

UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN MASTOCITOSIS SISTÉMICA

Javier Ignacio Muñoz González

Directores:

Dr. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale

Dr. Andrés Celestino García Montero

TESIS DOCTORAL
2020



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



D. Alberto Orfão De Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Don. Javier Ignacio Muñoz González titulado “UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN MASTOCITOSIS SISTÉMICA”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 20 de Octubre del año 2020.

Fdo: Dr. Alberto Orfão de Matos



D. Andrés Celestino García Montero, Doctor en Biología y profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Don. Javier Ignacio Muñoz González titulado “UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN MASTOCITOSIS SISTÉMICA”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca a 20 de Octubre del año 2020.

Fdo: Dr. Andrés C. García Montero

La presente tesis doctoral incluye tres trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el *Science Citation Reports*, los cuales se detallan a continuación:

1. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis.

Muñoz-González JI^{1,2}, Jara-Acevedo M^{2,3}, Alvarez-Twose I^{2,4}, Merker JD⁵, Teodosio C⁶, Hou Y⁵, Henriques A^{2,4}, Roskin KM⁵, Sanchez-Muñoz L^{2,4}, Tsai AG⁵, Caldas C^{1,2}, Matito A^{2,4}, Sánchez-Gallego JI^{1,2}, Mayado A^{1,2}, Dasilva-Freire N^{1,2}, Gotlib J⁷, Escribano L^{1,2}, Orfao A^{1,2*}, García-Montero AC^{1,2*}.

*A.O. and A.C.G.-M. contributed equally to this work as joint last authors.

Blood Advances. 2018 Oct; 2(21): 2814-2828. doi: 10.1182/bloodadvances.2018020628

IF: 4.58 (Q1)

2. Frequency and prognostic impact of KIT and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis.

Muñoz-González JI^{1,2}, Álvarez-Twose I^{2,4}, Jara-Acevedo M^{2,3}, Henriques A^{2,4}, Viñas E^{2,3}, Prieto C⁸, Sánchez-Muñoz L^{2,4}, Caldas C^{1,2}, Mayado A^{1,2}, Matito A^{2,4}, Dasilva-Freire N^{1,2}, Orfao A^{1,2*}, García-Montero AC^{1,2*}.

*A.O. and A.C.G.-M. contributed equally to this work as joint last authors.

Blood. 2019 Aug; 134(5): 456-468. doi: 10.1182/blood.2018886507

IF: 17.54 (Q1)

3. Proposed Global Prognostication Score for Systemic Mastocytosis

Muñoz-González JI^{1,2}, Álvarez-Twose I^{2,4}, Jara-Acevedo M^{2,3}, Zanotti R⁹, Perkins C⁷, Jawhar M¹⁰, Sperr WR¹¹, Shoumariyeh K¹², Schwaab J¹⁰, Greiner G¹³, Henriques A^{2,4}, Caldas C^{1,2}, Fernández-Giménez C^{1,2}, Sánchez-Muñoz L^{2,4}, Mayado A^{1,2}, Pérez-Pons A^{1,2}, Schmitt-Graeff A¹⁴, Duyster J¹², Tanasi I⁹, Olivieri F¹⁵, Mora-Casterá E¹⁶, Luna I¹⁶, Senent L¹⁶, Bañas MH¹⁷, Nuñez-García A¹⁸, Jurado-Chacón M¹⁸, Martín-Sánchez G¹⁹, Colado E²⁰, Xicoy B²¹, Gener-Ricós G²¹, Gotlib J⁷, Bonadonna P¹⁵, Reiter A¹⁰, Valent P¹¹, García-Montero AC^{1,2*}, Orfao A^{1,2*}

*A.O. and A.C.G.-M. contributed equally to this work as joint last authors.

Lancet Haematology. 2020. (Accepted)

IF: 10.39 (Q1)

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), University of Salamanca, Salamanca, Spain; Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ²Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain; ³Sequencing Service (NUCLEUS), CIBERONC, University of Salamanca and Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL) Salamanca, Spain; ⁴Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast) and CIBERONC, Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain; ⁵Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; ⁶Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; ⁷Division of Hematology, Stanford University School of Medicine/Stanford Cancer Institute, Stanford, CA; ⁸Bioinformatics Service, Nucleus, University of Salamanca (USAL); ⁹Section of Hematology, Department of Medicine, Verona University Hospital, Verona, Italy; ¹⁰Hematology and Oncology, University Hospital Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany; ¹¹Department of Internal Medicine I, Division of Hematology and Ludwig Boltzmann Institute for Hematology and Oncology, Medical University of Vienna,

Austria; ¹²Department of Medicine I, Medical Center - University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany, and German Cancer Consortium (DKTK) Partner Site Freiburg and German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany; ¹³Albert-Ludwigs-University Freiburg, Freiburg, Germany; ¹⁴Department of Laboratory Medicine and Ludwig Boltzmann Institute for Hematology and Oncology, Medical University of Vienna, Austria; ¹⁵Allergy Unit, Verona University Hospital, Verona, Italy; ¹⁶Hospital Universitario y Politécnico de la Fe (Valencia, Spain); ¹⁷Hospital San Pedro Alcantara (Cáceres, Spain); ¹⁸Hospital Virgen de las Nieves (Granada, Spain); ¹⁹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL) (Santander, Spain); ²⁰Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain); ²¹Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain), and Josep Carreras Leukemia Research Institute; Universitat Autònoma de Barcelona.

Índice

Glosario de abreviaturas	1
Introducción	5
1. Mastocitosis	7
1.1. Criterios diagnósticos	8
1.2. Clasificación de la mastocitosis	10
1.2.1. Subtipos de mastocitosis cutánea (CM)	10
1.2.2. Subtipos diagnósticos de mastocitosis sistémica (SM)	11
1.2.2.1. Mastocitosis sistémica indolente (ISM)	13
1.2.2.2. Mastocitosis sistémica quiescente (SSM)	13
1.2.2.3. Mastocitosis sistémica avanzada (AdvSM).....	14
1.2.2.4 Variantes provisionales de SM	16
1.2.3. Mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM).....	17
1.2.4. Sarcoma de mastocitos	18
2. Mutación de <i>KIT</i> y mastocitosis.....	18
2.1. Mutación D816V de <i>KIT</i>	19
2.2. Otras mutaciones de <i>KIT</i>	20
2.3. Naturaleza clonal de los mastocitos en ausencia de mutaciones de <i>KIT</i>	21
3. Hematopoyesis clonal	21
3.1. Hematopoyesis clonal y edad.....	22
3.2. Hematopoyesis clonal y hemopatías malignas	24
3.3. Hematopoyesis clonal y SM	25
4. Factores pronósticos y estratificación de riesgo en pacientes con SM.....	26
4.1. Factores pronósticos	26
4.1.1. Parámetros demográficos (edad y sexo).....	26
4.1.2. Carga mastocitaria e infiltración tisular	27
4.1.3. Parámetros séricos.....	29
4.1.3.1. Albumina	30
4.1.3.3. Fosfatasa alcalina	31
4.1.3.4. Triptasa.....	32
4.1.3.5. β 2-microglobulina.....	33
4.2. Alteraciones genéticas asociadas a SM.....	33
4.2.1. Mutación multilineal y carga alélica de <i>KIT</i>	34
4.2.2. Mutaciones en otros genes diferentes de <i>KIT</i>	35
4.2.2.1. Mutaciones en genes implicados en el procesamiento alternativo del ARNm	36
4.2.2.1.1 Mutaciones del gen <i>SRSF2</i> asociadas a SM.....	37

4.2.2.2. Mutaciones que afectan a genes implicados en mecanismos de regulación epigenética	38
4.2.2.2.1. Mutaciones en el gen <i>TET2</i> y SM	39
4.2.2.2.2. Mutaciones en el gen <i>ASXL1</i> y SM	40
4.2.2.2.3. Mutaciones en el gen <i>DNMT3A</i> y SM.....	41
4.2.2.2.4. Mutaciones en el gen <i>EZH2</i> y SM	41
4.2.2.3. Mutaciones que afectan a factores de transcripción y vías de señalización	42
4.2.2.3.1. Mutaciones en el gen <i>RUNX1</i> y SM.....	43
4.2.2.3.2. Mutaciones en el gen <i>CBL</i> y SM	44
4.2.2.3.2. Alteraciones en los genes <i>KRAS</i> y <i>NRAS</i> y SM	45
4.3. Estratificación pronóstica de pacientes con SM	46
5. Tratamiento de la SM.....	50
5.1. Tratamiento sintomático.....	51
5.2. Tratamiento citorreductor y/o citostático	52
5.3. Tratamiento dirigido a dianas moleculares.....	52
Hipótesis y objetivos.....	55
Materiales, métodos y resultados	61
Artículo 1: “Impacto pronóstico de las mutaciones somáticas y germinales presentes en mastocitosis sistémica”	63
Artículo 2: “Frecuencia e impacto pronóstico de la mutación de <i>KIT</i> y de otras variantes genéticas en mastocitosis sistémica indolente”	97
Artículo 3: “Propuesta de un algoritmo pronóstico universal para pacientes diagnosticados de mastocitosis sistémica”	121
Discusión.....	159
Conclusiones	181
Bibliografía.....	185

Glosario de abreviaturas

A

ADN: ácido desoxirribonucleico

AdvSM: mastocitosis sistémica avanzada (abreviado del inglés: “*advanced systemic mastocytosis*”)

AHN: neoplasia hematológica asociada a mastocitosis (abreviado del inglés: “*associated hematological neoplasm*”)

AHNMD: neoplasia hematológica a expensas de células hematopoyéticas, diferentes de mastocitos, asociada a mastocitosis (abreviado del inglés “*associated clonal hematological non-mast cell disease*”)

AML: leucemia mieloblástica aguda (abreviado del inglés: “*acute myeloid leukemia*”)

ARCH: hematopoyesis clonal relacionada con la edad (abreviado del inglés: “*age related clonal hematopoiesis*”)

ASM-t: mastocitosis sistémica agresiva (abreviado ASM, del inglés: “*aggressive systemic mastocytosis*”) en transformación leucémica

B

B-findings: hallazgos de tipo benigno (abreviado del inglés: “*Benign-findings*”)

β2M: beta-2-microglobulina

BMM: mastocitosis de médula ósea (abreviado del inglés: “*bone marrow mastocytosis*”)

C

2-CdA: cladribina

C-findings: hallazgos sugestivos de necesidad de tratamiento citorreductor o quimioterápico (abreviado del inglés: “*Citorreductive-findings*”)

CCUS: citopenia clonal de significado incierto (abreviado del inglés: “*clonal cytopenia of undetermined significance*”)

CH: hematopoyesis clonal (abreviado del inglés: “*clonal hematopoiesis*”)

CHIP: hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (abreviado del inglés: “*clonal hematopoiesis of indertemined potential*”)

CHOP: hematopoyesis clonal con potencial oncogénico (abreviado del inglés: “*clonal hematopoiesis of oncogenic potential*”)

CIMF: mielofibrosis crónica idiopática (abreviado del inglés: “*chronic idiopathic myelofibrosis*”)

CLL: leucemia linfática crónica (abreviado del inglés: "*chronic lymphocytic leukemia*")

CM: mastocitosis cutánea (abreviado del inglés: "*cutaneous mastocytosis*")

CMML: leucemia mielomonocítica crónica (abreviado del inglés: "*chronic myelomonocytic leukemia*")

CRS: modelo pronóstico ajustado por la clínica (abreviado del inglés "*clinical-adjusted risk score*")

D

DCM: mastocitosis cutánea difusa (abreviado del inglés: "*diffuse cutaneous mastocytosis*")

E

ECNM: Red Europea de mastocitosis (abreviado del inglés: "*European competence network on mastocytosis*")

H

HLA: antígeno leucocitario humano (abreviado del inglés: "*human leukocyte antigen*")

HUMARA: test del receptor de andrógenos humano (abreviado del inglés: "*human androgen receptor assay*")

HR: índice de riesgo (abreviado del inglés: "*hazard ratio*")

HSC: células progenitoras hematopoyéticas (abreviado del inglés: "*hematopoietic stem cells*")

I

ICUS: citopenia idiopática de significado incierto (abreviado del inglés: "*idiopathic cytopenia of undetermined significance*")

IDUS: displasia idiopática de significado incierto (abreviado del inglés: "*idiopathic dysplasia of undetermined significance*")

IFN- α : interferón- α

IPSM: modelo pronóstico internacional para mastocitosis sistémica (abreviado del inglés "*international prognostic scoring system for mastocytosis*")

ISM: mastocitosis sistémica indolente (abreviado del inglés: "*indolent systemic mastocytosis*")

J

JMML: leucemia mielomonocítica juvenil (abreviado del inglés: "*juvenile myelomonocytic leukemia*")

K

KIT: receptor para el factor de crecimiento de células progenitoras (“*stem cell factor*”)

M

MAPS: modelo pronóstico ajustado por mutaciones genéticas (abreviado del inglés “*mutation-adjusted prognostic score*”)

MARS: modelo de estratificación de riesgo ajustado por mutaciones genéticas (abreviado del inglés “*mutation-adjusted risk score*”)

MC: mastocito

MCAS: síndrome de activación mastocitaria (abreviado del inglés: “*mast cell activation syndrome*”)

MCL: leucemia de mastocitos (abreviado del inglés: “*mast cell leukemia*”)

MDS: síndrome mielodisplásico (abreviado del inglés: “*myelodysplastic syndrome*”)

MIS: mastocitosis en la piel (abreviado del inglés: “*mastocytosis in the skin*”)

MM: afectación multilineal de líneas celulares mieloides por la mutación D816V de *KIT*

MMCAS: síndrome de activación mastocitaria monoclonal (abreviado del inglés: “*monoclonal mast cell activation syndrome*”)

MML: afectación multilineal de líneas celulares mieloides y linfoides por la mutación D816V de *KIT*

MO: médula ósea

MPN: neoplasia mieloproliferativa (abreviado del inglés: “*myeloproliferative neoplasm*”)

MPCM: mastocitosis cutánea maculopapular (abreviado del inglés: “*maculopapular cutaneous mastocytosis*”)

MSQ: célula mesenquimal

N

NGS: secuenciación masiva de última generación (abreviado del inglés: “*next generation sequencing*”)

NK: asesina natural (abreviado del inglés: “*natural killer*”)

NonAdvSM: mastocitosis sistémica no avanzada (abreviado del inglés: “*non-advanced systemic mastocytosis*”)

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

OS: supervivencia global (abreviado del inglés: “*overall survival*”)

P

PV: policitemia vera

R

RARS: anemia refractaria con sideroblastos en anillo (abreviado del inglés: “*refractory anemia with ringed sideroblasts*”)

RARS-T: anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (abreviado del inglés: “*refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocytosis*”)

S

SAP: fosfatasa alcalina sérica (abreviado del inglés: “*serum alkaline phosphatase*”)

S/A/R: panel de genes *SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1*

sBT: nivel basal de triptasa sérica (abreviado del inglés: “*serum baseline tryptase*”)

SCF: factor de crecimiento de células progenitoras (abreviado del inglés: “*stem cell factor*”)

SM: mastocitosis sistémica (abreviado del inglés: “*systemic mastocytosis*”)

SP: sangre periférica

SSM: mastocitosis sistémica quiescente (abreviado del inglés: “*smouldering systemic mastocytosis*”)

T

TE: trombocitemia esencial

TK: tirosina quinasa

U

UP: urticaria pigmentosa

W

WDSM: mastocitosis sistémica bien diferenciada (abreviado del inglés: “*well differentiated systemic mastocytosis*”)

Introducción

1. Mastocitosis

La mastocitosis engloba un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una expansión y acumulación de mastocitos (abreviado MC, del inglés “*mast cells*”) patológicos portadores de la mutación D816V de *KIT* (~90% de los casos) en la piel, médula ósea (MO), y con menos frecuencia, en otros tejidos incluidos los ganglios linfáticos y la mucosa del tracto gastrointestinal¹⁻⁴. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) distingue 3 grandes subgrupos de mastocitosis^{5,6}: i) mastocitosis cutánea (abreviado CM, del inglés “*cutaneous mastocytosis*”) caracterizada por la presencia de lesiones (por acúmulo de MC) en la piel en ausencia de infiltración de otros tejidos, y significativamente más prevalente en niños; ii) mastocitosis sistémica (abreviado SM, del inglés “*systemic mastocytosis*”) caracterizada por la presencia de MC patológicos en la piel, MO y/o en otros órganos y tejidos, y que constituyen la forma más habitual de mastocitosis entre pacientes adultos; y iii) el sarcoma de MC (Tabla 1). A su vez, la clasificación de la OMS de 2016 subdivide las CM en CM maculopapular (MPCM), MC difusa (DCM) y mastocitoma cutáneo, mientras que dentro de la SM separa las formas indolentes de la enfermedad -ISM y mastocitosis de médula ósea (o BMM, abreviada del inglés “*bone marrow mastocytosis*”)- de las formas intermedias -SM quiescente o “*smouldering*” (SSM)- y avanzadas de mastocitosis -AdvSM- como la SM agresiva (ASM), la SM asociada a otra hemopatía (SM-AHN) y la leucemia de mastocitos (MCL)⁶.

Aunque la prevalencia exacta de mastocitosis en la población general sigue siendo desconocida, se estima una tasa aproximada de 1:10.000 individuos, afectando desde recién nacidos a adultos de edad avanzada, con una distribución global similar en hombres y mujeres⁷. Debido a la baja prevalencia de la enfermedad, según la OMS la mastocitosis se considera una enfermedad rara⁸. Sin embargo, el mejor conocimiento de la enfermedad, junto con la disponibilidad de técnicas diagnósticas de elevada sensibilidad, han contribuido a que en la última década se haya observado un aumento significativo en el número de pacientes de nuevo diagnóstico, lo cual sugiere una mayor prevalencia⁹⁻¹¹.

Tabla 1. Clasificación OMS 2016 de la mastocitosis

Mastocitosis cutánea (CM)

CM maculopapular (MPCM)

CM difusa (DCM)

Mastocitoma cutáneo

Mastocitosis sistémica (SM)

Mastocitosis sistémica indolente (ISM)

Mastocitosis sistémica quiescente o “smouldering” (SSM)

Mastocitosis sistémica agresiva (ASM)

Mastocitosis sistémica asociada a otra hemopatía (SM-AHN)

Leucemia de mastocitos (MCL)

Sarcoma de mastocitos

Adaptado de Valent et al^{6,12}

1.1. Criterios diagnósticos

Debido a la gran heterogeneidad y comportamiento clínico, las mastocitosis muestra formas muy diversas de presentación. Así, mientras que la mayoría de los pacientes acude al dermatólogo debido a la aparición de lesiones en la piel (e.g. MIS, abreviado del inglés “*mastocytosis in the skin*”), en otros casos la enfermedad debuta con un síndrome de activación mastocitaria (MCAS) asociado a anafilaxia, o con síntomas constitucionales, típicos de formas iniciales y avanzadas de la enfermedad, respectivamente¹².

De forma característica, las lesiones cutáneas de mastocitosis se asocian en la exploración física a un “Signo de Darier” positivo (eritema y edema provocado por contacto físico) fruto de la liberación de mediadores (e.g. histamina, triptasa, quimasa y compuestos biológicos activos derivados del ácido araquidónico) generados por los MC patológicos acumulados a nivel epidérmico y fácilmente detectables en la biopsia de piel. Con relativa frecuencia, la presencia de mastocitosis en la piel (MIS) en niños se asocia con formas cutáneas puras de mastocitosis (CM) en ausencia de afectación de otros órganos¹². Por el contrario, la gran mayoría de los adultos que presentan MIS tiene compromiso de otros órganos y tejidos además de la piel, correspondiendo a formas sistémicas de la enfermedad (SM).

En 2001 la OMS ha establecido una serie de criterios (Tabla 2) para el diagnóstico de SM. Estos criterios incluyen un criterio mayor o principal -presencia de agregados densos y multifocales de más de 15 MC en MO y/o en otros tejidos diferentes de la piel- y cuatro criterios menores entre los que se incluye la presencia de: i) MC (>25%) con morfología alterada (MC alargados, con núcleo excéntrico, evaginaciones citoplasmáticas y/o hipogranulados) que pueden formar o no agregados; ii) MC fenotípicamente aberrantes que expresan CD25 (cadena α del receptor de la interleucina-2) y/o CD2 (molécula de adhesión asociada a células activadas); iii) niveles basales de triptasa sérica (abreviado sBT, del inglés “*serum baseline tryptase*”) elevados (≥ 20 ng/mL); y iv) mutaciones en el codón 816 de *KIT*. Para el diagnóstico de SM se han de cumplir el criterio mayor y al menos uno de los cuatro criterios menores o, en ausencia del criterio mayor, 3 de los 4 criterios menores¹³.

Tabla 2. Criterios diagnósticos OMS 2016 para SM

CRITERIO MAYOR

1. Presencia de agregados densos y multifocales de ≥ 15 MC en MO y/o en tejidos extracutáneos

CRITERIOS MENORES

1. >25% de MC con morfología alterada (MC alargados, con núcleo excéntrico, evaginaciones citoplasmáticas y/o hipogranulados) que pueden formar o no agregados
2. Expresión de los marcadores CD25 y/o CD2 en los MC.
3. Niveles basales de triptasa sérica elevados (≥ 20 ng/mL)
4. Presencia de mutaciones en el codón 816 de *KIT*

Diagnóstico de SM solo si se cumple:
CRITERIO MAYOR + ≥ 1 CRITERIO MENOR
o
 ≥ 3 CRITERIOS MENORES

Adaptado de Valent et al^{6,12}

De forma similar a lo que ocurre con aquellos pacientes que presentan MIS al diagnóstico, los sujetos con sarcoma de MC, suelen presentar también una masa única (en la piel u otra región extra-medular) compuesta por MC (CD117⁺ y triptasa⁺) con características inmaduras y atípicas por inmunohistoquímica y que invaden tejido circundante^{12,14}. Por el contrario, en aquellos casos en los que la enfermedad debuta como una MCAS (e.g. anafilaxia) en ausencia de lesión cutánea, el diagnóstico de mastocitosis requiere de un estudio de MO (u otro tejido) dirigido o no por la presencia

de mutaciones de *KIT* en sangre periférica (SP), junto con la existencia de niveles elevados de sBT, parámetros clínicos y demográficos (e.g. sexo masculino) y/o el posible desencadenante de las reacciones anafilácticas que fueran motivo de consulta¹⁵.

1.2. Clasificación de la mastocitosis

Ante la gran variedad de formas de mastocitosis, además de la elevada heterogeneidad clínica y pronóstica de las mismas, se hace necesaria la definición de distintos algoritmos diagnósticos. Siguiendo los criterios OMS 2016⁶, en la actualidad, la mastocitosis se divide en 3 grandes grupos: CM, SM y sarcomas de MCs, que se subdividen en tres categorías de CM y 5 variantes distintas y bien establecidas de SM, hasta un total de 10 formas distintas de mastocitosis.

1.2.1. Subtipos de mastocitosis cutánea (CM)

La mayoría de los pacientes con mastocitosis presentan lesiones cutáneas con independencia de su subtipo diagnóstico (CM o SM). Según la OMS⁶, la CM se define además de por la presencia de lesiones cutáneas como consecuencia de la infiltración de la piel por MC patológicos, por la ausencia de afectación de otros órganos y tejidos, asociada o no a sintomatología relacionada con la liberación de los mediadores de MC. Desde el punto de vista epidemiológico, la CM suele manifestarse (y diagnosticarse) en los primeros años de vida, remitiendo de forma espontánea en muchos niños durante la pubertad. Según la forma de presentación en la piel, la OMS distingue tres subtipos principales de CM: i) mastocitosis cutánea maculopapular (abreviado MPCM, del inglés “*maculopapular CM*”) conocido frecuentemente también como urticaria pigmentosa (UP); ii) mastocitosis cutánea difusa (abreviado DCM, del inglés “*diffuse CM*”); y iii) el mastocitoma cutáneo.

La MPCM o UP representa el tipo de CM (y de afectación cutánea en general) más prevalente de mastocitosis, tanto en niños como en adultos¹⁶. Los niños suelen presentar lesiones de mayor tamaño con afectación extensa de la piel y aspecto variable (formas polimórficas). Por el contrario, las lesiones maculo-papulares de los adultos suelen ser más pequeñas con predominio en el tronco y en

las zonas próximas a la raíz de las extremidades, y un aspecto monomórfico (variante monomórfica)^{17,18} (Figura 1A).

Los pacientes con DCM se caracterizan fundamentalmente por presentar un engrosamiento de la piel sin bordes bien delimitados que recuerda a la “piel de naranja” y que aparece de forma exclusiva en niños¹⁷. La DCM está asociada a cifras más elevadas de sBT y a manifestaciones clínicas más graves asociadas a la liberación de gran cantidad de mediadores mastocitarios (e.g. *flushing*, cuadros de hipotensión o colapso vascular) asociado con relativa frecuencia a la formación de vesículas en las zonas de piel más afectadas^{15,17,19,20} (Figura 1B).

A su vez, el mastocitoma cutáneo se caracteriza por ser una lesión única de aspecto ovalado y tamaño variable formada por MC maduros. Habitualmente el mastocitoma cutáneo se localiza en tronco y extremidades y se observa casi exclusivamente en niños, remitiendo de forma espontánea en la mayoría de los pacientes antes de la edad adulta^{18,19} (Figura 1C).



Figura 1: Imágenes representativas de los diferentes subtipos de lesiones cutáneas observadas en la CM (y la MIS en general): A) MPCM (variante monomórfica); B) DCM; y C) mastocitoma cutáneo. Adaptado de Matito et al²¹

1.2.2. Subtipos diagnósticos de mastocitosis sistémica (SM)

La SM incluye 5 subgrupos diagnósticos bien establecido según la OMS 2016⁶, la SM indolente (ISM), la SM quiescente/smouldering (SSM) y tres subgrupos de SM avanzadas (AdvSM), la SM agresiva (ASM), la SM asociada a otra hemopatía maligna (SM-AHN) y la leucemia de MC (MCL). Para la clasificación de la SM, la OMS propone la utilización de dos grupos de hallazgos: los hallazgos B (B-

findings) o de tipo benigno y aquellos que sugieren la necesidad de emplear tratamiento citorreductor o quimioterápico (hallazgos C o *C-findings*)^{5,22}.

