repertoire of possible PDGFR α kinase domain mutations in vitro. *Oncogene* 2011; 30:933-943.
- Winkelmann N, Hidalgo-Curtis C, Waghorn K et al. Recurrent CEP85L-PDGFRB fusion in patient with t(5;6) and imatinib-responsive myeloproliferative neoplasm with eosinophilia. *Leuk Lymphoma* 2013; 54:1527-1531.
- Yang Y, Yuzawa S, Schlessinger J. Contacts between membrane proximal regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:7681-7686.
- Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z et al. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 2007; 130:323-334.