Como hallazgos-B la OMS incluye la existencia de 3 criterios diferentes: i) infiltración de MO con >30% de MC detectados mediante técnica de inmunohistoquímica y niveles de sBT >200ng/mL; ii) MO hipercelular con signos de displasia en ausencia de criterios diagnósticos de síndrome mielodisplásico (MDS)/neoplasia mieloproliferativa (MPN); y iii) la presencia de adenopatías (>2 cm) y/u otras organomegalias (e.g. esplenomegalia y/o hepatomegalia) en ausencia de afectación funcional del órgano involucrado⁵.

A su vez, constituyen hallazgos de tipo “C” la presencia de i) niveles de hemoglobina ≤100 g/L y/o recuentos en sangre de granulocitos neutrófilos ≤1.0 x10⁹/L y/o de plaquetas ≤100x10⁹/L; ii) hepatomegalia asociada a aumento de enzimas hepáticas, ascitis y/o hipertensión portal; iii) esplenomegalia con hiperesplenismo; iv) malabsorción con hipoalbuminemia y pérdida de peso; y/o v) la presencia de lesiones osteolíticas de gran tamaño y/u osteoporosis severa con fracturas patológicas⁵ (Tabla 3).

Tabla 3. Hallazgos de tipo B y C para la subclasificación de la SM según la OMS

Tipo B	Infiltración mastocitaria de MO por >30%* MC y sBT >200 µg/L MO hipercelular con signos de displasia y sin criterios de MDS/MPN Adenopatías (>2 cm) y/o (hepato y/o espleno-megalía) sin evidencia de disfunción orgánica
Tipo C	Hb <100 g/L y/o neutrófilos <1.0x10 ⁹ /L y/o plaquetas <100x10 ⁹ /L Hepatomegalia con aumento de enzimas hepáticas en suero, ascitis y/o hipertensión portal Esplenomegalia con hiperesplenismo Malabsorción con hipoalbuminemia y pérdida de peso Lesiones osteolíticas grandes y/u osteoporosis severa con fracturas patológicas
En función del número de hallazgos se clasificará la SM en: ISM (≤1 HALLAZGO de TIPO B) en ausencia de hallazgos de tipo C o SSM (≥2 HALLAZGOS de TIPO B) en ausencia de hallazgos de tipo C o AdvSM (≥1 HALLAZGO de TIPO C) independientemente del número de hallazgos de tipo B	

Adaptado de Valent et al^{6,12}

*Estudiado en biopsia de MO mediante inmunohistoquímica

1.2.2.1. Mastocitosis sistémica indolente (ISM)

La ISM es el subtipo más común de SM. Habitualmente se caracteriza por la coexistencia de lesiones cutáneas asociadas a síntomas relacionados con la liberación local y/o sistémica de mediadores, junto a infiltración de MO (con o sin agregados) por MCs patológicos^{23,24}. Desde el punto de vista histológico, la cantidad de MC en la biopsia de MO suele ser baja o moderada (<30% mediante técnicas de inmunohistoquímica) en ausencia de hallazgos B y C²⁵; los MC suelen presentar una morfología anormal (forma alargada, fusiforme y/o con cambios en la granulación), expresión de las proteínas CD25 y/o CD2 en su membrana^{26,27} y positividad para la mutación D816V (u otras mutaciones) de *KIT*^{9,28,29}. A nivel sérico, los valores basales de triptasa aunque suelen estar aumentados, habitualmente se sitúan entre 20 y 200 ng/mL, pudiendo incluso situarse en valores normales.

Por todo ello, desde un punto de vista clínico la ISM sigue siendo una entidad heterogénea en la que la gran mayoría de los pacientes (~90%) presenta lesiones cutáneas asociadas a síntomas locales (prurito y *flushing*) y/o sistémicos (e.g. anafilaxias) relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios³⁰, asociándose en general a buen pronóstico. Sin embargo, en un pequeño porcentaje de casos (5-10%), con los años, se observa progresión a formas más avanzadas de la enfermedad (e.g. SSM y AdvSM)^{5,28}. Como veremos más adelante, un subgrupo de pacientes con ISM presenta anafilaxia asociada a infiltración de MO, pero en ausencia de lesiones cutáneas, lo que ha llevado a considerarlas como una variante de la enfermedad acuñada en la literatura como ISM sin lesión cutánea (ISM_{S-}) o mastocitosis de MO (BMM)⁶.

1.2.2.2. Mastocitosis sistémica quiescente (SSM)

A diferencia de la ISM, los pacientes con SSM presentan ≥ 2 hallazgos de tipo B en ausencia de hallazgos de tipo C (Tabla 3), representando desde 2016 un subtipo diagnóstico propio dentro de la clasificación de la OMS⁵, de pronóstico intermedio entre la ISM y las formas avanzadas de la

enfermedad (i.e. ASM, SM-AHN y MCL)^{2,5,31}, con una supervivencia global (abreviado OS, del inglés “*overall survival*”) intermedia entre la de la ISM y la AdvSM³²⁻³⁴. Respecto a la ISM, la SSM suele presentar una carga mastocitaria y/o niveles de sBT más elevados.

1.2.2.3. Mastocitosis sistémica avanzada (AdvSM)

La presencia de al menos un hallazgo de tipo C (Tabla 3) define los tres subgrupos diagnósticos de AdvSM: ASM, SM-AHN y MCL⁵. La ASM supone aproximadamente el 10% de todas las SM. Habitualmente estos pacientes presentan una infiltración marcada de MO por MC, en ocasiones asociada a esclerosis ósea y/o lesiones osteolíticas visibles mediante técnicas de imagen^{14,24,30}. Fenotípicamente, los MC de pacientes con ASM suelen presentar expresión en la membrana citoplasmática de la proteína CD25 (con o sin CD2), y un inmunofenotipo relativamente inmaduro (e.g. baja expresión de FcεRI)³⁵. Asimismo, en la práctica totalidad de los pacientes que presentan ASM se detecta la presencia de la mutación D816V de *KIT*, tanto en los MCs patológicos, como en otras líneas celulares mieloides y linfoides de MO y SP^{29,30}. Generalmente no presentan lesiones cutáneas, ni síntomas locales relacionados con la liberación de mediadores³⁶. Recientemente se ha acordado subdividir la ASM en función del porcentaje de MCs presentes en MO, en ASM típica (cuando se observan <5% de MC en el aspirado de MO) y ASM en transformación a leucemia de MC (ASM-t) cuando el porcentaje de MCs en la citología del aspirado medular oscila entre 5% y 19%⁵.

La SM asociada a otra hemopatía (SM-AHN, o SM-AHNMD) constituye el subgrupo más heterogéneo de SM, representando, tras la ISM, el segundo subtipo más frecuente de SM^{23,24}. La elevada heterogeneidad de la SM-AHN viene dada tanto por el subtipo de SM (ISM o ASM), como por la neoplasia hematológica concreta que se asocia al componente mastocitario y que mayoritariamente está constituida por una hemopatía de línea mieloide, fundamentalmente la leucemia mielomonocítica crónica (abreviado CMML, del inglés “*chronic myelomonocytic leukemia*”), seguida de los MDS y la leucemia mieloblástica aguda (abreviado AML, del inglés “*acute myeloid leukemia*”)³⁷. De

forma menos habitual, el componente mastocitario de la SM-AHN se asocia a hemopatías linfoides como la leucemia linfática crónica (abreviado CLL, del inglés “*chronic lymphocytic leukemia*”), distintos subtipos de linfoma no-Hodgkin (abreviado NHL, del inglés “*non-Hodgkin lymphoma*”) o incluso el mieloma múltiple, entre otras neoplasias linfoides³⁸⁻⁴⁰. Para el diagnóstico de SM-AHN deben aplicarse por un lado los criterios diagnósticos OMS 2016 de SM³¹ y, por otra parte, los criterios propuestos para el diagnóstico de cada uno de los posibles subtipos de hemopatías malignas asociadas³¹. Desde el punto de vista clínico, los pacientes con SM-AHN suelen mostrar manifestaciones típicas tanto de la SM, como de la neoplasia hematológica concreta asociada, observándose a nivel molecular diferentes patrones de afectación de la hematopoyesis por parte de la mutación D816V u otras mutaciones, dependiendo estas también del tipo de hemopatía asociada⁴¹. Así, mientras que aquellos pacientes con SM asociada a hemopatías de línea mieloide las células tumorales de ambas neoplasias (SM y AHN) comparten la mutación de *KIT* en una proporción significativa de casos, en las SM asociadas a hemopatías de origen linfóide la mutación de *KIT* suele estar restringida a los MCs, lo que apoyaría la coincidencia en este último grupo de SM-AHN de dos clones genéticamente no relacionados³⁹⁻⁴¹. Desde el punto de vista evolutivo, el pronóstico de los pacientes con SM-AHN está condicionado en gran medida por el subtipo de mastocitosis (ISM vs ASM) y particularmente, de AHN. Además, en la última década se han descrito numerosas alteraciones en otros genes diferentes de *KIT*, como los genes *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *SRSF2* y *TET2*, típicos de las AHN mieloides que se observan de forma habitual en pacientes con SM-AHN. Desde el punto de vista pronóstico, estas alteraciones se han asociado de forma recurrente a un peor pronóstico y una OS significativamente acortada, tanto entre pacientes con SM-AHN, como en otras formas de AdvSM (e.g. ASM y MCL)⁴²⁻⁴⁸.

La MCL representa el subtipo menos frecuente de SM constituyendo <1% de todas las SM, pero a la vez, es el más agresivo y de peor pronóstico^{23,49}. Para el diagnóstico de MCL se requiere una infiltración superior al 20% de MCs en el aspirado de MO, habitualmente asociado a diseminación a SP y/o infiltración de otros órganos y tejidos, provocando un déficit funcional del órgano afectado⁵. Desde el punto de vista clínico, la MCL es una enfermedad heterogénea; así, ocasionalmente se asocia a

lesiones cutáneas y un inmunofenotipo de los MC que puede ser inmaduro o maduro, con expresión aberrante de las proteínas CD25 y/o CD2 y presencia o ausencia de la mutación D816V u otras mutaciones de *KIT*^{29,50-55}. En aquellos casos en los que se constata la presencia de mutaciones en *KIT*, éstas suelen mostrar un patrón de afectación multilineal de la hematopoyesis²⁹. Actualmente, podemos distinguir dos variantes principales de MCL: i) la variante clásica, que se caracteriza por mostrar una infiltración de MCs tanto en MO ($\geq 20\%$) como en SP ($\geq 10\%$) y ii) la variante de MCL aleucémica en la que el porcentaje de MCs circulantes en SP es inferior a 10%. Además, ambas variantes de MCL se subclasifican por un lado, en i) MCL primarias o “*de novo*” diagnóstico y ii) MCL secundarias cuando resultan de la progresión de una ISM, ASM o SM-AHN a MCL o MCL-AHN; y por otra parte, en iii) MCL crónica y iv) MCL aguda, según carezcan o presenten hallazgos de tipo C (i.e. afectación funcional de la hematopoyesis o de otros órganos)^{31,56} (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de la MCL

Variable	Tipo de MCL	Características
Nº de MC en SP	MCL leucémica	$\geq 10\%$ de MC circulantes en SP
	MCL aleucémica	$< 10\%$ de los leucocitos de SP son MC
Momento del diagnóstico	MCL primaria	MCL de nuevo diagnóstico sin antecedentes de SM o de otra hemopatía mieloide
	MCL secundaria	Progresión desde otro subtipo de SM (generalmente de ASM) o de un sarcoma de MC
Hallazgos C	MCL aguda ^A	Hallazgos de tipo C ^A asociados a MC inmaduros (y precursores de mastocitos)
	MCL crónica	Ausencia de hallazgos de tipo C asociados MC de aspecto maduro y un curso clínico menos agresivo

^A, con la presencia de 1 C-finding es suficiente para clasificar una MCL como MCL aguda.
Adaptado de Valent et al⁵⁶

1.2.2.4 Variantes provisionales de SM

La mastocitosis de MO (abreviado BMM, del inglés “*bone marrow mastocytosis*”) constituye un subtipo provisional de SM caracterizado por la ausencia de lesiones cutáneas, asociada

habitualmente a MCAS (e.g. anafilaxia) y a niveles de sBT normales o ligeramente elevados⁵. La mayoría de pacientes con BMM muestran una masa tumoral (carga mastocitaria) en MO y una carga alélica para la mutación D816V de *KIT* relativamente bajas y el aspirado de MO muestra pequeños agregados de MC⁵. Además, por definición, los pacientes con BMM no presentan hallazgos B ni C. Por todo ello, la BMM constituye una variante de SM de pronóstico favorable. No obstante, en la mayoría de pacientes existe un riesgo de anafilaxia importante, lo que puede poner en riesgo su vida si no se toman las medidas preventivas adecuadas⁵.

1.2.3. Mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM)

La mastocitosis sistémica bien diferenciada (abreviado WDSM, del inglés “*well-differentiated systemic mastocytosis*”) constituye una variante de mastocitosis que, aunque definida por la OMS en su clasificación³¹, sigue careciendo de entidad propia y criterios diagnósticos bien definidos. En conjunto, la WDSM representa $\leq 5\%$ de todas las mastocitosis⁵⁷ y se caracteriza por presentar MC maduros de aspecto normal o hipergranulado, que carecen de expresión aberrante de CD25 y/o CD2 asociado en la mayoría de los casos a ausencia de la mutación D816V de *KIT*⁵⁸ y niveles de triptasa normales o ligeramente elevados. Por todo lo anterior, resulta difícil establecer el diagnóstico de afectación sistémica en la WDSM llevando a una clasificación incorrecta de los pacientes como CM especialmente en aquellos casos en los que existe una carga mastocitaria relativamente baja en MO⁵⁹. Por ello, se hace necesario la incorporación de nuevos criterios para el diagnóstico de WDSM como la expresión aberrante de CD30 o la sobreexpresión de carboxipeptidasa observada en los MC de MO de estos pacientes^{59,60}. Todo esto unido al comienzo en edad pediátrica, el predominio en mujeres y la asociación familiar contribuirían a un mejor diagnóstico de la enfermedad^{58,61,62}. En la última actualización de la clasificación de mastocitosis de la OMS de 2016⁶ se indica que en aquellos pacientes en los que se observe una morfología mastocitaria compatible con WDSM se añada el sufijo “WD” a la categoría de SM correspondiente (e.g. ISM_{WD} o MCL_{WD})³¹. Desde el punto de vista terapéutico es importante reconocer esta variante de mastocitosis, especialmente en pacientes con AdvSM_{WD}, ya que

estudios recientes demuestran el beneficio del tratamiento con Imatinib en pacientes que presentan mutaciones en los exones 8-10 de *KIT* que codifican para las regiones extracelular e yuxtramembrana de la proteína, con una elevada tasa de remisiones completas^{5,58}.

1.2.4. Sarcoma de mastocitos

El sarcoma de MC es el menos frecuente de los distintos subtipos de mastocitosis, siendo una enfermedad extremadamente rara que afecta a pacientes de cualquier edad³¹. Se caracteriza por la presencia de un tumor localizado, compuesto por MC indiferenciados, típicamente de crecimiento lento, pero con alta capacidad de diseminación e invasión de los órganos cercanos, lo que le confiere un mal pronóstico⁶³. Aunque generalmente se trata de un tumor localizado, a veces se presenta en el contexto de una SM pudiendo mostrar diseminación leucémica^{55,64,65}. A nivel molecular, en algunos pacientes se han detectado distintas mutaciones (e.g. D816V, L799F, N822K y V560G) en el gen *KIT*^{54,64,66,67}.

2. Mutación de *KIT* y mastocitosis

El gen *KIT* es un proto-oncogén que codifica para un receptor de membrana con actividad tirosina quinasa (TK) localizado en el brazo largo del cromosoma 4 humano⁶⁸. Cuando el receptor *KIT* se une a su ligando, el factor de crecimiento de células madre (abreviado SCF, del inglés “*stem cell factor*”), se producen cambios conformacionales en el receptor que provocan la dimerización y activación de *KIT* mediante autofosforilación del mismo. En función de si SCF se encuentra en su forma soluble o unida a la membrana, se producirá una activación cuyo efecto será menos o más duradero, respectivamente⁶⁹⁻⁷². La señalización mediada por la activación de *KIT* es clave en la hematopoyesis y en la supervivencia de las células progenitoras hematopoyéticas (abreviado HSC, del inglés “*hematopoietic stem cells*”)⁷³. Dentro de las células hematopoyéticas, a excepción de los MC y algunas células “*natural killer*” (NK), *KIT* se deja de expresar a medida que las células maduran a las distintas líneas mieloides y linfoides⁷⁴. En los MC la expresión de *KIT* se mantiene en niveles elevados a lo largo

de toda su diferenciación, desarrollando un papel fundamental en su proliferación, diferenciación y supervivencia^{75,76}. Debido al papel desempeñado por *KIT* en las HSC y en los MC, cualquier mutación que afecte al funcionamiento normal de la proteína, puede provocar una alteración de la hematopoyesis y de la función mastocitaria con potencial oncogénico⁷⁷. En este sentido, actualmente las mutaciones de *KIT* se agrupan según su efecto en: i) mutaciones asociadas a pérdida de función de *KIT*, típicas de enfermedades benignas como el piebaldismo⁷⁸; y ii) mutaciones asociadas a una activación constitutiva de *KIT*, y una supervivencia celular más prolongada, con potencial oncogénico, como ocurre en la mastocitosis^{77,79}.

2.1. Mutación D816V de *KIT*

La mutación D816V localizada en el exón 17 del gen *KIT*, provoca la activación constitutiva de *KIT* sin necesidad de la unión de SCF, y representa la alteración más frecuentemente encontrada en pacientes con SM (~90% de los adultos y en un tercio de las mastocitosis pediátricas). Desde el punto de vista clínico, la presencia de la mutación D816V de *KIT* constituye uno de los criterios menores de la OMS para el diagnóstico de SM^{13,80}. Además, otras variantes de esta mutación en el mismo exón 17, como las mutaciones D816Y/H, más frecuentes en AML y MDS, también se han descrito en alrededor del 1% de las SM^{81,82}. Clínicamente, la localización de las mutaciones tiene gran relevancia debido a que aquellas mutaciones a lo largo del gen *KIT* que ocurren en los dominios transmembrana o yuxtamembrana de *KIT* (exones 9-11) que inducen dimerización espontánea del receptor, hacen que los mastocitos patológicos respondan al tratamiento con inhibidores de TK convencionales (e.g. Imatinib), mientras que las mutaciones en el dominio catalítico (exones 13-18) son resistentes a estos fármacos, al provocar un cambio conformacional en la estructura de la proteína que requiere de inhibidores más específicos como Avapritinib^{51,52,61,62,83-88} (Figura 2).

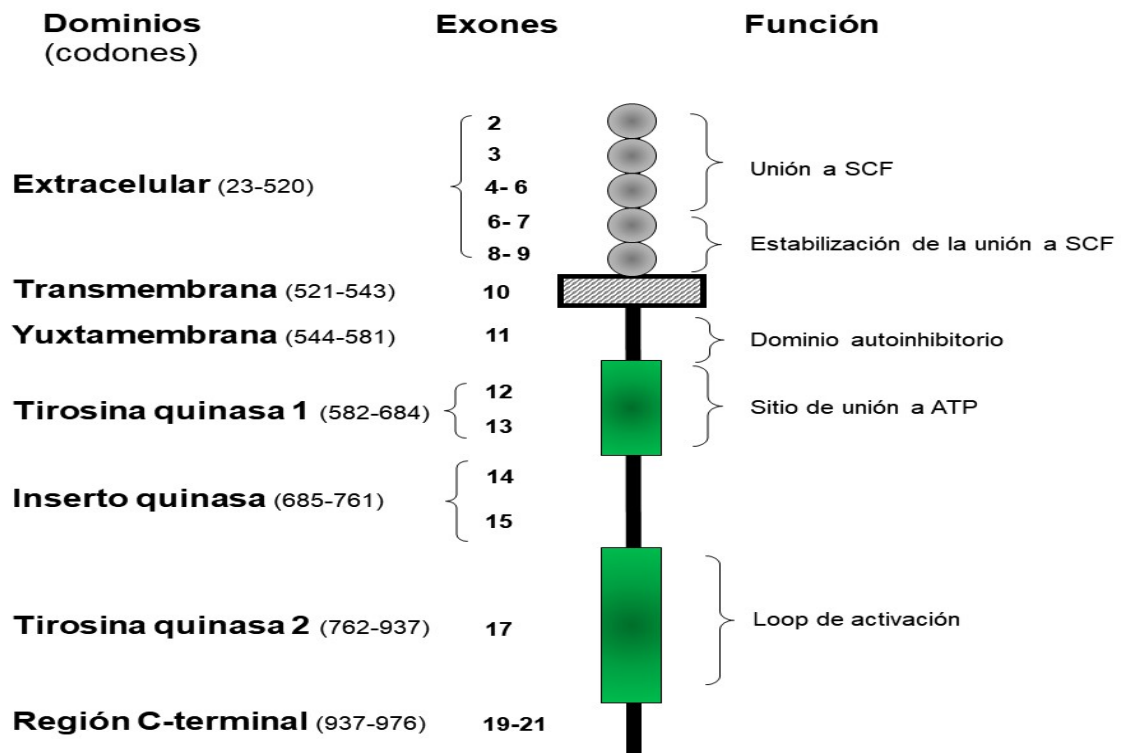


Figura 2. Estructura del receptor *KIT*

Adaptado de Orfao et al⁷⁶

2.2. Otras mutaciones de *KIT*

En alrededor de 4 a 5% de los adultos con mastocitosis sistémica, y en más de un tercio de los niños⁸⁹, se observa la presencia de mutaciones de *KIT* distintas de la mutación D816V siendo las localizaciones más habituales, el exón 17 y los exones 5, 8-11 y 13^{29,70,85}. Las mutaciones localizadas fuera del dominio TK2 de *KIT* (exón 17) descritas hasta la fecha, incluyen mutaciones que afectan al exón 5 (Y296C⁹⁰), 8 (del417-419InsY⁹¹, del417-419InsNA⁹¹, del417-419InsI⁹¹, InsFF419⁸⁹, C443Y⁸⁹ y S476I^{89,92,93}), 9 (dup501-502⁹⁴, Y503_F504InsAY⁹⁰ y dup505-508⁸⁹), 10 (V530I⁹⁵), 11 (V559A⁹⁶, V559I⁹⁷, V560G⁹⁸ y D572A⁸⁹), 13 (R634W⁹⁹, K642E⁹⁰ y V654A⁵³) y 18 (M835K¹⁰⁰, E839K¹⁰¹ y S840N¹⁰²). En el exón 17, además de la mutación D816V se han descrito varias mutaciones adicionales como las mutaciones L799F⁶⁶, R815K¹⁰³, insV815_I816²⁹, D816A/Y/I/H/F/T^{101,104-110}, I817V²⁹, R815K¹⁰³, L818E¹¹¹, D820G¹¹¹ y N822K^{67,112,113}. Aunque la gran mayoría de las mutaciones de *KIT* definidas anteriormente corresponden a mutaciones somáticas, en paralelo se han descrito algunas mutaciones germinales localizadas fuera del dominio catalítico de *KIT* en los exones 8 (delD419^{89,91,114,115} y S451C^{91,92}), 9

(dup502-503^{51,89}, K509I^{61,89,116}, F522C⁵², A533D¹¹⁷ y M541L^{117,118}) y 17 (D820I¹¹⁹) y 18 (S849I¹⁰⁰) de *KIT*, con el correspondiente patrón de agregación familiar.

2.3. Naturaleza clonal de los mastocitos en ausencia de mutaciones de *KIT*

En alrededor de 5% de los adultos con mastocitosis y 14% de los niños⁸⁹, no se detectan mutaciones en el gen *KIT*, correspondiendo una importante proporción de estos casos a WDSM y en menor medida, a MCL¹²⁰. Estudios citogenéticos sobre aspirado de MO han demostrado la presencia de alteraciones cromosómicas de naturaleza clonal -e.g. la misma alteración (cromosoma adicional) en 2, o (monosomía) en ≥ 3 células- en el 6% de los pacientes con ISM, 8% de las ASM, 26% de las SM-AHN y 50% de las MCL¹²¹. Más recientemente se ha demostrado también la presencia en pacientes con SM, de mutaciones en genes habitualmente alterados en otras hemopatías malignas como los MDS y las MPN^{43,122,123}. No obstante, como veremos más adelante, con relativa frecuencia estas alteraciones están ausentes en los MC patológicos y afectan a las células hematopoyéticas residuales de otras líneas que coexisten en la muestra, correspondiendo estos casos a formas avanzadas de SM-AHN¹²⁴. Además, en algunas WDSM⁵⁹ y MCAS¹²⁵ se ha podido demostrar la naturaleza clonal de los mastocitos, incluso en ausencia de alteraciones cromosómicas y de mutación en *KIT*, mediante estudios de patrón de inactivación del cromosoma X en mujeres (test HUMARA; abreviado del inglés “*human androgen receptor*”) lo que apoyaría la naturaleza clonal de la enfermedad, incluso en ausencia de mutación de *KIT*, quedando por establecer en estos casos el mecanismo patogénico de la enfermedad¹²⁶.

3. Hematopoyesis clonal

Hoy se sabe que tras el nacimiento, la producción de células sanguíneas humanas se lleva a cabo en MO a partir de un conjunto relativamente amplio de HSC¹²⁷. A lo largo de la vida, las HSC pueden sufrir alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas a una producción anormal o alterada (aumentada o disminuida) de distintas poblaciones de células maduras presentes en sangre u otros tejidos del organismo, y derivadas de esas HSC alteradas, siendo en tal caso portadoras de esas mismas alteraciones genéticas/epigenéticas¹²⁷. La presencia de forma estable a lo largo del tiempo de células

hematopoyéticas de distintas líneas celulares derivadas de HSC de MO, portadoras de alteraciones genéticas/epigenéticas, se conoce comúnmente como hematopoyesis clonal (abreviado CH, del inglés “*clonal hematopoiesis*”) ¹²⁷⁻¹²⁹. Las alteraciones epigenéticas, las mutaciones somáticas o germinales en genes que potencialmente pueden afectar la capacidad de proliferación y auto-renovación celular ^{127,130}, así como la presencia de alteraciones numéricas de cromosomas (e.g. la pérdida del cromosoma Y o la ganancia del cromosoma 8) ^{131,132}, entre otras alteraciones ^{127,133}, se han asociado con la presencia de CH y una alteración de la proliferación y diferenciación de una o más poblaciones distintas de células hematopoyéticas ¹²⁷. Desde el punto de vista epidemiológico, el desarrollo y aparición de CH se ha asociado con el envejecimiento, al detectarse en personas de edad avanzada, en ausencia de una neoplasia establecida ¹³⁴⁻¹³⁸. Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de CH en sujetos aparentemente sanos de la población general se ha asociado con una mayor morbilidad y mortalidad relacionada con el desarrollo de hemopatías malignas, tumores sólidos y enfermedades cardiovasculares ¹³⁵. Dentro de las hemopatías asociadas a CH destacan por su mayor prevalencia, las neoplasias de origen mieloide como los MDS, la AML o la SM, entre otras ¹³⁵.

3.1. Hematopoyesis clonal y edad

La presencia de CH asociada a alteraciones genéticas como las mutaciones en genes considerados iniciadores (o “*drivers*”) de la expansión clonal de células hematopoyéticas ^{127,139}, es excepcional entre individuos jóvenes <40 años de la población general ¹²⁷. Por el contrario, a partir de la quinta década de la vida la prevalencia de CH se incrementa progresivamente de forma significativa ^{140,141}. Esto ha llevado a algunos autores a acuñar el término de CH asociada a la edad (abreviado ARCH, del inglés “*age-related clonal hematopoiesis*”) para definir aquellas expansiones clonales benignas de células HSC asociadas a la presencia de alteraciones genéticas capaces de desestabilizar la hematopoyesis en individuos a priori sanos, sin implicaciones clínicas inmediatas, y cuya incidencia aumenta con la edad ^{123,137}. Curiosamente, se ha observado que gran parte de las mutaciones asociadas a ARCH coinciden (y en gran medida se solapan) con las alteraciones genéticas

que aparecen en algunas hemopatías mieloides como los MDS^{123,134}. Estos hallazgos podrían contribuir a explicar la mayor prevalencia de neoplasias de origen mieloides entre individuos de edad más avanzada. Sin embargo, la prevalencia de enfermedades, como los MDS, entre personas de edad avanzada, es 100 veces inferior a la incidencia de ARCH¹⁴², sugiriendo que la mayoría de los sujetos que presentan ARCH no desarrollarán nunca una hemopatía maligna. Por este motivo, se ha acuñado el término CH de potencial indeterminado (abreviado CHIP, del inglés “*clonal hematopoiesis of indetermined potential*”) para denominar a aquellas situaciones en las que, en ausencia de criterios diagnósticos de una enfermedad hematológica, se observa en SP o MO la presencia de mutaciones somáticas típicas de hemopatías malignas, con una frecuencia alélica $\geq 2\%$ (e.g. mutaciones de los genes *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* o *SF3B1*, entre otros genes)^{123,139} (Tabla 5). Esto es debido a que entre los sujetos con CHIP y una carga alélica células mutadas $\geq 2\%$, la tasa estimada de progresión anual a una neoplasia hematológica, es inferior o igual al 1%/año¹²³.

Tabla 5. Genes mutados en ARCH y codones/regiones más frecuentemente afectados

Gen	Región genética afectada por mutaciones
<i>ASXL1</i>	Todo el gen
<i>BRAF</i>	Codón 600
<i>CALR</i>	Codones 360-380
<i>CBL</i>	Todo el gen
<i>DNMT3A</i>	Todo el gen
<i>EZH2</i>	Todo el gen
<i>FLT3</i>	Codón 835 y exones 9-11
<i>GNAS</i>	Todo el gen
<i>GNB1</i>	Codones 57, 76 y 80
<i>IDH1/2</i>	Codones 132, 140 y 172
<i>JAK2</i>	Codón 617
<i>KIT</i>	Codón 816
<i>K/NRAS</i>	Codones 12, 13 y 61
<i>MPL</i>	Exón 10
<i>MYD88</i>	Codón 265
<i>NOTCH1</i>	Exón 1
<i>NPM1</i>	Codones 288
<i>PPM1D</i>	Todo el gen
<i>PTPN11</i>	Todo el gen
<i>RUNX1</i>	Todo el gen
<i>SETBP1</i>	Codón 870
<i>SF3B1</i>	Codones 625, 666 y 700
<i>SMC1A</i>	Todo el gen
<i>SMC3</i>	Todo el gen
<i>SRSF2</i>	Codón 95
<i>STAG2</i>	Todo el gen
<i>TET2</i>	Todo el gen
<i>TP53</i>	Todo el gen
<i>U2AF1</i>	Codones 34 y 154
<i>WT1</i>	Todo el gen

Adaptado de Shlush et al¹⁴²

3.2. Hematopoyesis clonal y hemopatías malignas

Debido a la asociación existente entre CH y hemopatías malignas, recientemente se ha propuesto identificar dentro de los sujetos que presentan CHIP, aquellos que muestran una CH con potencial oncogénico (abreviado CHOP, del inglés "*clonal hematopoiesis of oncogenic potential*"). Así, se definen como sujetos con CHOP, aquellos individuos que presentan CH asociada a mutaciones somáticas reconocidas como mutaciones capaces de dirigir procesos oncogénicos en enfermedades hematológicas y que se asociarían en principio, con un mayor potencial de progresión y una mayor probabilidad de desarrollar manifestaciones clínicas (e.g. mutaciones o reordenamientos en los genes *BCR-ABL1*, *JAK2 V617F*, *KIT D816V*, *KRAS* y *HRAS*)¹⁴³. En términos generales, estas mutaciones con potencial oncogénico que definen la CHOP podrían dividirse en 3 grupos: i) mutaciones genéticas que alteran la diferenciación y maduración celular sin apenas afectar la proliferación, como la mutación D816V de *KIT*; ii) mutaciones que promueven la supervivencia y proliferación de HSC sin apenas afectar su diferenciación como *BCR-ABL1*; y iii) mutaciones que promueven fundamentalmente la proliferación de HSC, y que solo de forma marginal afectan la diferenciación, como las mutaciones en los genes *RAS*¹⁴⁴.

De forma ocasional, tanto entre individuos con CHIP como en aquellos que presentan CHOP, se detecta la presencia de citopenias y/o rasgos displásicos, sin que ambos lleguen a cumplir criterios diagnósticos suficientes de hemopatía¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. En base a estos hallazgos, recientemente se han definido otras tres categorías diagnósticas para identificar éstas situaciones: i) citopenia idiopática de significado incierto (abreviado ICUS, del inglés "*idiopathic cytopenia of undetermined significance*")¹⁴⁸⁻¹⁵⁰; ii) displasia idiopática de significado incierto (abreviado IDUS, del inglés "*idiopathic dysplasia of undetermined significance*")¹⁴⁸⁻¹⁵¹; y iii) citopenia clonal de significado incierto (abreviado CCUS, del inglés "*clonal cytopenia of undetermined significance*")¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ (Tabla 6)

Tabla 6. Acrónimos establecidos para definir distintos subtipos de la hematopoyesis clonal y enfermedades relacionadas

Acrónimo	Definición
ARCH	Presencia de hematopoyesis clonal benigna (presencia de mutaciones somáticas en SP o MO) cuya incidencia aumenta con la edad. No tiene impacto pronóstico.
CHIP	Hematopoyesis clonal asociada a mutaciones somáticas típicas de neoplasias mieloides con carga alélica $\geq 2\%$ en SP y/o MO de individuos por lo demás sanos.
CHOP	Hematopoyesis clonal provocada por mutaciones “driver” en un contexto clínico asociado a mayor probabilidad de progresión a neoplasias hematológicas.
IDUS	Individuos con rasgos morfológicos displásicos en las células sanguíneas en ausencia de citopenias. Puede ocurrir con o sin hematopoyesis clonal.
ICUS	Pacientes con ≥ 1 citopenia inexplicable que no cumple criterios diagnósticos de MDS o de otra hemopatía. Puede ocurrir con y sin hematopoyesis clonal, aunque en general este término se suele utilizar para designar a citopenias identificadas en ausencia de hematopoyesis clonal.
CCUS	Pacientes con ≥ 1 citopenia inexplicable, que no cumple criterios diagnósticos de MDS o de otra hemopatía, pero que presentan mutaciones somáticas típicas de neoplasias mieloides con una carga alélica $\geq 2\%$ en SP y/o en MO. Se considera como un estadio intermedio entre CHIP e ICUS.

Adaptado de Bejar et al ¹²³

3.3. Hematopoyesis clonal y SM

La SM es una enfermedad clonal de la HSC caracterizada por la expansión y acumulación de MC patológicos de naturaleza clonal, que habitualmente (~95%) presentan la mutación D816V u otras mutaciones de *KIT*^{22,152,153}. Al tratarse de una neoplasia que afecta a la HSC, la mutación de *KIT* puede encontrarse, además de en los MC patológicos (e.g. CD25⁺ y/o CD2⁺) y las células CD34⁺ de MO, en otras células hematopoyéticas mieloides y/o linfoides -afectación multilineal mieloide (MM) o mieloide y linfoide (MML) de *KIT*⁻, siendo además frecuente en estos últimos casos, la presencia de la mutación D816V en células mesenquimales^{41,154,155}. En términos generales, la presencia de afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación de *KIT* es un hallazgo típico de la ASM y la SSM²⁹,

estando presente en cerca de un tercio de las ISM y <10% de las BMM²⁹, grupos en los que confiere un peor pronóstico y mayor probabilidad de progresión²⁸.

4. Factores pronósticos y estratificación de riesgo en pacientes con SM

La clasificación de la OMS de 2016 constituye una herramienta clave a la hora de definir los distintos subgrupos diagnósticos de mastocitosis en general y de SM en particular⁶; además, permite estratificar a los pacientes diagnosticados de SM de acuerdo con su pronóstico en dos grandes grupos: formas no-avanzadas y avanzadas de mastocitosis^{156,157}. Sin embargo, cada uno de estos subgrupos de pacientes sigue siendo clínicamente muy heterogéneo, con importantes diferencias en el pronóstico de los distintos pacientes incluidos en ellos, incluso cuando se consideran de forma individualizada cada uno de los distintos subtipos diagnósticos OMS²⁴. Por todo ello, en la última década se ha buscado identificar parámetros clínicos, de laboratorio y genéticos que pudieran ayudar a una estratificación pronóstica más precisa de la SM y sus diferentes subtipos diagnósticos.

4.1. Factores pronósticos

Actualmente se ha identificado un número importante de características demográficas, clínicas, hematológicas, séricas y genéticas, que se asocian con el comportamiento evolutivo de pacientes con SM. En este apartado resumiremos aquellas características de la enfermedad que se han asociado de forma recurrente con el pronóstico de los pacientes con SM.

4.1.1. Parámetros demográficos (edad y sexo)

En términos generales, la SM es una enfermedad que afecta preferentemente a adultos con una prevalencia global similar en ambos sexos. Sin embargo, desde el punto de vista pronóstico tanto el sexo masculino como una edad más avanzada, se han asociado a una mayor prevalencia de formas avanzadas de SM (AdvSM) y por consiguiente, con un pronóstico más adverso y una OS

significativamente más corta¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Sin embargo, en la BMM asociada a anafilaxia por picadura de himenóptero, en ausencia de lesiones cutáneas, existe también un predominio del sexo masculino (78%), presentando habitualmente estos pacientes una baja carga mastocitaria y mutación de *KIT* restringida a MC, asociados a buen pronóstico^{7,158}. Por el contrario, se observa una mayor incidencia de WDSM en mujeres, dependiendo el pronóstico de esta variante de SM, más que del sexo en sí, del subtipo diagnóstico concreto de SM subyacente^{12,59}.

Tener una edad avanzada (≥ 60 años) en el momento del diagnóstico de SM se ha asociado también en varios estudios a un pronóstico más adverso, tanto en lo que se refiere a la probabilidad de la progresión de ISM a formas más avanzadas de la enfermedad, como a la OS de los pacientes, independientemente de otras variables clínicas y biológicas^{28,156,157,159}. La reducción de la OS a medida que avanza la edad podría estar relacionada con la menor esperanza de vida asociada al envejecimiento¹⁵⁷. Sin embargo, se ha observado una mayor probabilidad de progresión a AdvSM entre pacientes con ISM de edad más avanzada, lo cual se cree puede ser debido a la existencia de un mayor grado de afectación de la hematopoyesis con la edad, capaz de facilitar y/o provocar la acumulación de alteraciones genéticas que finalmente conducen a una mayor tasa de progresión a formas más avanzadas de SM y una menor OS^{139,157}.

4.1.2. Carga mastocitaria e infiltración tisular

La masa tumoral que presentan los pacientes con SM al diagnóstico es muy variable, oscilando tanto a nivel de la piel (presencia/ausencia, número, tipo y extensión de lesiones cutáneas por infiltración por MC patológicos), como de MO (% de MC patológicos) y otros tejidos como el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y el tracto gastrointestinal⁵. Así, a nivel cutáneo los pacientes con SM pueden presentar o no lesiones en la piel y estas lesiones pueden asociarse tanto a síntomas leves relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios, como con cuadros severos de hipotensión en los que la vida del paciente corre riesgo (e.g. anafilaxia); asimismo, las lesiones cutáneas pueden mostrar un tamaño y aspecto muy variables^{18,160}. En términos generales, la presencia de lesiones

cutáneas extensas, junto a niveles más elevados de sBT, conforman los factores de riesgo más importantes para la aparición de episodios de anafilaxia en niños^{15,160}. Por el contrario, entre los adultos, la ocurrencia de anafilaxia se observa fundamentalmente en pacientes que carecen de lesiones cutáneas, constituyendo uno de los motivos de consulta más habituales en la BMM¹⁵⁸, aunque afecta también a cerca de una cuarta parte de todos los pacientes con ISM que presentan lesión cutánea¹⁶⁰⁻¹⁶³. Por otro lado, la ausencia (o disminución) de las lesiones cutáneas se ha asociado también a AdvSM y/o a progresión de ISM a ASM o MCL^{12,22}, constituyendo la presencia de lesiones cutáneas en pacientes con AdvSM un factor pronóstico favorable para OS, independientemente de otros parámetros de riesgo¹⁵⁷.

La infiltración tumoral de órganos como el bazo, el hígado y los ganglios linfáticos se ve reflejada en organomegalias (esplenomegalia, hepatomegalia y adenopatías, respectivamente) que suele ir asociadas a SSM y AdvSM (hallazgo de tipo B) con las implicaciones pronósticas que esto supone^{22,164}. Además, la infiltración mastocitaria puede inducir el deterioro funcional de estos órganos reflejado en hiperesplenismo, disfunción hepática con hipertensión portal, ascitis, hipoalbuminemia y/o pérdida de peso^{165,166}, constituyendo esta afectación (hallazgo de tipo C) un criterio diagnóstico de AdvSM¹³. Por otra parte, la presencia de esplenomegalia se ha descrito en una serie corta de pacientes con formas no avanzadas de SM (abreviado NonAdvSM, del inglés: “*non-advanced systemic mastocytosis*”) y AdvSM, como un parámetro con valor pronóstico independiente para predecir la OS¹⁶⁷. Sin embargo, estos resultados no han podido ser validados en estudios realizados sobre series más amplias de pacientes, en los que se han analizado de manera simultánea un mayor número de parámetros, de entre los que se han seleccionado factores pronósticos independientes que no incluían la esplenomegalia en el análisis multivariante^{156,157}.

Además, en la clasificación actual de SM de la OMS^{5,168}, el grado de infiltración de MO, reflejado en el número relativo de MC patológicos presentes en la misma, constituye un criterio diagnóstico de ASM y MCL. Típicamente, el porcentaje de MC en MO de pacientes con SM es superior al observado

en MO normal de individuos sanos, independientemente de que se trate de formas NonAdvSM o AdvSM¹³. No obstante, en general los pacientes con NonAdvSM se caracterizan por tener una baja masa tumoral que infiltra de manera moderada la MO²⁵, constituyendo la presencia de >30% de MC en la biopsia medular el hallazgo de tipo B más característico de SSM. Por el contrario, los pacientes diagnosticados de AdvSM se caracterizan por presentar mayor infiltración medular⁴⁹. Así, la MCL presenta de forma sistemática >20% de MC en el aspirado de MO, mientras que en función del porcentaje de MC en MO, la ASM se subdivide en ASM típica (<5%) y ASM-t (5-19%)⁵.

Precisamente la infiltración de MO por MC tumorales puede conllevar un déficit en la producción de otras células hematopoyéticas, reflejándose esta alteración funcional de la MO en citopenias periféricas típicas de las AdvSM. Según la clasificación OMS de 2016¹² la presencia de citopenias periféricas (niveles de hemoglobina ≤ 100 g/L y/o neutrófilos $\leq 1.0 \times 10^9$ /L y/o plaquetas $\leq 100 \times 10^9$ /L) constituye un hallazgo de tipo C y por tanto un criterio diagnóstico de AdvSM. Además de su papel en la clasificación de la SM, en los últimos años se ha demostrado el valor pronóstico independiente de las cifras de hemoglobina y plaquetas en SP al diagnóstico^{156,157,159}. Por ello, ambos parámetros se han incorporado como variables pronósticas útiles para la estratificación de riesgo (de progresión y/o muerte) en algunas de las clasificaciones pronósticas propuestas recientemente^{156,157,159}. Así, para este fin se consideran niveles de hemoglobina ≤ 110 g/L o ≤ 100 g/L, y cifras de plaquetas $\leq 150 \times 10^9$ /L o $\leq 100 \times 10^9$ /L, como parámetros que proporcionan información pronóstica independiente relevante tanto en la SSM como entre pacientes con AdvSM^{156,157,159}.

4.1.3. Parámetros séricos

En la actualidad disponemos de varios marcadores séricos cuyos niveles se han asociados con el pronóstico de la SM. De ellos merece destacar los niveles de albumina, lactato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, triptasa y β 2-microglobulina.

4.1.3.1. Albumina

La albumina es la proteína más abundante del plasma¹⁶⁹. Se sintetiza en el hígado y tiene como función primordial el mantenimiento de la presión osmótica a nivel intravascular, para una correcta distribución de líquidos corporales, y el transporte de distintas moléculas (e.g. hormonas, sales y bilirrubina no conjugada, entre otras)^{170,171}. La disminución de los niveles de albumina en plasma (o hipoalbuminemia), se asocian con distintas situaciones clínicas, como enfermedad (e.g. insuficiencia) hepática, síndrome nefrótico, quemaduras y/o malabsorción a nivel del tracto digestivo¹⁶⁹. Por el contrario, el incremento de los niveles plasmáticos de albumina (o hiperalbuminemia) se asocia a deshidratación o a la administración de algunos fármacos, entre otras situaciones¹⁷². En la SM avanzada pueden observarse con relativa frecuencia niveles de albumina <3,5 g/L, lo que habitualmente se asocia a malabsorción y/o a ascitis, considerándose la hipoalbuminemia un hallazgo de tipo C para el diagnóstico de AdvSM⁶. Aunque, en un estudio reciente realizado en formas AdvSM la hipoalbuminemia demostró tener impacto pronóstico al condicionar una menor OS de los pacientes¹⁵⁶, hasta la fecha no se ha podido confirmar el valor predictivo independiente de este parámetro¹⁵⁶.

4.1.3.2. Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima implicada en procesos de reducción-oxidación presente en la práctica totalidad de los seres vivos, en los que cataliza la transformación de piruvato a lactato. Ante cualquier lesión tisular, esta enzima se libera a sangre, por lo que un aumento de los niveles séricos de LDH constituyen en general, un indicador de daño tisular y destrucción celular¹⁷³. Así, a modo de ejemplo, los niveles séricos de LDH constituyen un marcador muy útil para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con infarto agudo de miocardio¹⁷⁴ y/o como marcador de hemólisis en pacientes con anemia hemolítica, además de un factor pronóstico en algunas hemopatías malignas^{175,176}. En el ámbito de la SM, niveles séricos elevados de LDH se han asociado con mayor daño

tisular y AdvSM, y dentro de estas de forma especial con SM-AHN y MCL¹. De hecho, los niveles séricos de LDH constituyen uno de los primeros parámetros pronósticos independientes identificados en una serie relativamente limitada de pacientes con SM (n=46)¹⁷⁷. Sin embargo, estudios recientes realizados sobre cohortes más amplias de pacientes con SM no han podido confirmar el valor pronóstico independiente de los niveles séricos de LDH, ni a la hora de predecir la progresión de la enfermedad, ni la OS de estos pacientes^{24,28,157}.

4.1.3.3. Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina sérica (abreviado SAP, del inglés "*serum alkaline phosphatase*") es una enzima de tipo hidrolasa cuya función principal está relacionada con la eliminación de grupos fosfato de compuestos fosforilados. En términos generales, esta enzima está presente en la mayor parte de tejidos del organismo, aunque es más abundante en el hueso, el hígado, la placenta, el intestino y el riñón. Su concentración en suero se incrementa con el daño tisular, constituyendo un marcador diagnóstico de enfermedades óseas y hepáticas, entre otras^{178,179}. En la SM, los niveles elevados de SAP se han asociado con un pronóstico adverso, tanto en ISM como en AdvSM^{28,167,180}. Desde el punto de vista patogénico, se ha sugerido que los niveles de SAP en pacientes con SM podrían reflejar afectación funcional del hígado, y en menor medida del hueso, incluso en ausencia de sintomatología clínica¹⁵⁷. Aunque existen algunas discrepancias en relación con el valor pronóstico independiente de la determinación de niveles elevados de SAP entre diferentes series de pacientes con AdvSM^{156,157,159}, atribuidos a las posibles fluctuaciones de los niveles séricos de esta enzima dependientes del estado clínico concreto de cada paciente^{157,167}, actualmente se considera que los niveles de SAP constituyen un marcador pronóstico robusto y que cualquier elevación de SAP en pacientes con SM debe ser analizada con precaución por sus posibles implicaciones pronósticas¹⁵⁷.

4.1.3.4. Triptasa

La triptasa es la proteasa más abundante en el interior de los gránulos de los MCs. Entre sus funciones principales se incluye la participación en el reclutamiento de células del sistema inmune, la inducción de angiogénesis, la degradación de neuropéptidos, la contracción del músculo liso y la activación de (pro)colagenasa, además de llevar a cabo una función de protección frente a procesos inflamatorios¹⁸¹⁻¹⁹². Una vez secretada, la triptasa es una proteína relativamente estable, de forma que una vez liberada por el MC, su degradación no ocurre hasta varias horas después. Esto convierte la triptasa sérica en un biomarcador excelente a la hora de evaluar la masa y actividad secretora de los MC en el organismo. En suero, existen dos isoformas de triptasa: la α -triptasa y la β -triptasa. La α -triptasa es una forma enzimáticamente inactiva cuyos niveles reflejan de forma fidedigna la masa mastocitaria, dado que se libera de forma espontánea por los MC (normales y patológicos)¹⁹³⁻¹⁹⁵. Por el contrario, la β -triptasa se libera de forma específica durante la degranulación del MC tras su activación, incrementándose sus niveles séricos de forma característica durante las reacciones anafilácticas^{181,196}. Aunque los granulocitos basófilos también producen triptasa, apenas contribuyen al conjunto total de los niveles de sBT¹⁹⁷. Por todo ello, los niveles séricos (elevados) de sBT que se observan en pacientes con SM reflejan de forma casi fidedigna el incremento de la masa de MC tumorales, con importantes implicaciones diagnósticas y pronósticas. Así, la presencia de niveles séricos de triptasa basal $>20\text{ng/mL}$ constituyen uno de los 4 criterios menores propuestos por la OMS para el diagnóstico de SM⁶, mientras que cuando los niveles de sBT superan los 200ng/mL (asociados a una infiltración por MC en la biopsia de MO $>30\%$ por inmunohistoquímica), constituyen uno de los hallazgos B empleados para el diagnóstico de SSM¹³. Desde el punto de vista pronóstico, en los últimos años se ha descrito que la presencia de niveles elevados de sBT ($\geq 125\text{ng/mL}$) constituyen un factor pronóstico adverso e independiente, a la hora de predecir la evolución de pacientes con SM, asociándose tanto a una mayor probabilidad de progresión a formas más graves de la enfermedad, como a una OS significativamente más corta¹⁵⁷.

4.1.3.5. β 2-microglobulina

La proteína β 2-microglobulina (β 2M) es un componente del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I que se encuentra presente en prácticamente todas las células nucleadas de nuestro organismo^{198,199}. En la actualidad, la evaluación de los niveles séricos de β 2M forma parte de los análisis de rutina en pacientes con enfermedades hematológicas como el mieloma múltiple y los linfomas no-Hodgkin (NHL) entre otras hemopatías, ya que niveles elevados de la misma se han asociado a mal pronóstico²⁰⁰⁻²⁰³. Aunque sigue sin conocerse el significado exacto de la elevación de los niveles séricos de β 2M, algunos estudios han demostrado un aumento en los niveles de β 2M durante la respuesta inmune y en situaciones asociadas a mayor proliferación celular²⁰⁴. En el único estudio en el que hasta la fecha se ha evaluado el impacto de la β 2M sobre una cohorte de pacientes con ISM y un seguimiento relativamente prolongado, los niveles séricos elevados de β 2M ($\geq 2,5\text{ng}/\mu\text{L}$) se han asociado con un mayor riesgo de progresión a formas más avanzadas de la enfermedad, constituyendo el parámetro individual (independiente) de mayor valor predictivo²⁸. Sin embargo, carecemos de estudios posteriores en los que se hayan confirmado estos hallazgos en ISM y/o se haya extendido su análisis a otras formas de SM (e.g. AdvSM).

4.2. Alteraciones genéticas asociadas a SM

En la actualidad la mastocitosis se define como una enfermedad clonal de la célula stem hematopoyética asociada en >90% de los casos a una mutación somática de *KIT*, y en particular a la mutación D816V de *KIT*, que puede ser detectable solo en los MC de piel y MO y en precursores hematopoyéticos CD34+ (mutación de *KIT* restringida a MC) o también en células hematopoyéticas de otras líneas mieloides y linfoides, además de las células mesenquimales (mutación multilineal de *KIT*), con importantes implicaciones pronósticas^{29,155}. Más recientemente se ha descrito en pacientes con AdvSM la presencia en frecuencias relativamente elevadas de mutaciones característicamente asociadas a otras hemopatías malignas mieloides, algunas de las cuales se han asociado con un

pronóstico adverso de la enfermedad^{43,46,205}. En este capítulo de la introducción de la tesis revisaremos de forma específica las alteraciones genéticas que se han descrito como asociadas a SM, y su utilidad como marcador pronóstico.

4.2.1. Mutación multilineal y carga alélica de *KIT*

La mutación D816V de *KIT* es la alteración genética más prevalente en la SM, estando presente en la práctica totalidad ($\geq 90\%$) de los pacientes adultos y cerca de dos terceras partes de los niños, considerándose como la alteración genética característica de esta enfermedad^{29,80}. Estudios previos han demostrado que en más de un tercio de los pacientes con NonAdvSM, y en la práctica totalidad de las ASM, la mutación D816V afecta, además de a los MC patológicos, a otras células mieloides (e.g. neutrófilos, monocitos y/o eosinófilos) y/o linfoides (e.g. linfocitos T y B), hallazgo que refleja una afectación clonal multilineal mieloides (MM) o mieloides y linfoides (MML) de la hematopoyesis, resultado de la expansión y diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas mutadas a distintas líneas celulares mieloides y/o linfoides, además del MC^{23,28}. Estudios más recientes han confirmado la presencia de afectación multilineal de la hematopoyesis en una pequeña proporción de la BMM, en cerca del 30% de los pacientes con ISM, y en la práctica totalidad de las ASM; además, se ha descrito la presencia de mutación multilineal de *KIT* en una proporción variable de las SM-AHN, dependiendo del tipo de hemopatía mieloides asociada a la mastocitosis⁹. Así, mientras que se ha observado presencia de mutación MM/MML en células de la AHN de 89% de pacientes diagnosticados de SM-CMML, solo el 20% de los pacientes con SM-MPN y el 30% de las SM-AML mostraban mutación multilineal de *KIT*, estando este hallazgo ausente en la práctica totalidad de los pacientes con SM asociada a neoplasias linfoides⁴¹.

Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de mutación multilineal de *KIT* en pacientes con ISM se ha asociado a una mayor tasa de progresión de la enfermedad a subtipos más avanzados de SM como SSM y AdvSM²⁸, constituyendo en este momento este parámetro, junto los niveles séricos de $\beta 2M$, la mejor combinación de factores pronósticos independientes a la hora de predecir progresión

de la enfermedad²⁸. No obstante, la necesidad de purificar células de MO de distintas líneas mieloides y linfoides ha limitado un uso extendido de la mutación multilínea como factor predictivo de progresión en la ISM^{156,157,159}. Como consecuencia de estas limitaciones técnicas, más recientemente se ha descrito la existencia de una estrecha relación entre la presencia de mutación multilínea de *KIT* y la cantidad de células portadoras de la mutación de *KIT* en SP y/o MO (carga alélica)⁹ evaluada mediante técnicas moleculares cuantitativas de elevada sensibilidad^{10,206}. En este sentido, una carga alélica $\geq 2\%$ para la mutación D816V de *KIT* en MO podría identificar también aquellos pacientes con SM portadores de mutación multilínea y que dentro de las ISM tienen una esperanza de vida significativamente acortada²⁰⁷.

4.2.2. Mutaciones en otros genes diferentes de *KIT*

Actualmente se conoce que la adquisición de mutaciones genéticas (como la mutación D816V de *KIT*) en una célula HSC sería responsable del desarrollo progresivo de una hematopoyesis clonal cuya extensión depende del número de células HSC afectadas y de su capacidad de diferenciación a las distintas líneas hematopoyéticas, incluidos los MC y otras células mieloides y linfoides^{29,155}. La ventaja proliferativa de las células mutadas, unida a la activación de las rutas moleculares de señalización relacionadas con las correspondientes mutaciones, además de tener un impacto en la activación/represión de mecanismos de proliferación y/o supervivencia celular, podrían facilitar la acumulación de alteraciones genéticas adicionales implicadas en la progresión a formas más avanzadas de enfermedad.

En la SM las mutaciones del gen *KIT* y de forma especial la mutación D816V de *KIT*, se considera constituyen la lesión genética inicial de la enfermedad, sin que hasta la fecha se hayan podido identificar de forma definitiva cuáles son los factores que intervienen en la progresión de formas indolentes a AdvSM^{208,209}. No obstante, recientemente se ha propuesto que determinados patrones de metilación del DNA podrían tener relevancia en la patogénesis de enfermedades sistémicas asociadas a la activación del MC²¹⁰. En este sentido, en las últimas décadas se han identificado un

número importante de mutaciones puntuales en un amplio abanico de genes que codifican proteínas implicadas en mecanismos de regulación epigenética y que al menos en parte, se han asociado a la patogénesis, el comportamiento clínico y evolutivo de distintas hemopatías mieloides, incluida la SM^{211,212}. Así, en torno al 30-40% de las formas avanzadas de SM presentan ya al diagnóstico una hemopatía mieloide asociada a la mastocitosis²², lo cual sugiere la existencia de una estrecha relación entre ambas neoplasias. De acuerdo con esta hipótesis, estudios relativamente recientes basados en técnicas de secuenciación masiva de última generación (abreviado NGS, del inglés “*next generation sequencing*”) han confirmado la presencia de mutaciones que afectan de forma recurrente a genes asociados al procesamiento post-transcripcional del ARNm, a modificaciones epigenéticas del ADN y a factores de transcripción y transducción de señales, compartidas entre SM y otras hemopatías malignas mieloides^{43-46,213}. En concreto, se ha descrito la presencia de mutaciones adicionales a la mutación D816V de *KIT* en un número significativo de genes de los que merece destacar entre otros, los genes *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *NRAS*, *RUNX1*, *SRSF2* y *TET2*^{42-45,120,156,167,213-215}. Por el contrario, datos muy preliminares basados en pequeñas series de pacientes con ISM sugieren que éste sería un hallazgo relativamente infrecuente en las NonAdvSM^{42,43,45,213,214}. Desde el punto de vista ontogénico, análisis preliminares basados en el estudio *in vitro* de células formadoras de colonias granulo-monocíticas provenientes de pacientes con SM-AHN, sugieren la posible aparición de mutaciones somáticas en *TET2*, *ASXL1* y *SRSF2* con anterioridad a la mutación D816V de *KIT* en estos pacientes¹²⁴.

A continuación, revisaremos el papel de los genes implicados en el procesamiento de ARNm y la modificación epigenética del ADN, además de los factores de transcripción asociados a vías de señalización, que con mayor frecuencia se encuentran mutados en pacientes con SM.

4.2.2.1. Mutaciones en genes implicados en el procesamiento alternativo del ARNm

La presencia de mutaciones en genes asociadas al complejo proteico (también conocido como espliceosoma) encargado del procesamiento alternativo del ARN se han relacionado con distintos tipos

de neoplasias hematopoyéticas (e.g. CMML o MDS) y con algunos tumores sólidos (e.g. melanoma ocular uveal o la fibrosis pulmonar)^{216,217}. De entre estos genes, en la SM destacan por su frecuencia e impacto pronóstico, las mutaciones del gen *SRSF2*^{46,167}.

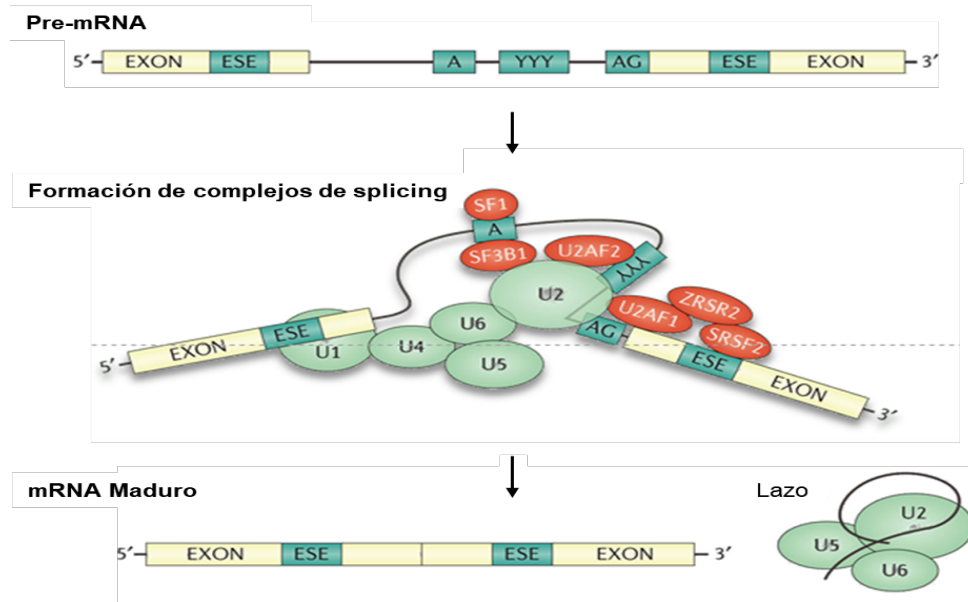


Figura 3. Esquema ilustrativo de los genes implicados en el procesamiento de ARNm a nivel post-transcripcional y su función. Las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (abreviado snRNP, del inglés “*small nuclear ribonucleoproteins*”) U1, U2, U3, U4, U5 y U6 se unen en el ARNm, al lugar de empalme por el extremo 5’, mientras que las proteínas de los genes *SRSF2*, *SF1*, *UZAF1* y *ZRSR2* se unen por el extremo 3’ formando el complejo de *splicing*. U2 sustituye a SF1 y se une al complejo A facilitando la unión de U4/U6-5 a los snRNP, y con ello la unión de los dos exones y la escisión del lazo intrónico.

Adaptado de Sperling et al²¹⁸

4.2.2.1.1 Mutaciones del gen *SRSF2* asociadas a SM

El gen *SRSF2* (abreviado del inglés “*Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2*”) está localizado en el cromosoma 17 y codifica para una proteína fundamental en el procesamiento alternativo del ARNm a nivel post-transcripcional²¹⁹ (Figura 3). Además, se cree que el gen *SRSF2* actúa también como un importante regulador de la estabilidad del ADN, siendo una pieza clave en el entramado de acetilación/fosforilación del ADN²²⁰. Las mutaciones somáticas de *SRSF2* más frecuentemente encontradas en pacientes con SM se sitúan en el codón 95, habiéndose descrito de manera infrecuente inserciones, deleciones y duplicaciones en codones contiguos al codón 95 (codones 94, 102 o 107 y 86, respectivamente)²²¹. Dentro de las hemopatías mieloides, las mutaciones en *SRSF2* son especialmente frecuentes (28%-30%) en pacientes con CMML²²², aunque este gen también aparece mutado con

menor frecuencia en otras hemopatías como los MDS (11%) (a excepción de la variante de MDS con sideroblastos en anillo) y la leucemia mieloblástica aguda (6%)²²²⁻²²⁴. Estudios recientes en pacientes con SM muestran la presencia de mutaciones en *SRSF2* en un porcentaje variable de casos que oscila entre 0,6%²¹⁴ y 6%⁴⁶ de los pacientes, a cerca de un tercio de los mismos (24%⁴⁵, 26%²¹⁵, 31%⁴³ y 36%¹²⁰), siendo uno de los genes más frecuentemente mutados en SM, especialmente en AdvSM y dentro de estas, en la SM-AHN^{42,43,45,46,120,214,215}. Al contrario de lo que ocurre en otras hemopatías^{221,223,225,226}, en la SM la presencia de mutaciones en el gen *SRSF2* se ha asociado de forma sistemática con un pronóstico adverso, incluso cuando se consideran de forma exclusiva los pacientes con AdvSM^{46,120,215}.

4.2.2.2. Mutaciones que afectan a genes implicados en mecanismos de regulación epigenética

En las últimas décadas se ha avanzado de forma significativa en el conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético y sus alteraciones en cáncer, incluidas las hemopatías malignas. Aunque el papel concreto de cada alteración epigenética detectada en pacientes con SM sigue siendo desconocido^{227,228} (Figura 4); en estos paciente se han identificado alteraciones recurrentes que afectan a genes implicados en modificaciones epigenéticas, destacando por su frecuencia las mutaciones en los genes *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2* y *TET2*, que abordaremos en más detalle a continuación.

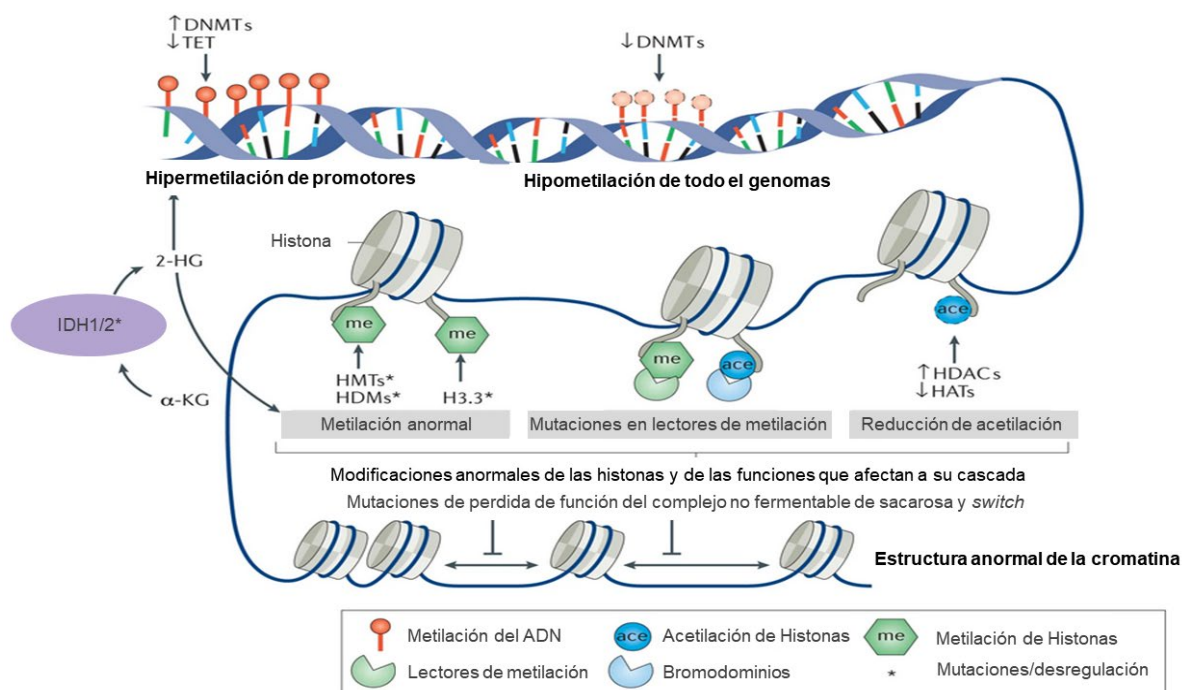


Figura 4. Representación gráfica de los genes implicados en mecanismos de regulación epigenética y su función. Las mutaciones en genes que codifican la actividad de regulación epigenética se pueden agrupar en 4 fenotipos: i) hipermetilación del promotor que puede ser provocada por la sobreexpresión de las ADN metiltransferasas (DNMTs) o pérdida de función en las ADN dimetilinas (proteínas TET) y que genera una supresión selectiva de la expresión del gen; ii) hipometilación del genoma, causado por mutaciones con pérdida de función en las proteínas DNMT y que produce inestabilidad genómica; iii) reducción de la acetilación de las histonas provocada por un aumento de la expresión de las deacetilasas (HDACs) o la pérdida de función de las acetiltransferasas de las histonas (HATs); y iv) un patrón de metilación anormal provocado por mutaciones en genes que regulan las metiltransferasas (HMTs), dimetilinas (HDMs) o la variante H3.3 de las histonas
Adaptado de Pfister et al²²⁹

4.2.2.2.1. Mutaciones en el gen *TET2* y SM

El gen *TET2* (abreviado del inglés “Ten-Eleven Translocation 2”) está localizado en el cromosoma 4 y codifica una proteína que cataliza la conversión en el ADN de 5-metilcitosina (5-mc) a 5-hidroximetilcitosina (5-hmc)²³⁰. Se cree que la 5-hmc puede iniciar la desmetilación del ADN al impedir la unión a las islas CpG de las ADN-metiltransferasas características de estas secuencias²³¹. Hasta la fecha se han descrito mutaciones en todos los exones de *TET2* (n=12), llegando a veces a coexistir en la misma muestra y la misma célula, mutaciones que afectan a ambos alelos del gen²³². Actualmente se considera que la mutación en *TET2* constituye un evento temprano en el desarrollo de neoplasias hematológicas como las MPN, la CMML, los MDS y distintos subtipos de leucemias y

linfomas, además de la SM²³². En términos globales, se han descrito mutaciones en *TET2* en alrededor de 14% de las MPN, 23% de los MDS (en los que suele aparecer conjuntamente con mutaciones en *SF3B1*, *U2AF1*, *ASXL1*, *SRSF2* o *DNMT3A* y cariotipo normal²²⁴) y 30% de las CMML (asociadas con frecuencia a mutaciones en los genes *SRSF2* y *U2AF1*)^{43,122,223,224,233}. Desde el punto de vista clínico, la presencia de mutaciones en *TET2* se ha asociado a una edad más avanzada²³⁴, hepatomegalia y/o ascitis, esplenomegalia, menor densidad ósea y anemia²³⁵, junto a una mayor prevalencia en mujeres frente a hombres⁴⁷. En pacientes con SM, *TET2* constituye tras *KIT*, el gen más frecuentemente mutado oscilando el porcentaje de casos portadores de mutaciones en *TET2* en la bibliografía entre el 13% y 38% de los pacientes^{42-44,46,47,213-215}. Tal como hemos referido anteriormente, las mutaciones en *TET2* presentes en pacientes con SM coexisten con mutaciones en el gen *SRSF2*⁴³. Estudios realizados *in vitro* sugieren que al igual que ocurre con las mutaciones en los genes *ASXL1* y *SRSF2*, las mutaciones en el gen *TET2* podrían preceder a la mutación de *KIT*, al menos en una proporción significativa de pacientes con SM-AHN¹²⁴. Sin embargo, desde el punto de vista pronóstico, aunque la presencia de mutaciones en *TET2* se asocia a AdvSM y a la aparición de hallazgos de tipo C²¹³, no parece que estas mutaciones tengan un impacto pronóstico en la SM^{42,43,46,214,215,234,235}.

4.2.2.2. Mutaciones en el gen *ASXL1* y SM

El gen *ASXL1* (abreviado del inglés “*Additional Sex Combs-Like 1*”) se localiza en el cromosoma 20 y codifica para una proteína que interactúa con el receptor del ácido retinoico involucrado en la remodelación de la cromatina, aunque su función concreta sigue siendo en gran medida desconocida²³⁶. Las mutaciones en *ASXL1* más frecuentemente encontradas en hemopatías mieloides se localizan en el exón 12 de este gen²³⁷, oscilando su incidencia global desde <7% de los pacientes con trombocitopenia esencial (TE) y PV, hasta casi el 40% de las mielofibrosis primarias²³⁸. Asimismo, *ASXL1* constituye el segundo gen más frecuentemente mutado en MDS y CMML, encontrándose alterado en hasta el 30% de las AML^{223,237}. En general, la presencia de mutaciones en *ASXL1* en pacientes con hemopatías mieloides se asocia a niveles más bajos de hemoglobina²³⁹, trombocitopenia²²⁴ y peor

pronóstico^{224,238,240}. En pacientes con SM se ha descrito la existencia de mutaciones en *ASXL1* en una proporción variable de casos que oscila entre 7%¹²⁰ a 12%-15%^{42,215} de los casos, y el 17%^{46,214} a 21%⁴³ de los pacientes, asociándose también su presencia a peor pronóstico^{42,44,46,214}, al igual que lo observado previamente en otras hemopatías mieloides^{224,238,240}.

4.2.2.2.3. Mutaciones en el gen *DNMT3A* y SM

El gen *DNMT3A* (abreviado del inglés “*DNA Methyltransferase 3 Alpha*”) se sitúa en el cromosoma 2 y codifica una enzima encargada de la metilación de las islas CpG (regiones que en media representan alrededor del 40% de la secuencia de ADN de los promotores de los genes), un proceso fundamental en distintas situaciones fisiológicas como durante la embriogénesis y/o la inactivación del cromosoma X²⁴¹. La mutación más frecuentemente descrita en el gen *DNMT3A* ocurre en el codón R882²⁴², estando en conjunto presente en el 8%-13% de los MDS, 26% de las AML secundarias a MDS, y 2% de las CMML^{242,243}. En términos globales, la presencia de mutaciones en *DNMT3A* en pacientes con hemopatías mieloides se ha asociado a un mayor número de blastos en MO y cifras más elevadas de leucocitos en sangre periférica^{223,224}, confiriendo su presencia un pronóstico más adverso^{223,234}. En pacientes con SM, la presencia de mutaciones en *DNMT3A* se ha descrito en un porcentaje de pacientes que oscila entre el 1%²¹⁴ ²¹⁵ y el 12%⁴² de los casos, asociándose también a mal pronóstico⁴².

4.2.2.2.4. Mutaciones en el gen *EZH2* y SM

El gen *EZH2* (abreviado del inglés “*Enhancer of Zeste Homolog 2*”) codifica una proteína del complejo PRC2 involucrada en procesos de proliferación, diferenciación, envejecimiento y mantenimiento de la estructura de la cromatina mediante metilación, actuando a la vez como gen supresor de tumores y oncogen²⁴⁴. El gen *EZH2* se localiza en el cromosoma 7 y se han descrito mutaciones puntuales (y otras alteraciones) de *EZH2* tanto en hemopatías mieloides como linfoides y en tumores sólidos²⁴⁵. Así, se han identificado mutaciones puntuales que afectan al codón 641 de *EZH2*

en el 7% de los linfomas foliculares y el 22% de los linfomas B difusos de células grande de tipo centro-germinal^{246,247}, junto a mutaciones bialélicas, pérdida de heterocigosidad y disomía uniparental²⁴⁷. En paralelo, se ha definido la existencia de sobreexpresión de *EZH2* en algunos tumores sólidos como en el carcinoma de mama, el cáncer de próstata, vejiga, gástrico, pulmonar y hepatocelular, donde las mutaciones de *EZH2* se han asociado de forma recurrente a estadios tumorales más avanzados y enfermedad metastásica²⁴⁵. En hemopatías mieloides, se han descrito mutaciones en *EZH2* en pacientes con PV (3%), mielofibrosis (13%), CMML (6%), AML (6%) y MDS (10%)^{223,234,244,247,248}, asociándose entre estos últimos pacientes a un peor pronóstico^{224,247}. En la SM se ha descrito la presencia de mutaciones en *EZH2* en un pequeño porcentaje de casos que oscila entre el 2%^{214,215} y el 4%^{46,120}-5%⁴³ de los casos. Con relativa frecuencia, la presencia de mutaciones en *EZH2* en SM se asocia a mutaciones en *TET2*²⁴⁷ y niveles significativamente más bajos de hemoglobina (<100g/L)²³⁹.

4.2.2.3. Mutaciones que afectan a factores de transcripción y vías de señalización

El correcto funcionamiento y desarrollo del organismo depende en gran medida de la cantidad producida a nivel celular de determinadas proteínas, en el momento y el contexto adecuados. En términos generales, la expresión génica está regulada en gran medida por factores de transcripción y la activación de procesos implicados en distintas vías de señalización intracelular. En la regulación de los procesos de expresión génica destacan, entre otros, genes como *RUNX1*, *CBL* o *K/NRAS*²⁴⁹, cuyas alteraciones además de haberse asociado a distintas hemopatías malignas, se encuentran presentes también en enfermedades no hematológicas como el síndrome de Waardenburg, la ceguera ligada al cromosoma X o la hipoplasia de la pituitaria anterior^{249,250} (Figura 5). A continuación, revisaremos en más detalle los genes involucrados en la regulación de factores de transcripción y vías de señalización más frecuentemente alterados en la SM.

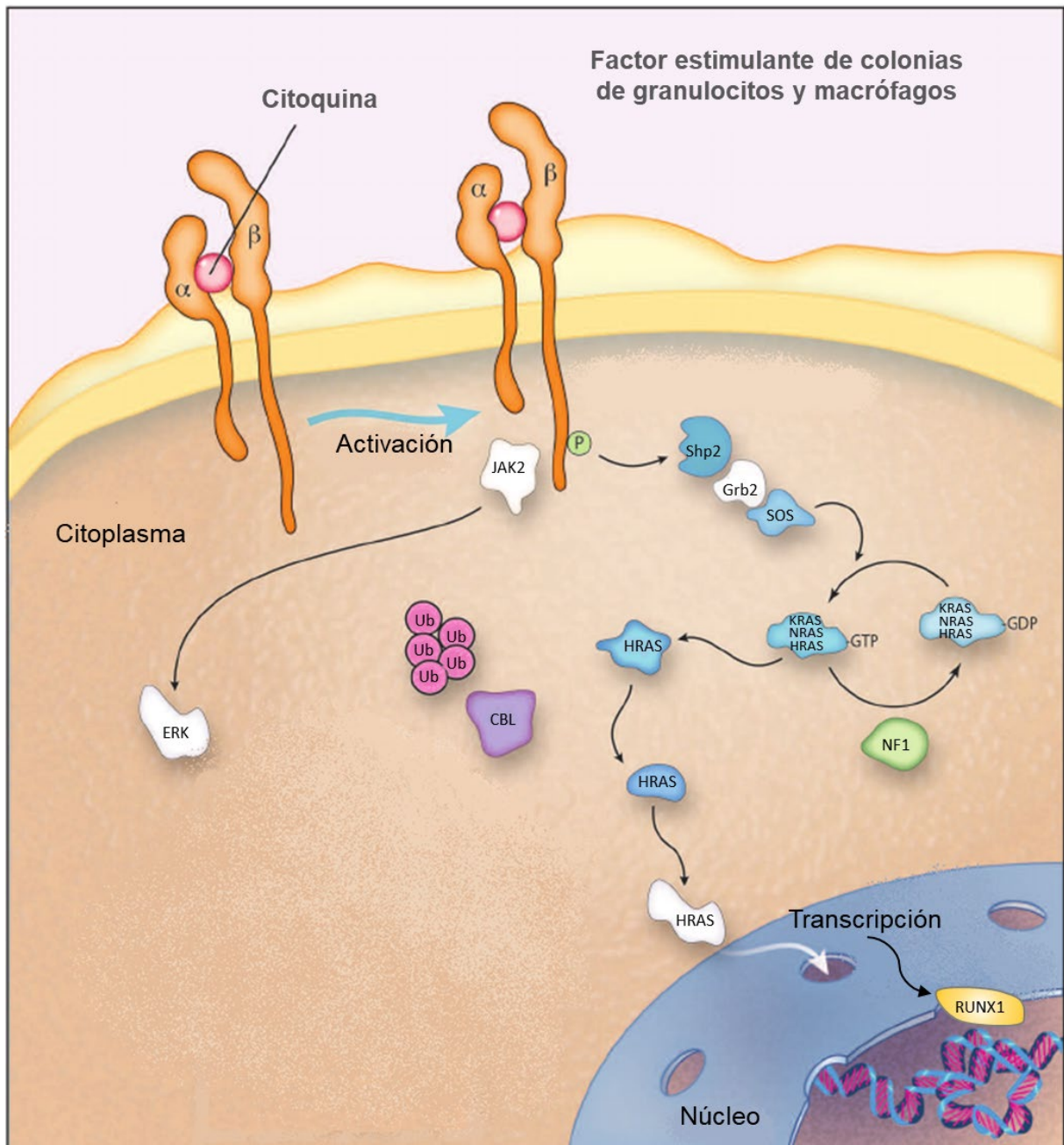


Figura 5. Representación gráfica general de genes implicados en vías de señalización y factores de transcripción más frecuentemente alteradas en SM. En la figura podemos ver como la activación inducida por el factor estimulante de colonias granulo-monocíticas y la activación de sus correspondientes vías de señalización intracelular implican la participación de los genes *RAS* (*KRAS*, *NRAS* o *HRAS*), *CBL* y *JAK-STAT*. Tras la transcripción de la señal al núcleo, las proteínas codificadas por el gen *RUNX1* se encargan de regular la transcripción génica a ARNm.

Adaptado de Stieglitz et al²⁵¹

4.2.2.3.1. Mutaciones en el gen *RUNX1* y SM

El gen *RUNX1* (abreviado del inglés “*Runt-Related Transcription Factor 1*”) también denominado previamente *AML1* (abreviado del inglés “*Acute Myeloid Leukemia 1 Protein*”) constituye

un gen presente en el cromosoma 21 humano que codifica una proteína que funcionalmente actúa como un factor de transcripción implicado en el desarrollo de células HSC²⁵². Las mutaciones más frecuentes de *RUNX1* se localizan en los exones 3, 4 y 8²⁵³ y se han asociado con progresión de MPN a AML²⁵⁴, lo que podría explicar la elevada frecuencia de estas mutaciones (hasta 37%) entre pacientes con AML secundaria^{244,255}. De acuerdo con estos hallazgos, la presencia de mutaciones en *RUNX1* en pacientes con MDS se asocia a resistencia a determinados fármacos quimioterápicos y menor OS^{224,253}. En la SM, se ha descrito una frecuencia muy variable de mutaciones en el gen *RUNX1*^{43,46,214,215,256} que oscila entre el 3% y el 23% de los casos, asociándose además a una peor evolución de la enfermedad^{46,257}

4.2.2.3.2. Mutaciones en el gen *CBL* y SM

El gen *CBL* (abreviado del inglés “*Casitas B-Lineage Lymphoma Proto-Oncogene*”) es un gen situado en el cromosoma 11 que codifica para una proteína implicada en la regulación funcional de receptores con actividad tirosin-kinasa (TK), mediante el bloqueo competitivo de los mismos; además, *CBL* actúa también en la degradación de proteínas mediada por ubiquitinación, a nivel del proteosoma^{244,258}. Globalmente, las mutaciones que afectan al gen *CBL* muestran un predominio de deleciones que involucran al exón 8 del gen, seguidas de mutaciones puntuales en los codones 420 y 371²⁵⁹. Merece destacar que en el 90% de los casos en los que se observa disomía uniparental a nivel del cromosoma 11, se observan mutaciones homocigóticas en *CBL*²⁶⁰. En hemopatías mieloides se han descrito alteraciones en *CBL* en el 15% de los pacientes diagnosticados de leucemia mielo-monocítica juvenil (abreviado JMML, del inglés “*juvenile myelomonocytic leukemia*”), el 13% de las CMML (entre las que predomina la mutación Y371)^{260,261}, 10% de las AML y 8% de las leucemias mieloides crónicas atípicas^{255,261,262}. Desde el punto de vista pronóstico, el impacto de las mutaciones que afectan al gen *CBL* en hemopatías mieloides sigue siendo incierto^{258,261-263}. De forma similar, se han descrito mutaciones de *CBL* en un porcentaje variable de pacientes con SM que oscila según las series publicadas hasta la fecha entre el 3%-4% y el 20,5% de los casos^{43,46,120,214,215}. A diferencia de lo que

ocurre en otras hemopatías, la presencia mutaciones de *CBL* en pacientes con SM se ha asociado a peor pronóstico²⁰⁵.

4.2.2.3.2. Alteraciones en los genes *KRAS* y *NRAS* y SM

Los genes *KRAS* (abreviado del inglés “*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*”) y *NRAS* (abreviado del inglés “*Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*”), ubicados en el cromosoma 12, codifican sendas proteínas implicadas en vías de señalización asociadas a receptores de membrana para factores de crecimiento, mediante su interacción con proteínas de membrana con actividad GTPasa. En general, las mutaciones más comunes en *KRAS* y *NRAS* ocurren en los exones 2, 3 y 4 y 2 y 3, respectivamente, en concreto en los codones 12 y 13 (exón 2) para *KRAS* y 12, 13 (exón 2) y 61 (exón 3) para *NRAS*^{255,264}. Estudios realizados en ratones con formas oncogénicas de *NRAS* han permitido generar modelos animales de CMML, AML y SM *in vivo*²⁶⁵, habiéndose implicado algunas mutaciones en *NRAS* en la transformación maligna y el mantenimiento de estos tumores²⁶⁶. Desde hace tiempo se han descrito mutaciones germinales en ambos genes *RAS* que se asocian al síndrome de Noonan y al síndrome cardiofaciocutáneo^{267,268}. En paralelo se han identificado un gran número de mutaciones somáticas que se han asociado de forma preferente a tumores sólidos, de los que cabe señalar el adenocarcinoma pulmonar, el cáncer de páncreas y el cáncer colorrectal entre otros tumores prevalentes^{269,270}; en algunos de estos tumores, las mutaciones en *RAS* se han asociado además a peor pronóstico (e.g. en pacientes con cáncer colorrectal metastásico)²⁷¹. Asimismo, en hemopatías mieloides, las mutaciones de *NRAS* se han asociado al desarrollo de AML (7%-13%) secundaria a distintas MPN, desconociéndose si estas mutaciones son o no las causantes de la progresión leucémica²⁵⁵. En pacientes con SM, se han descrito mutaciones en *KRAS* y/o *NRAS* en 3%-14% de los casos^{43,120,214,215}, pudiendo tener según algunos autores, un impacto pronóstico adverso en esta enfermedad¹⁵⁹.

4.3. Estratificación pronóstica de pacientes con SM

A pesar de que la clasificación actual de las SM en formas NonAdvSM y AdvSM tiene un importante impacto pronóstico, la evolución clínica de los pacientes incluidos en estos dos grupos es muy heterogénea^{5,22}. Por ello, con el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces a la hora de controlar la enfermedad, en los últimos años se ha acentuado la necesidad de disponer de sistemas de estratificación pronóstica para un mejor manejo clínico y terapéutico de los pacientes con SM, teniendo en cuenta su riesgo de progresión a formas más avanzadas de la enfermedad o su esperanza de vida.

De todo lo expuesto anteriormente en la introducción de este trabajo doctoral se entiende que durante las últimas décadas se han identificado diferentes variables clínicas, biológicas y moleculares que se asocian con la evolución y pronóstico de la SM. Sin embargo, a parte de la clasificación OMS de SM, carecíamos de sistemas de clasificación que mediante la combinación de dichos factores pronósticos permitiesen estratificar de forma más precisa los pacientes con SM según el riesgo de progresar a formas más avanzadas de la enfermedad o de fallecer por causas relacionadas con la misma, facilitando así un manejo clínico y terapéutico más adecuado de cada paciente. Por ello, en los últimos dos años se han propuesto varios modelos de estratificación pronóstica, entre los que se incluyen los sistemas MAPS (abreviado del inglés "*Mutation-Adjusted Prognostic Score*")¹⁵⁹, MARS (abreviado del inglés "*Mutation-Adjusted Risk Score*")¹⁵⁶, CRS (abreviado del inglés "*Clinical-Adjusted Risk Score*")¹⁵⁶ e IPSM (abreviado del inglés "*International Prognostic Scoring System for Mastocytosis*")¹⁵⁷, con sus dos variantes para formas no avanzadas (Non-AdvIPSM) y avanzadas (AdvIPSM) de la enfermedad.

De estos sistemas de clasificación pronóstica, el modelo MAPS desarrollado en la clínica Mayo en EE. UU. fue el primero que vio la luz, estando basado en una cohorte de 150 pacientes en los que se analizaron numerosas variables pronósticas, incluyendo la presencia de mutaciones en genes diferentes de *KIT* en parte de los pacientes¹⁵⁹. Teniendo en cuenta aquellas variables que mostraron

valor pronóstico independiente para OS, se le atribuyó a cada una un peso (puntuación) en función de su cociente de riesgo (abreviado HR, del inglés “*hazard ratio*”). Así, en el sistema MAPS se seleccionaron 5 variables (que se describen a continuación con su respectivo peso) para ser incluidas en el modelo propuesto: i) subtipos diagnósticos OMS de AdvSM, 2 puntos; ii) edad al diagnóstico ≥ 60 años, 1 punto; iii) trombocitopenia con $< 150 \times 10^9$ plaquetas/L, 1 punto; iv) niveles elevados de SAP ≥ 140 UI/L, 1 punto; y, v) presencia de mutaciones en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *NRAS*, 1 punto. Una vez sumada la puntuación obtenida con este sistema para cada paciente, estos se agruparon según su riesgo en i) pacientes de bajo riesgo (≤ 2 puntos), ii) de riesgo intermedio-1 (3 puntos), iii) intermedio-2 (4 puntos), y iv) de alto riesgo (≥ 5 puntos) con medianas de OS para los pacientes con NonAdvSM de 17, 7, 3 y 1 año, respectivamente, y para las AdvSM de OS no alcanzada, y de 7, 3 y 1 año, respectivamente¹⁵⁹.

Casi de forma paralela con la clasificación MAPS, la ECNM (European Competence Network on Mastocytosis) propuso un algoritmo alternativo para la estratificación de riesgo de todas las formas de mastocitosis, incluyendo tanto la CM como la SM, denominado IPSM¹⁵⁷. A diferencia del algoritmo MAPS, la propuesta de la clasificación IPSM se fundamentó en la evaluación del impacto de variables clínicas y biológicas asociadas a mastocitosis, sin incluir las alteraciones genéticas, basándose en una cohorte mucho más amplia de pacientes ($n=1794$). Además, en el modelo IPSM se evaluaron por separado los pacientes diagnosticados con formas NonAdvSM y los pacientes con AdvSM. Del análisis realizado en el primer grupo de pacientes (NonAdvSM) se identificaron como factores pronósticos adversos una edad más avanzada (≥ 60 años) al diagnóstico y la presencia de niveles elevados de SAP (≥ 100 UI/L), atribuyéndose a cada uno de estos dos parámetros un peso similar (1 punto). A su vez, en la AdvSM se identificaron como factores pronósticos adversos con capacidad predictiva independiente la edad al diagnóstico ≥ 60 años (1 punto), la presencia de anemia (< 110 g de hemoglobina/L) (1 punto) y trombocitopenia ($< 100 \times 10^9$ plaquetas/L) (1 punto), junto a leucocitosis $\geq 16 \times 10^9$ leucocitos/L (1 punto) y niveles elevados de sBT (≥ 125 ng/mL) (1 punto). En función de la puntuación alcanzada para cada paciente con ambos sistemas se establecieron hasta cuatro grupos de riesgo. Así, entre los

pacientes diagnosticados de NonAdvSM se agruparon en pacientes de bajo riesgo (0 puntos), riesgo intermedio (1 punto) y alto riesgo (2 puntos) de progresión. Con ello los pacientes con NonAdvSM clasificados en estos tres grupos de riesgo mostraban medianas de supervivencia libre de progresión (abreviado PFS, del inglés “*progression-free survival*”), no alcanzada, no alcanzada y de 14 años, respectivamente. A su vez, los pacientes con AdvSM se agruparon en pacientes de bajo riesgo (0 puntos), riesgo intermedio-1 (1 punto), intermedio-2 (2-3 puntos) y alto riesgo (≥ 4 puntos) con medianas de OS no alcanzada, y de 7, 3 y 1 año, respectivamente¹⁵⁷. Ambos modelos IPSM, se validaron en una cohorte externa de 462 pacientes con mastocitosis, confirmando su utilidad para la estratificación de riesgo tanto de NonAdvSM como AdvSM.

Finalmente, en simultaneo con el modelo IPSM, el grupo alemán de Mannheim desarrollo otros dos sistemas de clasificación pronóstica denominados CRS y MARS, diseñados de forma específica para predecir la evolución de pacientes con AdvSM¹⁵⁶. En el diseño de la clasificación MARS se incluyeron tanto parámetros clínicos y biológicos como datos moleculares, identificando el análisis multivariante cuatro parámetros pronósticos independientes asociados a una OS significativamente reducida: i) edad al diagnóstico ≥ 60 años (1 punto), ii) presencia de anemia con cifras de hemoglobina < 100 g/L (1 punto) y iii) trombocitopenia ($< 100 \times 10^9$ plaquetas/L) (1 punto), junto a iv) la presencia de una (1 punto) o más (2 puntos) mutaciones en los genes *SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1* (genes *S/A/R*)¹⁵⁶. Con el fin de establecer un sistema de estratificación pronóstica de fácil aplicación en la rutina clínica, Jawhar *et al*¹⁵⁶ realizaron un segundo análisis de factores pronósticos en el que excluyeron del modelo los marcadores genéticos. Esto resultó en un segundo modelo de clasificación pronóstica denominado CRS, en el que se incluyeron como factores pronósticos adversos independientes, la edad al diagnóstico ≥ 60 años (1,5 punto), la presencia de anemia (< 100 g de hemoglobina/L) (1 punto), y trombocitopenia ($< 100 \times 10^9$ plaquetas/L) (1 punto), y los niveles elevados de SAP (≥ 140 UI/L) (1 punto)¹⁵⁶. Tanto con el sistema MARS, como con el modelo CRS, los pacientes con AdvSM se clasificaron en tres grupos de riesgo según el peso (puntuación) de cada una de las variables pronósticas. Así, según el sistema MARS quedarían incluidas como AdvSM de bajo riesgo, aquellos

pacientes cuya puntuación no superaba 1 punto (0-1 puntos), como pacientes de riesgo intermedio los que mostraban una puntuación de 2, y como alto riesgo aquellos que presentaban ≥ 3 puntos. A su vez, según el modelo CRS los pacientes con 0-1,5 puntos se clasificaron como pacientes de bajo riesgo, los que sumaban 2-2,5 puntos serían de riesgo intermedio y los que alcanzaban 3-4,5 puntos se incluyeron dentro del grupo de alto riesgo¹⁵⁶ (Tabla 7).

Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, en la actualidad disponemos de varios sistemas de estratificación de riesgo para pacientes con SM. Sin embargo, en el diseño y validación de cada uno de ellos se han incluido grupos de factores pronósticos diferentes, que solo se solapan en parte. Así, mientras algunos sistemas de estratificación incluyen de forma exclusiva parámetros clínicos y de laboratorio de fácil acceso, disponibles en la práctica totalidad de los centros, como los modelos NonAdvSM-IPSM (edad al diagnóstico y SAP), AdvSM-IPSM (edad, recuentos de hemoglobina, plaquetas y leucocitos y niveles de triptasa sérica) y CRS (edad, recuentos de hemoglobina y plaquetas y SAP) (Tabla 7), otros combinan estos parámetros con marcadores moleculares más complejos cuyo análisis y determinación no está disponible en la mayoría de los centros a los que acuden los pacientes con SM (e.g. presencia de mutaciones adicionales a la mutación D816V de *KIT*), como ocurre con el modelo MAPS para AdvSM que junto al subtipo diagnóstico OMS de mastocitosis, la edad, el recuento de plaquetas y los niveles de SAP incluyen la presencia de mutaciones adicionales a *KIT*, y el sistema de estratificación de riesgo MARS en el que se seleccionan como factores pronósticos la edad, las cifras de hemoglobina y el recuento de plaquetas, junto a la presencia de 1 o ≥ 2 mutaciones en los genes *S/A/R* (Tabla 7). Además, algunos de estos sistemas se diseñaron y validaron de forma específica para subgrupos concretos de pacientes con SM (e.g. NonAdvSM o AdvSM), adaptándose a objetivos distintos como predecir la PFS vs OS. Por otra parte, hasta la fecha no se han comparado de forma directa (la utilidad y valor relativo de) cada uno de estos sistemas a la hora de estratificar el riesgo de progresión y/o muerte en una serie amplia de pacientes con SM, con el fin de facilitar la elección del modelo pronóstico más adecuado para su aplicación eficiente en (distintos grupos de) enfermos con SM.

Tabla 7. Variables con impacto pronóstico en la supervivencia libre de progresión y/o la supervivencia global de pacientes con formas no-avanzadas (NonAdvSM) y avanzadas (AdvSM) de mastocitosis incluidos en los modelos de estratificación de riesgo propuestos en los últimos años (2018-2019).

Parámetros	Criterios pronósticos	Modelos pronósticos			
		MAPS (n=150)	IPSM NonAdv Adv (n=1794)	MARS AdvSM (n=231)	CRS
	OMS (AdvSM)	2			
	Edad ≥60	1	1 1	1	1,5
Anemia	≤100 g hemoglobina/L			1	1
	≤110 g hemoglobina/L		1		
Citopenias	<100 x 10 ⁹ plaquetas/L		1	1	1
	<150 x 10 ⁹ plaquetas/L	1			
Leucocitosis	≥16 x10 ⁹ leucocitos/L		1		
Séricos	Triptasa ≥125 ng/mL		1		
	Fosfatasa ≥100 UI/L ≥140 UI/L	1	1		1
Genéticos	Mutaciones adicionales	1		1 (1 mutaciones) 2 (≥2 mutaciones)	
Grupo de Riesgo					
Bajo		≤2	0 0	0-1	0-1,5
intermedio-1		3	1 1	2	2-2,5
intermedio-2		4	- 2-3	-	-
Alto		≥5	2 ≥4	≥3	3-4,5

5. Tratamiento de la SM

Debido a su gran heterogeneidad clínica, la SM requiere de diferente tratamiento y estrategias terapéuticas, en función del subtipo de SM, del estado del paciente al diagnóstico y de su riesgo pronóstico, lo cual apoya la relevancia de la posibilidad de disponer de sistemas fiables y robustos de estratificación de riesgo que ayuden a una mejor toma de decisiones terapéuticas y en general, a un mejor manejo clínico de los pacientes con SM. Globalmente, la mayoría de los pacientes con formas NonAdvSM no sufren un compromiso de su esperanza de vida, aunque con relativa frecuencia, su calidad de vida se ve afectada de forma notable. Por ello, en estos pacientes se suele administrar

tratamiento sintomático basado fundamentalmente en el uso de fármacos que controlen (inhiban o minimicen) los efectos provocados por la liberación de mediadores mastocitarios. Por el contrario, en las formas AdvSM en las que la esperanza de vida de los pacientes está seriamente comprometida, el abordaje terapéutico asienta sobre la administración de fármacos citostáticos y/o citorreductores, que persiguen controlar y reducir la masa tumoral para evitar y/o disminuir la infiltración tisular y la afectación funcional de los tejidos y órganos afectados, reduciendo así el riesgo de muerte y alargando la OS de estos pacientes.

5.1. Tratamiento sintomático

Los síntomas relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios pueden aparecer incluso sin causa aparente en pacientes con NonAdvSM y AdvSM. Hasta la fecha, se han identificado diferentes factores desencadenantes de la liberación de mediadores mastocitarios como el calor, cambios bruscos de temperatura, el roce sobre lesiones cutáneas, determinadas alergias, la ingesta de fármacos y/o las picaduras de insectos, entre otros parámetros. En estos casos deben adoptarse medidas preventivas que eliminen los episodios relacionados con la liberación de estos factores mastocitarios^{17,272-275}. Asimismo, además de tomar las medidas preventivas adecuadas, se recomienda en pacientes sintomáticos, la administración de fármacos capaces de contrarrestar los efectos de la liberación de mediadores por parte de los MC. Entre otros fármacos, en la actualidad se emplean antagonistas de los receptores de la histamina (H1 y H2), los antagonistas de los receptores de leucotrienos, los corticoesteroides y/o en casos con riesgo de reacciones anafilácticas, la adrenalina²⁷⁶⁻²⁷⁹. En paralelo se recomienda la administración de manera rutinaria de estabilizadores de la membrana del MC que evitan o disminuyen su capacidad de degranulación, de las que merece destacar el cromoglicato disódico^{17,280-282}. En aquellos pacientes que presentan síntomas graves de liberación de mediadores que no responden a los tratamientos convencionales anti-inmunoglobulina E, se recomienda la administración de anticuerpos monoclonales como Omalizumab, que han demostrado gran eficacia en el control de los síntomas en estos casos²⁸³⁻²⁸⁷. Asimismo, la administración de fototerapia con radiación UVA1 ha demostrado ser eficaz sobre todo en pacientes con DCM y

sintomatología grave que no responden al tratamiento convencional con antimedidores^{288,289}. Finalmente, en pacientes que presentan mastocitosis asociada a episodios de anafilaxia desencadenados por venenos de insectos en ausencia de lesiones cutáneas, en general se recomienda la administración de inmunoterapia específica de forma indefinida, ya que con esta estrategia cerca del 80% de estos pacientes alcanzan protección frente a nuevas picaduras²⁹⁰⁻²⁹³.

5.2. Tratamiento citorreductor y/o citostático

El tratamiento citorreductor y/o citostático administrado a pacientes con SM tiene como objetivo controlar (y a ser posible reducir) la masa tumoral y evitar el daño funcional en distintos órganos y tejidos como el hígado, bazo, hueso y la MO. Desde el punto de vista clínico, la administración de tratamiento citostático y/o citorreductor se restringe de forma casi exclusiva a pacientes diagnosticados de AdvSM y de SSM, y excepcionalmente a pacientes con ISM sintomáticos⁵. Los fármacos empleados con este objetivo incluyen por orden cronológico el interferón- α (IFN- α), la hidroxiurea y la cladribina (2-CdA), asociados todos ellos a la administración simultánea de corticosteroides²⁴. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos es muy relativa ya que apenas logran prolongar la OS de los pacientes, asociando con frecuencia importantes efectos secundarios que terminan por tener un impacto negativo sobre la calidad de vida de los individuos^{24,294,295}. En la MCL, así como en los casos más graves en los que los fármacos anteriores no son eficaces, puede plantearse el uso de estrategias terapéuticas basadas en poliquimioterapia y/o incluso trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos²⁹⁶.

5.3. Tratamiento dirigido a dianas moleculares

Debido a que el tratamiento con fármacos citorreductores y/o citostáticos convencionales no consigue los efectos deseados a la hora de controlar la enfermedad, desde hace años se ha investigado la posible utilidad del empleo de fármacos alternativos dirigidos frente a dianas moleculares. Dentro de estos fármacos, han adquirido especial relevancia en los últimos años los inhibidores de receptores con actividad tirosin kinasa, y por lo tanto de *KIT*^{58,297,298}. En este sentido, desde hace algún tiempo se

ha investigado el posible beneficio del tratamiento con Imatinib, aunque hoy sabemos que este fármaco solo resulta eficaz en pacientes con SM que presentan mutaciones de *KIT* en las regiones yuxtramembrana o transmembrana de *KIT* o en aquellas en las que no se detectan mutaciones de *KIT*^{299,300}, mientras que los pacientes con mutación D816V de *KIT* u otras mutaciones en el mismo exón 17 de *KIT* son sistemáticamente resistentes a Imatinib^{51,52,58,87,299,300}. De forma similar, el uso de otros inhibidores de tirosinas-kinasas como Nilotinib³⁰¹, Dasatinib^{296,302}, Masatinib^{303,304} o Ripretinib³⁰⁵ ha mostrado respuestas sintomáticas en ausencia de un efecto citorreductor significativo. Por el contrario, la Midostaurina (PKC412), un fármaco capaz de inhibir un espectro relativamente amplio de receptores con actividad tirosina-quinasa como *FLT3*, *KIT*, *KDR*, *PKC* y *PDGFR*, ha demostrado ser eficaz en AdvSM³⁰⁶⁻³⁰⁸ con una alta tasa de respuesta al tratamiento (60%) aunque sin llegar a alcanzar remisiones completas de la enfermedad^{5,306}. Por todo ello, la Midostaurina junto con Imatinib constituyen los dos únicos fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) (NDA: 212608) y/o la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (EU/3/18/2074) para su uso en pacientes con AdvSM²⁹⁸. Más recientemente se han puesto en marcha dos ensayos clínicos (Id: NCT03580655 y NCT02561988) en pacientes con AdvSM en los que se investigan los posibles beneficios de un inhibidor altamente específico de la mutación D816V de *KIT* denominado Avapritinib. Los resultados preliminares de ambos ensayos son muy prometedores, al observarse tasas relativamente elevadas de remisión completa, sobre todo en pacientes con ASM y MCL y en menor medida también, con SM-AHN^{309,310}.

Finalmente, cabe señalar que en los últimos años el desarrollo de paneles de anticuerpos monoclonales y terapias basadas en células CAR-T frente a antígenos de membrana de las células neoplásicas de otras hemopatías malignas, ha abierto también nuevas perspectivas terapéuticas para los pacientes con AdvSM³¹¹. Dentro de este grupo de fármacos se incluyen anticuerpos monoclonales frente a CD13, CD25, CD30, CD33, CD44, CD45 y CD52^{60,312-315}, marcadores presentes también en los MC tumorales de pacientes con SM³¹⁶. Sin embargo, estudios preliminares basados en el uso de anticuerpos anti-CD30 (Brentuximab-Vedotin) para el tratamiento de AdvSM³¹⁷ (Id: NCT01100502) han

mostrado datos desalentadores^{5,318}. Esto contrasta con los efectos beneficiosos referidos en la literatura para casos aislados de pacientes tratados fuera de ensayos clínicos con anticuerpos anti-CD25 (Daclizumab)³¹⁹ y anti-CD33 (Mylotarg)³²⁰.

Hipótesis y objetivos

La SM incluye un grupo heterogéneo de enfermedades clonales adquiridas que afectan a la HSC y que se caracterizan por la acumulación de MC patológicos en múltiples órganos y tejidos, entre los que se incluyen la piel, la MO, el hígado y la mucosa del tracto gastrointestinal^{6,12}. Desde el punto de vista clínico y pronóstico la SM muestra un comportamiento variable, tanto en lo que hace referencia a la forma de presentación y los síntomas al diagnóstico, como en lo que se refiere a la masa tumoral y la evolución de la enfermedad^{12,24}. Así, en la clasificación actual de la OMS de 2016⁶ se identifican cinco variantes de SM que incluyen desde formas indolentes a formas avanzadas de la enfermedad, con una esperanza de vida muy variable^{157,159}. Aunque al diagnóstico las diferencias entre las formas indolentes y las AdvSM son claras⁶, en la actualidad sabemos que la SM constituye una enfermedad dinámica en la que junto a pacientes con ISM en los que la enfermedad permanece estable durante décadas, existen otros pacientes en los que la ISM progresa a formas más avanzadas de la enfermedad^{28,157}, sin que por el momento se conozcan los mecanismos implicados en la transformación maligna.

La mutación D816V del protooncogén *KIT* constituye la alteración genética característica de los pacientes diagnosticados de SM, estando presente en alrededor del 90% de los casos⁷⁶. Aunque se trata de una mutación con potencial oncogénico, el hecho de que esté presente indistintamente en formas NonAdvSM y AdvSM, sugiere que por sí sola esta mutación no podría explicar la existencia de formas indolentes estables de la enfermedad, ni la progresión y transformación maligna observada en una pequeña parte de los casos. Por el contrario, desde hace más de una década se conoce que la afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT* constituye, junto con los niveles séricos de β 2-microglobulina, uno de los factores pronósticos independientes más relevantes a la hora de predecir la progresión de ISM a formas más avanzadas de la enfermedad²⁸. Sin embargo, estudios recientes en modelos murinos han demostrado que la mutación D816V de *KIT*, aunque es capaz de reproducir la sintomatología clínica típica de las formas NonAdvSM, por sí sola no reproduce las formas AdvSM^{213,321}. Estos hallazgos sugieren la necesidad de que ocurran alteraciones adicionales a la mutación de *KIT*, para que dicha transformación maligna tenga lugar, incluyendo alteraciones

genéticas y/o epigenéticas adicionales que afecten a las células tumorales y/o a otras células hematopoyéticas. En este sentido, en la actualidad existen aun pocos estudios^{42,43,91} en los que se haya investigado la presencia de alteraciones genéticas adicionales a la mutación de *KIT* en pacientes con SM, empleando técnicas que proporcionen un barrido amplio del genoma o de todo el exoma, y la posible asociación entre esas mutaciones y las formas AdvSM y/o la progresión desde una ISM a AdvSM. Esto podría ser debido, al menos en parte, a que la mayoría de los estudios genéticos realizados hasta la fecha se han centrado de forma casi exclusiva en pacientes con AdvSM empleando paneles relativamente reducidos de genes, previamente identificados como alterados en otras neoplasias mieloides, sin llegar en cualquier caso, a poder determinar si las mutaciones encontradas correspondían a la AHN mieloide asociada a la SM, al compartimento tumoral de la propia SM o a ambas^{42,43,91}. Aun así, en estos estudios se ha demostrado la existencia de una elevada prevalencia de mutaciones recurrentes en pacientes con AdvSM^{43,45}, con un perfil mutacional que se solapa con el descrito previamente en otras hemopatías mieloides^{223,234,322}. Además, algunas de estas mutaciones, como las mutaciones que afectan a los genes *S/A/R* y *NRAS*, así como el número de mutaciones somáticas adicionales a la mutación de *KIT*, se han asociado con el pronóstico de las AdvSM, constituyendo un factor pronóstico independiente a la hora de predecir la OS de estos pacientes^{46,214}.

Precisamente, la demostración del impacto pronóstico de las alteraciones genéticas identificadas en pacientes con SM, a parte de la mutación de *KIT*, ha promovido el diseño y validación de nuevos modelos de estratificación pronóstica para pacientes con SM^{156,157,159}. Como consecuencia de todo ello, en los últimos dos años (2018 y 2019) se han propuesto hasta 5 modelos diferentes de estratificación pronóstica para pacientes con SM en general¹⁵⁹, o específicos para formas NonAdvSM¹⁵⁷ y AdvSM de la enfermedad^{156,157}. No obstante, estos avances han supuesto un cierto grado de confusión a la hora de decidir cuál es el mejor modelo predictivo para su aplicación en la práctica asistencial. Esto es debido a que, por un lado, hasta la fecha no existe ningún estudio en el que se comparen de forma directa estos cinco modelos pronósticos, y, por otra parte, a que en el diseño de

éstos modelos pronósticos se han empleado diferentes combinaciones de parámetros clínicos y de laboratorio, asociados¹⁵⁷ o no con las alteraciones genéticas del tumor^{156,159}.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos hemos planteado como objetivo general determinar el tipo, frecuencia e impacto pronóstico de las mutaciones presentes en pacientes con SM y que afectan a genes diferentes de *KIT*, y diseñar nuevos sistemas de estratificación pronóstica para predecir tanto la progresión como la supervivencia de pacientes con NonAdvSM y AdvSM. Para ello, nos hemos propuesto tres objetivos concretos:

1.- Determinar el tipo, frecuencia e impacto pronóstico de las alteraciones moleculares (somáticas y germinales) que involucran a genes diferentes de *KIT* en pacientes con formas indolentes y avanzadas de SM y establecer los correspondientes mapas de evolución clonal para las mutaciones somáticas encontradas, incluyendo el patrón de afectación de las distintas líneas hematopoyéticas.

2.- Establecer la frecuencia e impacto pronóstico de las mutaciones somáticas que afectan a genes diferentes de *KIT* presentes en pacientes con ISM y SSM, y determinar su utilidad pronóstica respecto a otros parámetros clínicos y de laboratorio, para terminar definiendo así un sistema de estratificación de riesgo de progresión para formas NonAdvSM.

3.- Elaborar un nuevo modelo de estratificación pronóstica de pacientes con SM que evalúe el riesgo de progresión y muerte, basado en el análisis simultáneo de las variables identificadas previamente como factores pronósticos independientes en otras series de pacientes con SM, y validar la utilidad del nuevo modelo respecto a los sistemas de clasificación pronóstica propuestos previamente.

**Materiales, métodos y
resultados**

En este apartado del trabajo doctoral se describen de forma específica los pacientes estudiados, así como los materiales y métodos usados, y los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos planteados, mediante la inclusión de forma íntegra de los artículos originales publicados como consecuencia directa del trabajo realizado. Cada uno de los artículos originales incluidos en este apartado está precedido de un breve resumen en castellano, con el fin de facilitar una revisión rápida de su contenido.

Artículo 1: “Impacto pronóstico de las mutaciones somáticas y germinales presentes en mastocitosis sistémica”

Introducción. La SM constituye una neoplasia hematológica con comportamiento clínico heterogéneo que incluye tanto formas indolentes como agresivas de la enfermedad, caracterizadas por presentar en común la mutación somática D816V de *KIT*. Aunque esta mutación por si sola es incapaz de explicar la transformación maligna de la enfermedad, diversos estudios han constatado que su presencia en un número significativo de precursores hematopoyéticos tempranos, asociada a la afectación de varias líneas de células hematopoyéticas (afectación multilineal), constituye un hallazgo típico de las formas AdvSM, a la vez que está presente en un tercio de las ISM entre las que aumenta de manera significativa la probabilidad de transformación maligna. Estos hallazgos sugieren que la existencia de un mayor compromiso de la hematopoyesis con mutación multilineal de *KIT* podría favorecer la posible adquisición de otras alteraciones genéticas, además de la mutación de *KIT*, que pudieran contribuir a explicar dicha transformación.

Objetivo. Establecer el tipo, frecuencia e impacto pronóstico de las alteraciones genéticas de tipo somático y germinal presentes en MO de pacientes con distintos subtipos de SM y determinar las posibles vías de evolución clonal presentes en cada paciente y su impacto pronóstico, en función del grado de afectación de las distintas líneas hematopoyéticas de MO.

Pacientes, materiales y métodos. En una primera fase se estudiaron 20 pacientes con SM (12 NonAdvSM y 8 AdvSM) y afectación multilineal por la mutación D816V de *KIT*, en los que se obtuvieron

poblaciones celulares (MC, neutrófilos y linfocitos T) purificadas (pureza >98%) de MO. A partir de estas células (y de muestras de pelo de los mismos pacientes) se extrajo ADN genómico que se utilizó para secuenciar un panel de 410 genes asociados a cáncer. En paralelo, en las muestras de ADN de MC, neutrófilos, linfocitos T y pelo de 4 pacientes, se procedió a secuenciar el genoma completo. En una segunda fase de validación, se secuenció el ADN de muestras de MO de otros 14 pacientes con AdvSM centrándonos de forma específica en el estudio genético realizado en estos 14 pacientes en aquellos genes en los que se habían encontrado mutaciones en alguno de los 20 pacientes de la serie inicial.

Resultados. Tras realizar la secuenciación de todo el genoma en 4 pacientes, a parte de la mutación D816V de *KIT*, no se encontró ninguna otra mutación en común entre ellos. No obstante, la secuenciación de un panel de 410 genes asociados a cáncer permitió identificar un total de 67 mutaciones no-sinónimas que afectaban a 39 genes distintos. La mitad de estas mutaciones correspondían a mutaciones somáticas con afectación (multilineal), mientras que la otra mitad fueron catalogadas como variantes germinales. Desde el punto de vista pronóstico, la presencia de ≥ 1 mutación somática multilineal diferente de *KIT* D816V, y la coexistencia de ≥ 3 variantes germinales, así como la presencia de forma específica de ≥ 1 mutación multilineal en los genes *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* y/o *EZH2* (S/A/R/E), junto con la presencia de lesiones cutáneas, esplenomegalia, trombocitopenia, cifras bajas de hemoglobina y niveles séricos elevados de fosfatasa alcalina y $\beta 2$ -microglobulina, mostraron una asociación significativa con enfermedad avanzada y peor pronóstico, reflejada en tasas de supervivencia (PFS y OS) significativamente acortadas.

Conclusiones. A pesar de no haber detectado ninguna alteración genética concreta que (a parte de la mutación multilineal de *KIT*) pudiese explicar por sí sola, el comportamiento más adverso de pacientes con SM, nuestros datos parecen confirmar que la progresión de la enfermedad requiere de un entorno genético alterado, con la presencia de una gran variedad de mutaciones adicionales a la mutación D816V de *KIT*, tanto en los MC tumorales, como en otras células y líneas celulares hematopoyéticas de MO, asociándose la coexistencia de varias mutaciones germinales y/o somáticas, (y en especial la

presencia de ≥ 1 mutación multilineal en los genes *S/A/R/E*), con un peor pronóstico tanto en términos de PFS como de OS.

Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis

Javier I. Muñoz-González,¹⁻³ María Jara-Acevedo,²⁻⁴ Iván Alvarez-Twose,^{3,5} Jason D. Merker,⁶ Cristina Teodosio,⁷ Yanli Hou,⁶ Ana Henriques,^{3,5} Krishna M. Roskin,⁶ Laura Sanchez-Muñoz,^{3,5} Albert G. Tsai,⁶ Carolina Caldas,¹⁻³ Almudena Matito,^{3,5} J. Ignacio Sánchez-Gallego,¹⁻³ Andrea Mayado,¹⁻³ Noelia Dasilva-Freire,¹⁻³ Jason R. Gotlib,⁸ Luis Escribano,¹⁻³ Alberto Orfao,^{1-3,*} and Andrés C. García-Montero^{1-3,*}

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), CIBERONC, University of Salamanca, Salamanca, Spain;

²Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ³Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain;

⁴Sequencing Service (NUCLEUS), University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁵Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast) and CIBERONC, Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain; ⁶Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; ⁷Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; and ⁸Division of Hematology, Stanford University School of Medicine/Stanford Cancer Institute, Stanford, CA

Key Points

- About half of the mutations other than *KIT* D816V identified in SM patients were germline in nature.
- Somatic *EZH2* gene mutations provide prognostic information in addition to that of the well-established *S/A/R* gene panel.

Systemic mastocytosis (SM) is a highly heterogeneous disease with indolent and aggressive forms, with the mechanisms leading to malignant transformation still remaining to be elucidated. Here, we investigated the presence and frequency of genetic variants in 34 SM patients with multilineal *KIT* D816V mutations. Initial screening was performed by targeted sequencing of 410 genes in DNA extracted from purified bone marrow cells and hair from 12 patients with nonadvanced SM and 8 patients with advanced SM, followed by whole-genome sequencing (WGS) in 4 cases. Somatic mutations were further investigated in another 14 patients with advanced SM. Despite the fact that no common mutation other than *KIT* D816V was found in WGS analyses, targeted next-generation sequencing identified 67 nonsynonymous genetic variants involving 39 genes. Half of the mutations were somatic (mostly multilineal), whereas the other half were germline variants. The presence of ≥ 1 multilineal somatic mutation involving genes other than *KIT* D816V, ≥ 3 germline variants, and ≥ 1 multilineal mutation in the *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, and/or *EZH2* genes (*S/A/R/E* genes), in addition to skin lesions, splenomegaly, thrombocytopenia, low hemoglobin levels, and increased alkaline phosphatase and $\beta 2$ -microglobulin serum levels, were associated with a poorer patient outcome. However, the presence of ≥ 1 multilineal mutation, particularly involving *S/A/R/E* genes, was the only independent predictor for progression-free survival and overall survival in our cohort.

Introduction

Systemic mastocytosis (SM) comprises a heterogeneous group of hematological disorders that is characterized by the accumulation of abnormal mast cells (MCs) in multiple tissues that usually include the skin and bone marrow (BM).¹ According to the World Health Organization (WHO) criteria,^{2,3} most SM patients (>90%) have indolent SM (ISM) and a normal life expectancy⁴⁻⁶; however, a fraction of the patients might present with (or progress to) advanced forms of the disease, such as aggressive SM (ASM), SM associated with another hematological neoplasm (SM-AHN), and, less frequently, MC leukemia (MCL).^{3-5,7} The mechanisms leading to malignant transformation of SM remain to be fully elucidated.

The *KIT* D816V somatic mutation is present in the majority of adult SM patients,^{8,9} particularly among ISM and ASM cases.¹⁰ Thus, although this *KIT* mutation might represent the genetic driver of SM, on its own it cannot explain malignant transformation of the disease. However, multilineal involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation, found in approximately one third of ISM cases and the great majority of advanced forms of SM,^{6,10,11} particularly when this mutation is already present in an early pluripotent precursor cell also involving mesenchymal stem cells (MSCs), significantly enhances the probability of progression from ISM to advanced forms of SM.¹² Altogether, these findings suggest that acquisition of additional genetic alterations along with the *KIT* mutation and/or the existence of a specific genetic background might be required for progression of ISM to more severe forms of the disease.¹³⁻¹⁵ Hence, recent studies based on relatively limited gene panels have shown that advanced forms of SM, including 177 of 284 SM-AHN cases, 28 of 284 ASM cases, and 8 of 284 MCL cases,^{13,15-18} often carry mutations in genes previously reported to be altered in other myeloid neoplasms,¹⁹⁻²¹ in addition to the *KIT* mutation. However, relatively limited information exists about the frequency of mutations in those genes in diagnostic subtypes of SM other than SM-AHN (eg, ISM and smoldering SM [SSM] in addition to ASM and MCL). Also, these mutations have been found in the other hematological neoplasm component of the disease but not in the MC compartment.^{22,23} In addition, it remains unknown whether the occurrence of such mutations in an early hematopoietic precursor would also confer a worse prognosis to SM patients, as demonstrated by Jawhar et al for SM-AHN cases¹⁷ and previously reported for *KIT* D816V.¹²

Here, we first investigated the presence and frequency of genetic variants, for a total of 410 genes, on purified BM MCs, maturing neutrophils, and T cells (plus hair in cases with multilineal gene involvement) from 20 SM patients presenting with a multilineal *KIT* D816V mutation, followed by whole genome sequencing (WGS) in 4 cases. In a second step, the somatic mutations identified were investigated in whole BM samples from another 14 advanced SM patients. To define the clonal hierarchy of the genetic variants identified, patients' genomic (g)DNA obtained from different (purified) BM cell populations and hair was sequenced in parallel. Then the number and type of nonsynonymous (coding) genetic variants identified were compared among the distinct diagnostic subtypes of SM and related to patient outcome. Our results show, for the first time, a high frequency of germline mutations in advanced SM, in addition to the previously described somatic mutations, most of which were also found to involve multiple hematopoietic cell lineages. Somatic *EZH2* gene mutations provide prognostic information, in addition to that of the well-established *SRSF2*, *ASXL1*, and/or *RUNX1* (*S/A/R*) gene panel, in our series of SM patients.

Materials and methods

Patients

Overall, 34 patients (15 females and 19 males), 12 with non-advanced SM but high-risk features (ie, ISM with multilineal involvement by the *KIT* D816V mutation and high serum baseline tryptase levels) and 22 with advanced forms of SM (ie, 4 SSM, 11 ASM, and 7 SM-AHN), diagnosed at the reference center (Virgen del Valle Hospital) of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) were studied (median age at diagnosis, 52 years; range,

0-76 years) based on (1) the presence of multilineal *KIT* D816V mutation, including involvement of MSCs in every ISM case tested, (2) high (>100 µg/L) tryptase serum levels, and (3) follow-up time from diagnosis \geq 1 year (median, 6.5 years; range, 1-48). In an initial series (test series) of 20 patients (12 nonadvanced and 8 advanced SM cases; patients 1-20 in Table 1) sufficient ($\geq 5 \times 10^4$) highly purified BM MCs, maturing neutrophils, and T cells were also required to perform further molecular analyses. In all 20 patients, hair was collected in parallel with the purified BM cell populations. In the additional 14 advanced SM cases (cases 21-34 in Table 1), availability of a whole BM sample was required to enter the study. Diagnosis and classification of SM were reviewed based on 2016 WHO criteria.² All patients showed BM MC aggregates in histology with CD25⁺ *KIT* D816V mutated and cytologically altered BM MCs; in addition, median serum baseline tryptase levels at diagnosis in nonadvanced and advanced SM cases were 268.5 µg/L (range, 115-1298) and 224 µg/L (range, 112-1469), respectively. To detect SM-AHN, conventional WHO cytomorphology and immunophenotypic criteria,² based on the EuroFlow ALOT and acute myeloid leukemia (AML)/myelodysplastic syndrome (MDS) antibody panels,²⁴ were used, respectively; at diagnosis, no patient showed BM infiltration by blast cells or other cells (in the absence of pathological MCs) compatible with a non-MC myeloid malignancy. Information about patient treatment is available in supplemental Table 7. Prior to entering the study, each individual gave his/her written informed consent to participate according to the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local institutional Ethics Committees. During the study period, 20 of 34 patients showed disease progression or died from SM-related causes, whereas the remaining 14 cases had stable disease (Table 1), after a median follow-up from initial diagnosis of 6.5 years. Briefly, 9 ISM cases progressed to SSM (n = 3) or ASM (n = 6), 8 ASM patients showed progression to ASM-AHN (n = 6) or died from SM-related causes (n = 2), and 3 SM-AHN patients died from SM-related causes. None of the patients showed progression to MCL, and none of the 34 SM patients had a history of familial mastocytosis.

Purification of BM cell populations

Identification and isolation of antibody-stained (supplemental Table 1) BM MCs, maturing neutrophils, T cells, and MSC populations were performed in the initial cohort of 20 patients, as described in supplemental Methods, using well-established stain-and-then-lyse-and-wash procedures¹⁰ and a 4-way fluorescence-activated cell sorter (FACSaria III) equipped with FACSDiva software (both from BD, San Jose, CA), as described elsewhere.^{10,25} The purity of the FACS-sorted cells was systematically >98%, in the absence of cross-contamination by MCs (<0.001%) or any other *KIT* D816V⁺ BM cell population.

Analysis of the *KIT* D816V mutation

Positivity for the *KIT* D816V mutation was assessed in gDNA of FACS-purified BM MCs, maturing neutrophils, T cells, and MSCs using a quantitative real-time allele-specific oligonucleotide PCR method, as described.^{26,27}

Targeted gDNA sequencing

Overall, 40 ng of gDNA from purified BM MCs and maturing neutrophils was used for targeted sequencing of all exons of 409 genes in a first cohort of 20 cases (patients 1-20 in Table 1). For this purpose, the AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel was analyzed

Table 1. Clinical and biological features of the 34 SM patients carrying the multilineal *KIT* mutation analyzed in this study

Patient ID	Sex	Age, y	Diagnosis			Follow-up (at disease progression or last visit)						Cause of progression	
			WHO subtype	BM MC aggregates in histology	sBT, ng/mL	Progression	PFS, y	Age, y	WHO subtype	sBT, ng/mL	Alive		OS, y
1	M	46	ISM	+	115	No	17	63	ISM	105	Yes	17	-
2	M	48	ISM	+	210	No	19	67	ISM	258	Yes	19	-
3	M	67	ISM	+	167	No	3	70	ISM	143	Yes	3	-
4	F	71	ISM	+	208	Yes	5	76	SSM	289	Yes	10	sBT > 200; SPLEN
5	F	39	ISM	+	175	Yes	15	54	SSM	240	Yes	17	sBT > 200; SPLEN
6	M	45	ISM	+	267	Yes	2	46	SSM	310	Yes	9	HEP-SPLEN; DBS
7	M	66	ISM	+	270	Yes	2	68	ASM	305	No	6	HEP-SPLEN; NEUP
8	F	11	ISM	+	1077	Yes	14	25	ASM	1970	Yes	30	HEP-SPLEN*; DBS
9	M	0	ISM	+	332	Yes	32	31	ASM	430	Yes	48	HEP-SPLEN*; DBS
10	M	32	ISM	+	1298	Yes	30	62	ASM	2036	Yes	39	HEP*; DBS
11	M	57	ISM	+	362	Yes	6	63	ASM	1507	No	7	HEP*; IDA
12	F	47	ISM	+	290	Yes	2	49	ASM	312	No	6	SPLEN*; DBS; TRP
Subtotal	66% M, 34% F	46.5 (0-71)			270 (167-1298)	9/12 (75%)	10 (2-32)	62.5 (25-76)		307.5 (105-2036)	9/12 (75%)	13.5 (3-48)	
13	M	51	ASM	+	238	No	6	57	ASM	174	Yes	6	-
14	F	60	ASM	+	260	No	10	70	ASM	288	Yes	10	-
15	M	72	ASM	+	1469	No	4	76	ASM	1469	Yes	4	-
16	M	66	ASM	+	123	Yes	4	70	SM-AHN	53	No	4	MPN
17	F	37	ASM	+	201	Yes	1	38	SM-AHN	NA	Yes	3	AML
18	M	65	ASM	+	150	Yes	3	68	SM-AHN	516	No	4	MDS
19	M	45	ASM	+	548	Yes	4	49	SM-AHN	477	No	10	AML
20	M	58	ASM	+	178	Yes	1	59	SM-AHN	235	No	2	MDS
21	F	76	ASM	+	279	Yes	5	81	ASM	400	No	5	SM-related death
22	F	49	SM-AHN	+	180	No	10	50	SM-AHN	173	Yes	10	-
23	F	41	SM-AHN	+	184	No	3	44	SM-AHN	123	Yes	3	-
24	F	53	SM-AHN	+	159	No	3	56	SM-AHN	85	Yes	3	-
25	F	51	SM-AHN	+	112	Yes	11	62	SM-AHN	147	No	11	SM-related death
26	F	56	SM-AHN	+	1376	Yes	1	57	SM-AHN	1354	No	1	SM-related death
27	M	64	ASM	+	180	Yes	12	76	SM-AHN	107	Yes	12	AML
28	M	70	ASM	+	308	Yes	1	71	ASM	308	No	1	SM-related death
29	M	59	SM-AHN	+	160	Yes	1	60	SM-AHN	257	No	1	SM-related death
30	M	15	SM-AHN	+	210	No	13	28	SM-AHN	107	Yes	13	-
31	F	66	SSM	+	892	No	4	70	SSM	386	Yes	4	-
32	M	41	SSM	+	304	No	18	59	SSM	226	Yes	18	-

Subtotal and total results are expressed as percentage of cases (and range) for sex (male [M]/female [F]); as median (and range) for age, serum baseline tryptase (sBT), PFS, and OS; and as number of cases (and percentage) for progression and survival.

DBS, diffuse bone sclerosis; HEP, hepatomegaly; IDA, iron-deficiency anemia; MPN, myeloproliferative neoplasm; NEUP, neutropenia; SPLEN, splenomegaly; TRP, thrombocytopenia; +, positive; -, no progression.

*With organ failure.

Table 1. (continued)

Patient ID	Sex	Age, y	Diagnosis		Follow-up (at disease progression or last visit)						Cause of progression		
			WHO subtype	BM MC aggregates in histology	sBT, ng/mL	Progression	PFS, y	Age, y	WHO subtype	sBT, ng/mL		Alive	OS, y
33	F	52	SSM	+	316	No	5	57	SSM	282	Yes	5	-
34	F	33	SSM	+	187	No	10	43	SSM	166	Yes	10	-
Subtotal	50% M 50% F	54.5 (15-76)			224 (112-1469)	11/22 (50%)	4 (1-18)	59 (28-81)		235 (53-1469)	13/22 (59%)	4.5 (1-18)	
Total	56% M 44% F	51.5 (0-76)			249 (112-1469)	20/34 (59%)	4 (1-32)	62 (25-81)		282 (53-2036)	22/34 (65%)	6.5 (1-48)	

Subtotal and total results are expressed as percentage of cases (and range) for sex (male [M]/female [F]); as median (and range) for age, serum baseline tryptase (sBT), PFS, and OS; and as number of cases (and percentage) for progression and survival.

DBS, diffuse bone sclerosis; HEP, hepatomegaly; IDA, iron-deficiency anemia; MPN, myeloproliferative neoplasm; NEUP, neutropenia; SPLEN, splenomegaly; TRP, thrombocytopenia; +, positive; -, no progression.

*With organ failure.

on an Ion Proton platform (both from Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. Only those nonsynonymous coding genetic variants identified based on the GRCh37 reference genome²⁸ with $\geq 100\times$ allele coverage were selected.

Subsequently, the following additional filters were applied to discriminate between acquired genetic variants (ie, somatic mutations) and germline mutations vs genetic variants present in the Spanish population (ie, single nucleotide polymorphisms). First, the above results were compared with the 5000 exomes,²⁹ the IBS 1000 Genome Project,³⁰ and the ExAC³¹ population databases. Then, only those genetic variants that had not been previously reported in Spanish and/or in European (non-Finnish) populations and/or those with a minor allele frequency < 0.001 were considered in this study. Subsequently, the exome of 36 control gDNA samples representative of the Spanish healthy population (Spanish National DNA Bank Carlos III, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <http://www.bancoadn.org>), pooled into 3 groups of 12 individuals per group, was sequenced to discriminate between the actual genetic variants found in SM patients and technical sequencing artifacts. Then, potentially deleterious mutations, as defined by the SIFT³² and PolyPhen³³ algorithms, were selected and confirmed by Sanger sequencing on gDNA extracted from purified BM MCs, neutrophils, and T lymphocytes. Finally, the somatic vs germline nature of the genetic variants was evaluated by Sanger sequencing of gDNA obtained from paired patient's hair. Germline mutations were defined as those gene variants detected in gDNA from hair with an allele frequency $\sim 50\%$. In 1 patient (case 9 in Table 1), the germline nature (vs early acquisition of the mutation during embryonic development) could be tested (and confirmed) in gDNA from his mother's hair. Additionally, the *SRSF2*-p.P95³⁴ mutational hotspot was investigated through Sanger sequencing of BM-derived gDNA from all 20 patients.

The new mutations identified were classified according to their pattern of distribution in different cell compartments, as follows: (1) hematopoietic (acquired) somatic mutations either restricted to MCs or (2) shared by MCs and other myeloid and/or lymphoid cells (ie, multilineal mutations) and (3) inherited rare germline variants or mutations acquired early during embryonic development, when the genetic variant was also present in gDNA from hair (supplemental Table 2).

Based on the somatic mutations found, a customized library for target sequencing of 15 genes (ie, *ASXL1*, *CDH11*, *DNMT3A*, *EPHA7*, *EZH2*, *ICK*, *IKZF1*, *ITGA10*, *KAT6B*, *PIK3CD*, *ROS1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, and *TET2*) was designed and analyzed in an additional cohort of 14 advanced SM patients (4 SSM, 3 ASM and 7 SM-AHN; patients 21-34 in Table 1). A total of 200 ng of BM gDNA per patient was used to prepare DNA libraries with a TruSeq Custom Amplicon Low Input kit (Illumina, San Diego, CA) and sequenced at 2×150 -bp read length on an Illumina HiSeq 2500 genome sequencer, following the manufacturer's instructions.

WGS

gDNA from purified BM MCs and T lymphocytes from patients 9, 10, 13, and 14 was used to generate a single short-insert library. Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 2500 instrument to generate paired-end 2×100 -bp reads at a minimum of 110 G of data per sample (average coverage of 48.4 total reads; range, 41.9-53.9). The raw reads from both cell population libraries were processed and

Table 2. Number and type of genetic variants identified in purified BM MCs from SM patients by WGS (n = 4)

Patient ID	SNVs	Indels	Total variants (SNVs + indels)	Mutations per Mb
9	15	7	22	0.008
10	486	15	501	0.18
13	534	21	555	0.19
14	267	9	276	0.10
Average	326	13	339	0.12

Indels, insertions and deletions; SNV, single nucleotide variant.

aligned to the GRCh37/hg19 reference sequence²⁸ according to GATK best practices.³⁵ Bulk read statistics were calculated using samtools³⁶ (version 1.3.1, stats subcommand). Exon coverage was calculated using bedtools³⁷ (version 2.26.0, coverage subcommand) with exon ranges from UCSC Known Genes³⁸ downloaded with the UCSC Table Browser.³⁹ Only those genetic variants with $\geq 20\times$ allele coverage were considered. Sequencing metrics for each specimen are provided in supplemental Table 3.

Statistical analyses

The Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests were used to assess the statistical significance (set at $P < .05$) of differences observed among groups. Overall survival (OS; calculated from the time of diagnosis to death or the last follow-up visit) and progression-free survival (PFS; calculated from the time of diagnosis to disease progression/death or the last follow-up visit in case of stable disease) curves were plotted according to the Kaplan-Meier method and compared using the Breslow (ie, generalized Wilcoxon) test, as suggested by Bouliotis and Billingham⁴⁰ for data with a nonproportional hazard pattern. Receiver operating characteristic curve analysis was used to identify the most sensitive cutoff for the number of genetic variants that discriminated between patients with distinct OS and PFS. For multivariate analyses, the covariate adjustment model⁴¹ was applied to those variables found to be statistically different in the univariate analysis, and the Cox proportional hazard regression model was then used. SPSS software (SPSS version 20.0; IBM Corporation, Armonk, NY) was used for all statistical analyses.

Results

Nonsynonymous coding genetic variants identified in SM patients

In addition to *KIT* D816V, targeted next-generation sequencing (NGS) analyses of purified BM cell populations obtained from the first cohort of 20 SM patients showed 37 583 genetic variants (median: 1347 per case; range: 662-2431) that resulted in 52 nonsynonymous coding genetic variants involving 39 genes, after excluding population allele filters and technical artifacts (supplemental Table 2). Only 10 of 39 genes (*ASXL1*, *DCC*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IKZF1*, *LRP1B*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, and *TET2*) were recurrently mutated (ie, present in ≥ 2 patients) (supplemental Table 2). Interestingly, 46% (24/52) of the nonsynonymous coding genetic variants found are reported here for the first time (supplemental Table 2).

Fifteen of the 39 mutated genes harbored half of the genetic variants detected (26/52), which were confirmed to be somatic mutations present in hematopoietic cells but absent in hair gDNA; in

contrast, the remaining 24 mutated genes carried germline genetic variants (or early acquired mutations), because they were present at $\sim 50\%$ allele burden in all hematopoietic cells tested and in the patients' hair (supplemental Table 2). Of note, the germline nature of the *IGF2R* mutation in patient 9 was confirmed in gDNA extracted from his mother's hair. Also, most somatic mutations (20/26, 77%) corresponded to multilineal mutations that involved myeloid (17/26, 65%) or myeloid plus lymphoid (3/26, 12%) hematopoietic BM cells, in addition to MCs, and only a few mutations (6/26, 23%) were restricted to the MC compartment in BM (supplemental Table 2).

Subsequent WGS analysis of BM MCs and T cells from 4 ASM cases showed a genome-wide mutation frequency of between 0.008 and 0.19 mutations per megabase (Mb; average of 0.12 mutations per Mb) (Table 2). After applying filters to discriminate for MC-specific genetic variants (supplemental Methods), only 10 nonsynonymous coding or canonical splice site MC-specific variants (range: 0-4 per case) were found (supplemental Table 5). Only 1 of 10 MC-specific genetic variants identified in the *PIK3CD* gene by WGS analysis was also screened by targeted NGS. Interestingly, similar allele burdens were found, despite the distinct sequencing methods used (ie, 33% for WGS and 37% for targeted NGS).

Ten of the 14 advanced SM patients included in the second patient cohort (71%) harbored a total of 15 mutations, other than *KIT* D816V, involving 9 genes, of which 2 (*RUNX1*, *SRSF2*) were recurrently mutated. Interestingly, 5 of these 15 mutations (33%) were reported here for the first time (supplemental Table 3).

Clonal hierarchy of somatic mutations involving hematopoietic cells

All 20 patients screened for mutations within purified BM cell populations showed multilineal involvement of BM hematopoietic cells by *KIT* D816V, and *KIT* D816V-mutated MSCs were detected in 11 of 13 cases tested, including 9 of 9 ISM cases (patients 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, and 12) and 2 of 4 ASM cases (patients 13 and 14). Also, targeted NGS analyses showed that 11 of 20 patients carried additional mutations.

Detailed analysis of the mutated allele burden within the MC population and the different hematopoietic cell lineages involved (supplemental Table 2) revealed heterogeneous patterns of distribution of somatic mutations in hematopoietic cells. Briefly, *KIT* D816V apparently emerged as the first somatic mutation acquired by hematopoietic cells in 4 of 11 cases: patients 5 (ISM), 14 (ASM), 17 (ASM), and 18 (ASM) (supplemental Figure 1A). In 1 ISM patient (patient 7) who had *KIT* and *RUNX1* mutations, the *KIT* mutation was associated with a greater degree of involvement of hematopoiesis (including *KIT* D816V-mutated MSCs), pointing out its potential emergence at an earlier stage than the *RUNX1* mutation; however, lower percentages of mutated MCs for *KIT* vs *RUNX1* (24% vs 50% allele burden, respectively) were observed, which may indicate that the 2 mutations might have been acquired in different clones/subclones, in the absence of chromosomal/genetic gains and/or losses (supplemental Figure 1B). Likewise, a pattern consistent with the coexistence of 2 different clones/subclones was found in 2 other ASM cases (patients 19 and 20) that progressed to ASM-AHN (supplemental Figure 1B). Of note, in patient 19, AML blasts identified at progression tested positive for the *EZH2* mutation but lacked *KIT* D816V. In turn, in another ASM case

Table 3. Number of genes carrying nonsynonymous coding genetic variants (somatic vs germline mutations) per SM patient grouped according to the distinct diagnostic subtypes of the disease

Patient ID	WHO diagnostic subtype	MC restricted mutations	Hematopoietic acquired somatic mutations					Germline genetic variants				Patients with ≥3 mutations, n (%)				
			Mutations, median (range), n	Mutated patients (%)	Multilineal mutations	Mutations, median (range), n	Total somatic mutations	Mutated patients (%)	Mutations, median (range), n	Genetic variants or early acquired mutations	Mutations, median (range), n		Patients with ≥2 mutations, n (%)	Total genetic variants		
1	ISM	-	0 (0-2)	3/12 (25)	-	0 (0-2)	3/12 (25)	-	0 (0-3)	4/12 (33)	-	1 (0-2)	3/12 (25)	-	1 (0-4)	3/12 (25)
2	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (EP400)	1	1	1	1	
3	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (RECQL4, NSD2)	2	2	2	2	
4	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (DCC)	1	1	1	1	
5	ISM	1 (JGA10)	-	-	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	
6	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	ISM	-	-	1 (RUNX1)	1	1	1	1	1	1	2 (CSF1R, MARK4)	3	3	3	3	
8	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (SYNE1)	1	1	1	1	
9	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (GF2R, ITPKA)	2	2	2	2	
10	ISM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (HSP90AA1)	1	1	1	1	
11	ISM	2 (EZH2, SF3B1)	-	1 (DNMT3A)	3	3	3	3	3	3	-	3	3	3	3	
12	ISM	1 (IKZF1)	-	2 (ASXL1, DNMT3A)	3	3	3	3	3	3	1 (DCC)	4	4	4	4	
13	ASM	-	0 (0-1)	2/8 (25)	-	2 (0-5)	7/8 (88)	-	2 (0-5)	7/8 (88)	1 (SDHC)	1	3/8 (38)	1	3 (1-11)	6/8 (75)
14	ASM	1 (PIK3CD)	NS	NS	1 (EPHA7)	$P = .008$	$P = .004$	2	$P = .02$	$P = .02$	-	2	NS	2	$P = .02$	$P = .03$
15	ASM	-	-	-	2 (EZH2, IKZF1)	2	2	2	2	2	1 (DST)	3	3	3	3	3
16	ASM	-	-	2 (SRSF2, TET2)	2	2	2	2	2	2	1 (CREBBP)	3	3	3	3	3
17	ASM	1 (KAT6B)	-	2 (ASXL1, RUNX1)	3	3	3	3	3	3	-	3	3	3	3	3
18	ASM	-	-	3 (EZH2, ROS1, SF3B1)	3	3	3	3	3	3	3 (EPHB6, LRP1B, RPS6KA2)	6	6	6	6	6
19	ASM	-	-	1 (EZH2)	1	1	1	1	1	1	3 (CYP2C19, LRP1B, TCF3)	4	4	4	4	4
20	ASM	-	-	5 (CDH11, ICK, SRSF2, RUNX1, TET2)	5	5	5	5	5	5	6 (ADGRR3, MBD1, MUC1, NFKB2, NOTCH4, SOCS1)	11	11	11	11	11

Results are expressed as number of genetic variants per case after classifying the genetic variants into hematopoietic restricted mutations and germline genetic variants or early acquired mutations (ie, during embryonic development). NS, not statistically significantly different.

(patient 16) that progressed to ASM-AHN, *KIT* D816V was a secondary event to the *TET2* mutation (supplemental Figure 1C). Finally, in 2 ISM cases (patients 11 and 12) and 1 ASM case (patient 15), the precise clonal hierarchy could not be defined with the available data.

Mutational profiles in ISM vs ASM

A higher median number of nonsynonymous coding genetic variants per patient was detected in ASM (median, 3 mutations per case; range, 1-11 mutations per case) compared with ISM (median, 1 mutation per case; range, 0-4 mutations per case; $P = .02$) (Table 3). Likewise, similar differences were also found when we restricted the analysis to the number of somatic mutations that involved multiple BM hematopoietic cell lineages (Table 3): 3 of 12 ISM cases (25%) vs 7 of 8 ASM cases (88%) ($P = .008$). In contrast, similar numbers of somatic mutations restricted to the MC compartment in the BM and of germline mutations/variants were observed in ISM vs ASM patients (Table 3).

Impact of the mutational profile on the outcome of SM

Receiver operating characteristic curve analysis showed that the presence of ≥ 3 genetic variants in genes other than *KIT* was the most sensitive cutoff for discriminating between patients with distinct OS and PFS. Thus, SM patients who carried ≥ 3 nonsynonymous coding genetic variants other than *KIT* D816V showed a significantly shortened PFS (median: 3 vs 30 years) and OS (median: 6 years vs not reached) compared with patients with < 3 mutations ($P = .002$ and $P < .001$, respectively) (Figure 1A). Similarly, the presence of ≥ 3 germline variants was also associated with a shorter PFS (median, 3 vs 14 years) and OS (median, 4 years vs not reached) compared with cases with < 3 germline variants ($P = .016$ and $P = .004$, respectively) (Figure 1B), whereas the presence of ≥ 1 somatic mutation (other than *KIT* D816V) involving multiple hematopoietic cell lineages showed an adverse impact on PFS (median, 3 vs 30 years) and OS (median: 6 years vs not reached) compared with the absence of somatic mutations other than *KIT* D816V ($P = .009$ and $P = .001$, respectively) (Figure 1C). In contrast, the presence of somatic mutations (other than *KIT* D816V) restricted to the MC compartment showed no prognostic impact on PFS or on OS of SM patients (Figure 1D).

Interestingly, when we restricted the analysis to those mutations involving the *SRSF2*, *ASXL1* and/or *RUNX1* (*S/A/R*) gene panel^{2,17} among all 34 SM patients, a significant impact on PFS and OS ($P < .001$ and $P = .002$, respectively) was also observed (Table 4; Figure 2A). Interestingly, the status of the *EZH2* gene (ie, the most frequently mutated gene among our patients) in *S/A/R*-negative patients further identified, among *S/A/R*-nonmutated cases, 2 patient groups with distinct outcomes (Figure 2B). Hence, ≥ 1 mutation in the new *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, and/or *EZH2* (*S/A/R/E*) gene panel showed an increased significant impact on PFS ($P < .001$) and OS ($P < .001$) vs *S/A/R* genes alone (Table 4; Figure 2C). Moreover, increased alkaline phosphatase serum levels ($P = .01$), thrombocytopenia ($P = .03$), and splenomegaly ($P = .04$) showed an impact on patients' PFS (Table 4). In turn, the presence of skin lesions ($P = .02$), thrombocytopenia ($P = .04$), decreased hemoglobin levels ($P = .001$), and increased alkaline phosphatase ($P = .01$) and $\beta 2$ -microglobulin serum levels ($P = .04$) at diagnosis were all significantly associated with a shorter OS in the univariate analysis (Table 4).

Multivariate analysis of prognostic factors, for the 20 SM patients in whom the somatic vs germline nature of the mutations identified was assessed, including those variables that had a significant impact on patient outcome in the univariate analysis (alkaline phosphatase serum levels and the number of multilineal, somatic, and total [somatic plus germline] mutations, for PFS, and the former variables plus platelet counts and the number of germline genetic variants, for OS), showed that the presence of ≥ 1 somatic mutation (other than *KIT* D816V) with multilineal hematopoietic involvement was the only independent predictor for PFS ($P = .003$; hazard ratio [HR], 2.8; 95% confidence interval [CI], 1.4-5.5) and OS ($P = .002$; HR, 9.3; 95% CI, 2.2-39.2). In turn, multivariate analysis of prognostic factors based on those variables with a significant impact in the univariate analysis that were available in all 34 SM patients studied (ie, alkaline phosphatase serum levels, platelet count, splenomegaly, and presence of *S/A/R* or *S/A/R/E* gene mutations, for PFS, and these variables plus skin lesions and hemoglobin and $\beta 2$ -microglobulin serum levels, for OS) showed that the presence of *S/A/R/E* gene mutations (HR, 7.6; 95% CI, 2.2-26; $P = .001$ for PFS and HR, 13.1; 95% CI, 2.7-64; $P = .001$ for OS) was the only independent predictor for a worse patient outcome (Table 5).

Discussion

Despite the (potentially) early acquisition of the *KIT* D816V mutation during ontogeny,¹² the onset of clinical symptoms associated with advanced forms of SM often occurs at middle or late adulthood.^{5,42} Such observations suggest that continuous activation of the defective (ie, D816V-mutated) *SCF/KIT* pathway in an early progenitor cell does not confer a malignant phenotype per se, whereas it might facilitate malignant transformation of the disease, either because of an increased susceptibility to acquire secondary "oncogenic" mutations and/or by cooperating with a particular (preexisting) genetic background. Thus, results derived from murine models^{43,44} and SM patients^{13,42,43} indicate that coexistence of different mutations along with *KIT* D816V is required for the development of advanced SM. Hence, recent studies have found higher numbers of additional (somatic) mutations in advanced SM vs ISM patients.¹³ Despite these observations, neither additional somatic mutations (apart from *KIT* D816V) nor a specific genetic background have been reported in common among advanced SM cases.^{13,16-18,34,43,45-47}

This is the first study in which a large number of genes that might be involved in malignant transformation of nonadvanced to advanced forms of SM have been investigated in a group of SM patients presenting with multilineal *KIT* D816V mutation and high serum tryptase levels. For this purpose, the complete coding regions of 410 genes (including the *SRSF2* p.P95 hotspot) were first analyzed in gDNA from purified BM cell populations from 20 SM patients.

Despite the fact that progression of ISM to more aggressive forms of the disease is a relatively rare event,² a high rate of progression was observed within our ISM cases; this high rate of progression could be explained by the patient-selection criteria (advanced SM patients plus nonadvanced ISM cases with high-risk features, such as high serum tryptase levels and multilineal involvement of the hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation,⁶ including, in the great majority of cases, *KIT* D816V-mutated BM MSCs¹²) and the long follow-up of our cases.

Overall, no common mutation shared among ASM and ISM cases that showed disease progression was found. Hence, except for the

Figure 1. Kaplan-Meier estimates of PFS and OS of SM patients (n = 20) grouped according to the number and type of mutations detected. Panels describe PFS (left panels) and OS (right panels) of patients grouped according to the number of total genetic variants (A), germline genetic variants (B), multilineal somatic mutations (C), and MC restricted (somatic) mutations (D). Values are expressed in years from diagnosis to disease progression (PFS) and death (OS) or the last follow-up visit. Median PFS and/or OS indicates the time point at which half of the patients have progressed to more aggressive forms of the disease or died, respectively.

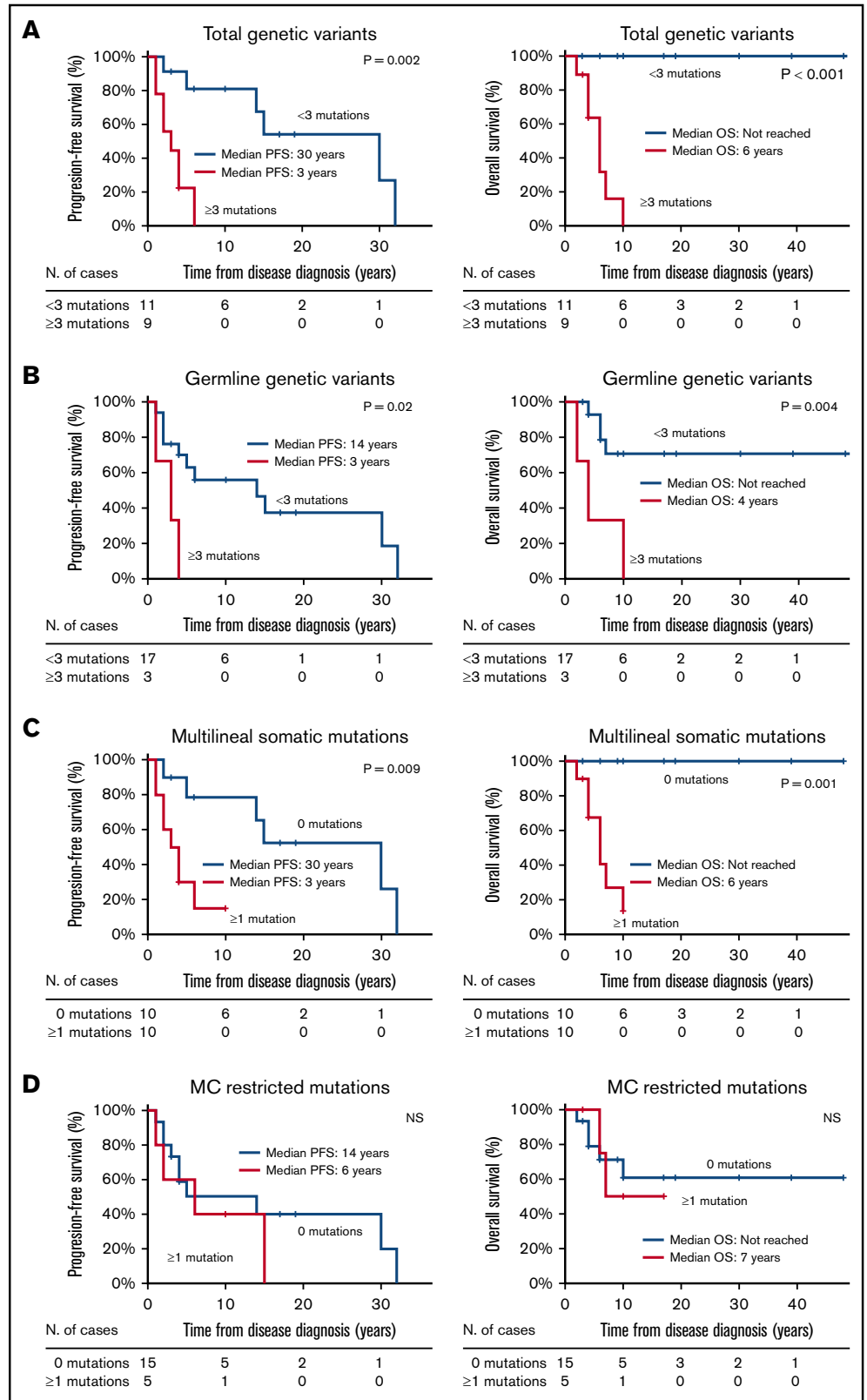


Table 4. SM patients: prognostic factors for PFS and OS (n = 34)

Disease features	n	Univariate analysis			
		PFS, y		OS, y	
		Median (range)	P	Median (range)	P
Clinical and laboratory features					
Diagnosis					
Nonadvanced SM	12	14 (2-32)	NS	NR (3-48)	NS
Advanced SM	22	11 (1-18)		11 (1-18)	
Age at diagnosis, y					
<60	23	14 (1-32)	NS	NR (1-48)	NS
≥60	11	5 (1-10)		6 (1-12)	
Skin lesions					
No	10	4 (1-6)	NS	6 (1-13)	0.02
Yes	24	14 (1-32)		NR (3-48)	
BM MCs, %					
<1	14	5 (1-19)	NS	11 (1-19)	NS
≥1	18	14 (1-32)		NR (1-48)	
sBT, µg/L					
<200	10	15 (1-17)	NS	NR (1-17)	NS
≥200	22	6 (1-32)		NR (1-48)	
Hemoglobin, g/L					
<100	5	3 (1-6)	NS	4 (1-7)	.001
≥100	29	14 (1-32)		NR (1-48)	
Platelets, ×10 ⁹ /L					
<100	11	4 (1-15)	.03	4 (1-17)	.04
≥100	23	14 (1-32)		NR (1-48)	
β2-microglobulin, µg/mL					
<2.5	7	NR (2-18)	NS	NR (3-17)	.04
≥2.5	20	5 (1-32)		10 (1-48)	
SAP, U/L					
<150	16	32 (2-32)	.01	NR (3-48)	.01
≥150	14	4 (1-30)		10 (1-39)	
Splenomegaly					
No	11	30 (1-30)	.04	NR (1-39)	NS
Yes	23	5 (1-32)		11 (1-48)	
Hepatomegaly					
No	16	15 (1-19)	NS	NR (1-19)	NS
Yes	18	5 (1-32)		11 (1-48)	
Number of nonsynonymous coding genetic variants					
Total somatic mutations					
0	9	30 (2-32)	.02	NR (3-48)	.005
≥1	11	4 (1-15)		6 (2-17)	
MC restricted					
0	15	14 (1-32)	NS	NR (2-48)	NS
≥1	5	6 (1-15)		7 (6-17)	
Multilineal					
0	10	30 (2-32)	.009	NR (3-48)	.001
≥1	10	3 (1-10)		6 (2-10)	

NR, not reached; NS, not statistically significant ($P > .05$); SAP, serum alkaline phosphatase; WT, wild-type.

Table 4. (continued)

Disease features	n	Univariate analysis			
		PFS, y		OS, y	
		Median (range)	P	Median (range)	P
Germline genetic variants					
<3	17	14 (1-32)	.016	NR (4-48)	.004
≥3	3	3 (1-4)		4 (2-10)	
Total genetic variants					
<3	11	30 (2-32)	.002	NR (3-48)	<.001
≥3	9	3 (1-6)		6 (2-10)	
Gene panel mutational status					
<i>S/A/R</i>					
WT	23	15 (2-32)	<.001	NR (3-48)	.002
Mutated	11	2 (1-4)		6 (1-13)	
<i>S/A/R/E</i>					
WT	19	30 (2-32)	<.001	NR (3-48)	<.001
Mutated	15	3 (1-6)		6 (1-13)	

NR, not reached; NS, not statistically significant ($P > .05$); SAP, serum alkaline phosphatase; WT, wild-type.

IKZF1 p.N159S, *RUNX1* p.R162K, and *SRSF2* p.P95R mutations found in 2 patients each, all other (specific) genetic variants identified were detected in our series in a single case. In line with this as well, only 2 of 67 variants (*SF3B1* p.K666T and *SRSF2* p.P95R mutations) identified in this study had been reported in SM patients.¹⁶ Furthermore, WGS performed in a subset of 4 ASM patients (ie, ASM without another hematological neoplasm [AHN]), confirmed the absence of common nonsynonymous (coding) genetic variants, other than *KIT* D816V. Interestingly, the mutation rate observed within purified BM clonal MCs in these 4 cases (0.12 per Mb) was significantly lower than that reported for other myeloid neoplasms⁴⁸ and other types of cancer.⁴⁹ Such a reduced overall mutational rate of ASM cases could be due to the lower genetic/genomic instability of advanced SM compared with other myeloid malignancies; however, despite the fact that the number of BM MCs is typically increased in ASM vs ISM, the most relevant “tumor” cell in advanced SM patients might be hematopoietic precursor cells^{10,50} and not pathological BM MCs, because all of these cases had multilineal involvement of the hematopoiesis by *KIT* D816V. If this holds true, neutrophils and, to a lesser extent, T cells would probably share most of the genetic variants found in pathological MCs. In line with this hypothesis, our results confirmed that most (77%) somatic mutations identified in BM MCs were also present in the myeloid or the myeloid plus lymphoid BM cells analyzed.

Surprisingly, half of all genetic variants found in BM MCs were also detected in gDNA from paired hair samples at ~50% allele burden, suggesting that they would correspond to germline genetic events or to mutations acquired early during ontogeny. Interestingly, most patients (70%) carried ≥1 (potentially deleterious) germline genetic event for the 410 genes investigated in this study, which reveals an extremely high frequency compared with the 4% to 30% cases with germline mutations identified in pediatric and adult populations with other types of cancers.⁵¹⁻⁵³ Despite this, the presence of germline mutations only showed a prognostic impact for PFS and OS when ≥3 germline variants were present in the same patient. However, all

3 cases displaying ≥3 germline variants (patients 18, 19, and 20) also carried a greater number of additional (multilineal) somatic mutations, identifying a potential greater genomic instability among these patients. This might also explain the greater and independent prognostic impact of the number of somatic vs germline mutations among our patients. Despite all of the above, the small number of cases analyzed here and the lack of uniform criteria across different laboratories to label a germline mutation as a deleterious variant,⁵⁴ including the use of different filtering criteria for their identification, patients with germline mutations in cancer-related genes are being identified more frequently and, due to their distinct clinical behavior, they now represent a unique subtype of myeloid malignancies in the current WHO classification.³

Recently, age-related clonal hematopoiesis (ARCH) has been associated with somatic mutations in genes also found to be altered frequently in myeloid neoplasms (eg, the *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, and *TET2* genes) involving ~10% of otherwise healthy individuals by the age of 70 years.^{55,56} Of note, these individuals would have a 12-fold higher relative risk for developing a hematological cancer; therefore, ARCH is considered an age-related preleukemic condition.^{57,58} In line with this finding, half of our SM patients who harbored ≥1 ARCH mutation (n = 10/18 cases; 56%) already exhibited an AHN at diagnosis or subsequently developed an AHN in addition to the SM, whereas these mutations affected a smaller percentage of SSM (11%) and ASM (33%) cases. These findings might suggest that acquisition of ARCH-associated gene mutations in ISM patients could be a trigger for a (myeloid) AHN, but not progression to SSM or ASM.

Analysis of the potential sequence of acquisition of somatic mutations in multmutated patients (coexistence of ≥2 somatic mutations) showed a potentially early acquisition of the *KIT* mutation in approximately one third of cases. In another third of our cases, the *KIT* D816V mutation emerged in a distinct clone or later than other multilineal somatic mutations involving, for example, the *TET2*, *RUNX1*, and *EZH2* genes, with most of these patients having or

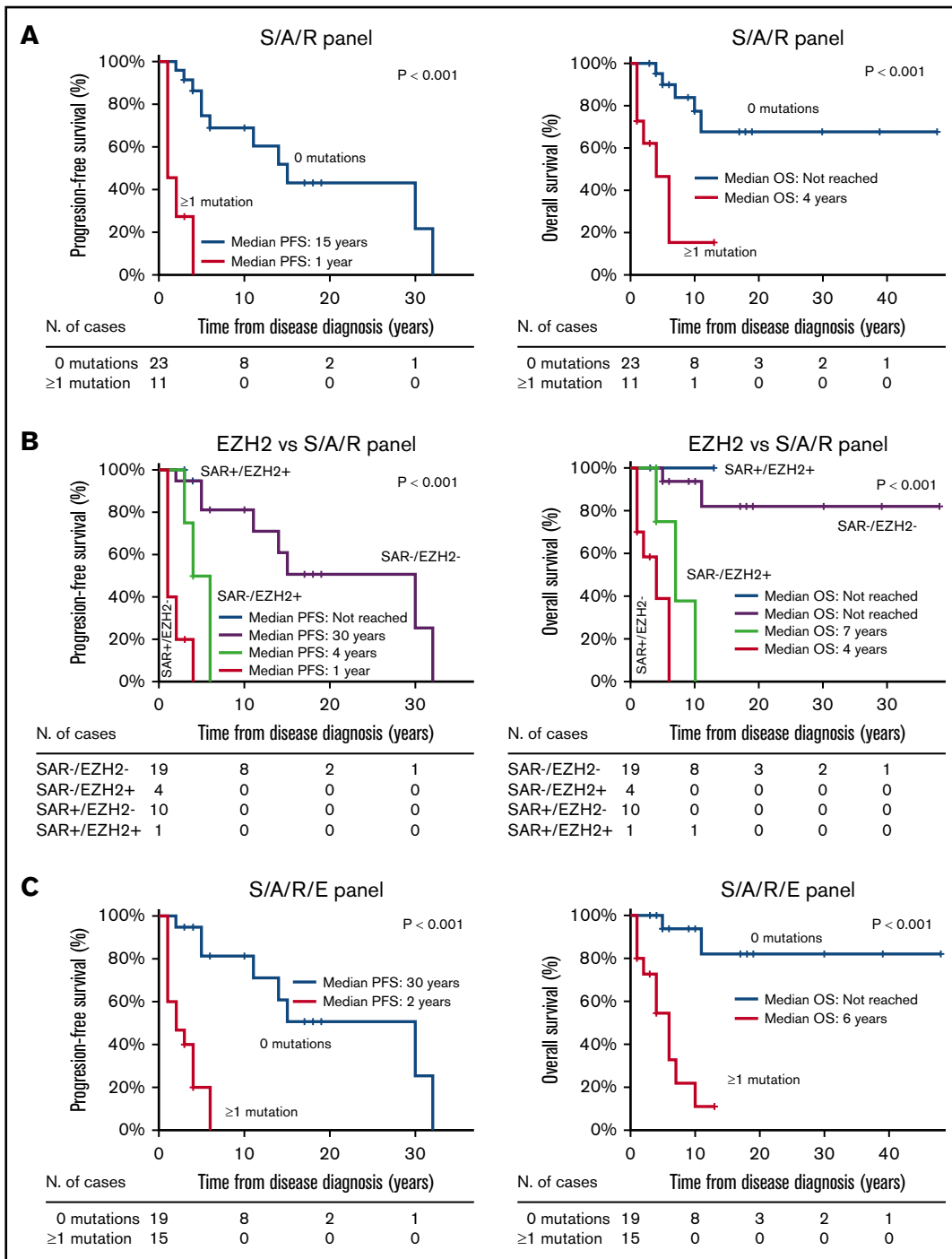


Figure 2. Kaplan-Meier estimates of PFS and OS of SM patients (n = 34) grouped according to the mutational status of *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* and *EZH2* genes. PFS (left panels) and OS (right panels) of SM patients grouped according to the presence vs absence of mutated *S/A/R* genes (A), the *EZH2* mutational status within the *S/A/R* gene panel (B), and the presence vs absence of mutated *S/A/R/E* genes (C). Values are expressed in years from diagnosis to disease progression (PFS) and death (OS) or the last follow-up visit. Median PFS and/or OS indicates the time point at which half of the patients have progressed to more aggressive forms of the disease or died, respectively.

developing SM-AHN. Altogether, these findings support previous observations in (mostly) SM-AHN patients that showed a predominance of gene mutations, other than *KIT* D816V alone or in combination with *KIT* mutations, in (in vitro) expanded colony-forming cells from SM patients.¹⁶ Moreover, in the only case in which we could confirm that the *KIT* mutation was a secondary genetic event, the

development of a myeloid proliferative neoplasm occurred just prior to death. The apparent discrepancy between our data and previous data indicating that the *KIT* mutation might frequently occur as a distinct and late event¹⁶ in advanced mastocytosis might be due to the fact that all multimutated patients analyzed in such series (12/12) corresponded to SM-AHN patients¹⁶ with preferential growth of *KIT*

Table 5. SM: multivariate analyses of prognostic factors for PFS and OS for the entire patient series (n = 34)

Disease features	n	PFS		OS	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Clinical and laboratory features					
Hemoglobin, g/L					
<100	5	NT		NS	
≥100	29				
Skin lesions					
No	10	NT		NS	
Yes	24				
Platelets, ×10 ⁹ /L					
<100	11	NS		NS	
≥100	23				
β2-microglobulin, μg/mL					
<2.5	7	NT		NS	
≥2.5	20				
SAP, U/L					
<150	16	NS		NS	
≥150	14				
Splénomegaly					
No	11	NS		NS	
Yes	23				
Gene panel mutational status					
<i>S/A/R</i>					
WT	23	NS		NS	
Mutated	11				
<i>S/A/R/E</i>					
WT	19	7.6 (2.2-2.6)	.001	13.1 (2.7-64)	.001
Mutated	15				

NS, not statistically significant ($P > 0.05$); NT, not tested.

wild-type vs *KIT*-mutated tumor cell precursors, whereas our series was selectively enriched for multilineal *KIT*-mutated ISM and ASM cases. However, clonogenic assays and/or single-cell analyses have not been performed in this study; therefore, our conclusions should be viewed with caution.

Interestingly, among our cases, most genes targeted by acquired somatic mutations, other than *KIT* D816V (ie, *ASLXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IKZF1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*), had previously been found to be mutated in advanced SM^{13,16,17,34,46,47} and/or in other myeloid neoplasias,^{19,21,45,55,59-62} and their multilineal nature was shown in this study for the first time. In addition, the number of mutated genes (apart from *KIT*) with multilineal involvement of hematopoiesis increased significantly from ISM to ASM cases, in line with previous observations.¹⁷ Altogether, these findings further support the role of the *KIT* D816V mutation as a trigger for advanced SM under a “dangerous” genetic background, defined not only by the (number of) preexisting germline variants, as well as by the presence of (previously) acquired multilineal mutations in genes other than *KIT*. Actually, the presence of ≥1 somatic mutation with multilineal hematopoietic involvement, in addition to *KIT*, or the presence of ≥3 nonsynonymous

coding genetic variants (including somatic and germline events) in the genes investigated in this study significantly increased the probability of progression of SM and of shortening the OS of SM patients.^{19,20,60}

To explore the potential clinical utility of NGS screening based on a reduced number of genes, we investigated the prognostic impact of the previously reported (adverse) *S/A/R* gene panel¹⁷ in our patients. Our results confirmed that patients carrying ≥1 mutation in *S/A/R* genes had significantly poorer PFS and OS.¹⁷ However, inclusion of *EZH2* into a *S/A/R/E* gene panel revealed that the combination of mutations in these 4 genes had greater predictive value for PFS and OS than did the well-established *S/A/R* gene panel, because *S/A/R/E* gene mutations were shown to be the only independent predictor for PFS and OS in our SM patients. Of note, *EZH2* was 1 of the most frequently mutated genes in our series and 1 of the most frequently mutated genes in other cohorts of patients with SM^{13,16} and other myeloid neoplasms,^{19,20,63} where its mutations emerged as never being shared with *SRSF2* mutations^{64,65}; this might contribute to explain its additional prognostic information over the *S/A/R* gene mutations. This observation differs from data reported by other investigators^{17,62} who also tested the influence of mutations in the *EZH2* gene; however, both studies^{17,62} included a significantly shorter median patient follow-up than ours (eg, 3.6 and 2 years vs 6.5 years, respectively), a period during which less than half of our ISM patients who progressed would have transformed to SSM and other forms of advanced SM. Thus, further investigations in larger series of SM patients, with a long follow-up, are required to confirm these findings.

In summary, our results show that no individual genetic lesion apart from the (multilineal) *KIT* mutation appears to be an independent predictor for malignant transformation of SM; however, progression of ISM to more advanced forms of the disease most likely requires an altered multimutated genetic background of both (*KIT*-mutated) tumor MCs and other hematopoietic BM cells. Germline and multilineal somatic mutations (particularly those involving the *SRSF2*, *ASXL1*, and *RUNX1* genes in addition to the *EZH2* gene) emerge as critical genetic markers associated with disease progression and a shortened OS for ISM patients at higher risk of disease progression.

Acknowledgments

The authors thank the Cell Sorting Service and Spanish National DNA Bank Carlos III (NUCLEUS, University of Salamanca) for technical assistance.

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and fondos FEDER (PI16/00642 and CIBERONC [CB16/12/00400]), Madrid, Spain; Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (SA013U16, FEDER), Valladolid, Spain; and Fundación Ramón Areces (CIVP16A1806), Madrid, Spain. M.J.-A. was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (PTA-2016)–Universidad de Salamanca. A. Mayado was supported by CIBERONC (CB16/12/00400). J.I.S.-G. was supported by Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (SA013U16), and FEDER. Spanish National DNA Bank Carlos III was supported by ISCIII and fondos FEDER (PT13/0001/0037 and PT17/0015/0044).

Authorship

Contribution: J.I.M.-G. performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript; M.J.-A., I.A.-T., and C.T. helped with the statistical analysis, the data analysis, and the review of the manuscript;

C.C. and A. Mayado helped with data analysis and reviewed the manuscript; Y.H., K.M.R., and A.G.T. analyzed data and reviewed the manuscript; A.H. provided patient clinical data and reviewed the manuscript; L.S.-M., A. Matito, J.I.S.-G., and N.D.-F. reviewed the manuscript; and J.D.M., J.R.G., L.E., A.O., and A.C.G.-M. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: J.I.M.-G., 0000-0001-8982-5663; N.D.-F., 0000-0002-9633-1749; A.O., 0000-0002-0007-7230; A.C.G.-M., 0000-0003-4360-1386.

Correspondence: Alberto Orfao, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: orfao@usal.es; and Andrés C. García-Montero, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: angarmon@usal.es.

References

1. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25(7):603-625.
2. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017;129(11):1420-1427.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
4. Akin C. Molecular diagnosis of mast cell disorders: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2006;8(4):412-419.
5. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727-5736.
6. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-521.
7. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Prognostically relevant breakdown of 123 patients with systemic mastocytosis associated with other myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(18):3769-3772.
8. Longley BJ Jr, Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(4):1609-1614.
9. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L; REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007;138(1):12-30.
10. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-2372.
11. Sotlar K, Colak S, Bache A, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol*. 2010;220(5):586-595.
12. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. KIT D816V-mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood*. 2016;127(6):761-768.
13. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122(14):2460-2466.
14. Bibi S, Langenfeld F, Jeanningros S, et al. Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):239-262.
15. Wilson TM, Maric I, Simakova O, et al. Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Haematologica*. 2011;96(3):459-463.
16. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia*. 2015;29(5):1115-1122.
17. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-143.
18. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900-904.
19. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3376-3382.
20. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.
21. Kar SA, Jankowska A, Makishima H, et al. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(1):107-113.
22. Tzankov A, Sotlar K, Muhlematter D, et al. Systemic mastocytosis with associated myeloproliferative disease and precursor B lymphoblastic leukaemia with t(13;13)(q12;q22) involving FLT3. *J Clin Pathol*. 2008;61(8):958-961.
23. Wang SA, Hutchinson L, Tang G, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *Am J Hematol*. 2013;88(3):219-224.
24. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.

25. Muñiz C, Teodosio C, Mayado A, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13(high) CD105(+) CD45(-) mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):169.
26. Kristensen T, Vestergaard H, Møller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn.* 2011;13(2):180-188.
27. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol.* 2015;28(8):1138-1149.
28. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome [published correction appears in *Nature* 2001;411(6838):720 and *Nature* 2001;412(6846):565]. *Nature.* 2001;409(6822):860-921.
29. Fu W, O'Connor TD, Jun G, et al; NHLBI Exome Sequencing Project. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants [published correction appears in *Nature* 2013;495(7440):270]. *Nature.* 2013;493(7431):216-220.
30. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al; 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
31. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291.
32. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3812-3814.
33. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-249.
34. Hanssens K, Brenet F, Agopian J, et al. SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica.* 2014;99(5):830-835.
35. DePristo MA, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011;43(5):491-498.
36. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079.
37. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26(6):841-842.
38. Hsu F, Kent WJ, Clawson H, Kuhn RM, Diekhans M, Haussler D. The UCSC known genes. *Bioinformatics.* 2006;22(9):1036-1046.
39. Karolchik D, Hinrichs AS, Furey TS, et al. The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D493-D496.
40. Bouliotis G, Billingham L. Crossing survival curves: alternatives to the log-rank test. *Trials.* 2011;12(suppl 1):A137.
41. Delgado J, Pereira A, Villamor N, López-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in hematologic malignancies: recommendations for clinicians. *Haematologica.* 2014;99(9):1410-1420.
42. Broesby-Olsen S, Kristensen TK, Møller MB, Bindslev-Jensen C, Vestergaard H; Mastocytosis Centre, Odense University Hospital (MastOUH). Adult-onset systemic mastocytosis in monozygotic twins with KIT D816V and JAK2 V617F mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3):806-808.
43. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood.* 2012;120(24):4846-4849.
44. De Vita S, Schneider RK, Garcia M, et al. Loss of function of TET2 cooperates with constitutively active KIT in murine and human models of mastocytosis. *PLoS One.* 2014;9(5):e96209.
45. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2011;25(7):1153-1158.
46. Damaj G, Joris M, Chandresris O, et al. ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS One.* 2014;9(1):e85362.
47. Traina F, Visconte V, Jankowska AM, et al. Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PLoS One.* 2012;7(8):e43090.
48. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al; Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-2074.
49. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214-218.
50. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol.* 2000;28(2):140-147.
51. Zhang J, Walsh MF, Wu G, et al. Germline mutations in predisposition genes in pediatric cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(24):2336-2346.
52. Walsh M, Wu G, Edmonson M, et al. Incidence of germline mutations in cancer-predisposition genes in children with hematologic malignancies: a report from the Pediatric Cancer Genome Project. *Blood.* 2014;124(21):127.
53. Furutani E, Shimamura A. Germline genetic predisposition to hematologic malignancy. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):1018-1028.
54. Kohlmann W, Schiffman JD. Discussing and managing hematologic germ line variants. *Blood.* 2016;128(21):2497-2503.
55. Mason CC, Khorashad JS, Tantravahi SK, et al. Age-related mutations and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* 2016;30(4):906-913.
56. Hirsch CM, Przychodzen BP, Radvovoyevitch T, et al. Molecular features of early onset adult myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2017;102(6):1028-1034.
57. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477-2487.

58. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498.
59. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010;24(6):1128-1138.
60. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3627, quiz 3699.
61. Thol F, Kade S, Schlarman C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578-3584.
62. Pardanani A, Lasho T, Elala Y, et al. Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: Derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. *Am J Hematol*. 2016;91(9):888-893.
63. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869.
64. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012;120(15):3080-3088.
65. Bejar R. Splicing factor mutations in cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;907:215-228.

Supplemental Text

METHODS

DNA extraction and molecular studies. gDNA was extracted from highly-purified BM cell populations using either the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) or the NucleoSpin Tissue XS kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for samples containing >100,000 cells and <100,000 cells, respectively. Peripheral blood (PB) gDNA was extracted by the salting-out method (Gentra Puregene Blood kit; Qiagen, Hilden, Germany), following the standard operating procedures of the Spanish National DNA Bank Carlos III (University of Salamanca, Salamanca, Spain; <http://www.bancoadn.org>). In turn, gDNA from hair was extracted using the micro-DNA Qiagen kit (QIAGEN, Valencia, CA) after discarding hair follicles. For the *KIT* D816V real-time allele-specific oligonucleotide PCR (ASO-qPCR)¹ assay, both the LightCycler thermocycler and the TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were used.

Identification of BM cell populations. BM MC were identified as CD117^{hi}CD45⁺CD34⁻CD3⁻CD14⁻, maturing neutrophils as CD45⁺CD34⁻CD117⁻CD3⁻CD14⁻SSCA^{hi} cells, mesenchymal stem cells as CD105⁺CD13^{hi}CD45⁻CD34⁻CD14⁻CD3⁻ and T lymphocytes corresponded to CD3⁺CD45⁺CD34⁻CD14⁻CD117⁻ cellular events

Whole genome sequencing analysis. Single nucleotide and indel variants were called using MuTect2² (version 3.6) to identify variants present in MC while absent or present at a very low levels in T-cells. Variants identified were manually inspected if: 1) allele

frequency $\geq 20\%$, and 2) a non-synonymous coding change was identified or they involved the invariant 2 bases of the donor or acceptor splice site. Integrative Genomics Viewer (version 2.3.81) was used to review the read sequence, base quality scores, and mapping scores across all 4 MC/T-lymphocyte pairs. The genomic context of the variant regions was further examined using the UCSC Genome Browser (hg19) (<http://genome.ucsc.edu/>). Features that were used to exclude potential somatic variants for further consideration, included: 1) < 3 variant reads in the neoplastic specimen, 2) variant reads that matched a region of the genome with ≥ 1 highly homologous regions, 3) equivalent percentages of mutant reads observed in MC and T-lymphocytes, and 4) common SNPs (MAF ≥ 0.01 that uniquely map with no “clinically associated” flag). All variants that passed the manual inspection were confirmed by Sanger sequencing. Reported mutant and total read counts, were calculated based on alt and ref read counts provided by MuTect2, and the mutated allele burden was calculated from these values.

Due to the low mutation burden, variants were filtered further to improve specificity and better calculate the somatic mutation load. The number of reads supporting a single nucleotide variant (SNV) in the normal samples was calculated using bam-readcount³ (version 0.7.4). SNV were filtered to remove variants with any of the following features: 1) < 3 supporting reads in tumor MC; 2) > 2 supporting reads in any of the T-cell specimens; 3) allele frequency $< 20\%$. All MC-restricted SNVs for patient #9 were manually reviewed. Since the number of SNV calls in patients #10, #13, and #14 were > 250 , 25 randomly selected SNVs from each of these three cases (n=75), were manually reviewed and 90.7% passed the manual inspection. Similarly, indel variants were filtered to remove variants with any of the following: 1) < 3 supporting reads; 2) allele frequency $< 20\%$; 3) indels included in or within 10 bp of the RepeatMasker regions (table rmsk, downloaded Dec. 12, 2016 from the UCSC Table

Browser)^{4,5}; 4) indels included in a segmental duplication (table genomicSuperDups, downloaded Dec. 19, 2016 from the UCSC Table Browser⁴); 5) indels included in a region with mappability = 0 in the “Duke Uniqueness 20 bp Track” (table wgEncodeDukeMapabilityUniqueness20bp, downloaded Dec. 19, 2016 from the UCSC Table Browser)^{4,6}. To evaluate the resulting MC-restricted indels, we manually curated all indels from each of the cases.

1. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn.* 2011;13(2):180-188.
2. <https://software.broadinstitute.org/gatk/blog?tag=mutect2> M.
3. <https://github.com/genome/bam-readcount> b-r.
4. Karolchik D, Hinrichs AS, Furey TS, et al. The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):493-496.
5. Smit AFA HR, Green P. RepeatMasker Open-3.0. <http://www.repeatmasker.org>. 1996-2010.
6. Derrien T, Estelle J, Marco Sola S, et al. Fast computation and applications of genome mappability. *PLoS One.* 2012;7(1):303-377.

Supplemental Table S-1.- Immunophenotypic markers used for the identification and isolation of bone marrow neutrophils, mast cells, monocytes and T cells.

MARKER	ANTIBODY CLONE	FLUOROCHROME CONJUGATE	MANUFACTURER
CD3	UCHT1	PacB	BD Bioscience
CD13	WM15/L138	APC/PE	Beckman Coulter
CD14	M ϕ P9	APC-H7	BD Bioscience
CD34	8G12	PerCPCy5.5 / APC	BD Bioscience
CD45	HI30	PacO	Invitrogen
CD105	166707/1G2	FITC/PE	R&D Systems/ Beckman Coulter
CD117	104D2D1	PECy7	BeckmanCoulter
MSCA-1	W8B2	PE	Miltenyi Biotec

APC, allophycocyanine; Cy7, cyanine7; FITC, fluorescein isothiocyanate; H7, Hilite7; PacB, pacific blue; PE, phycoerythrin; PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein–cyanine5.5; PacO, pacific orange. BD Biosciences, San Diego, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Beckman Coulter, Hialeah, FL; R&D Systems, Minneapolis, MN; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany.

Supplemental Table S-2.- List and type of mutations found in SM patients (n=20) according to the pattern of involvement of the different BM cell compartments analyzed and hair, and their corresponding allele burden.

Patient ID	Pattern of cell lineages involved by the mutation				Amino acid changes	Reference sequence transcript ID	BM MC Mutated allele burden	BM neutrophils Mutated allele burden	Literature citations	COSMIC ID
	MC-Restricted	Multiple myeloid lineages	Myeloid plus lymphoid lineages	Germline genetic variants or early acquired mutations						
#1		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	45%	NA	854	COSM1314
#2				<i>EP400</i>	p.V295I	NM_015409.4	50%	NA	-	
#2		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	45%	NA	854	COSM1314
#3		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	41%	NA	854	COSM1314
#3			<i>RECQL4</i>		p.N616S	NM_004260.3	49%	NA	-	
#3			<i>MSD2</i>		p.Q295L	NM_133330.2	53%	NA	-	
#4			<i>DCC</i>		p.R211L	NM_005215.3	52%	NA	-	
#4		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	46%	NA	854	COSM1314
#5	<i>ITGA10</i>				p.F420L	NM_003637.3	32%	NA	-	
#5		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	47%	NA	854	COSM1314
#6		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	51%	NA	854	COSM1314
#7			<i>CSF1R</i>		p.N255I	NM_005211.3	51%	NA	1	COSM5019188
#7		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	24%	NA	854	COSM1314
#7			<i>MARK4</i>		p.G374C	NM_031417.3	54%	NA	-	
#7		<i>RUNX1</i>			p.N146K	NM_001754.4	50%	NA	-	
#8		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	42%	14%	854	COSM1314
#8			<i>SYNE1</i>		p.R7753H	NM_182961.3	47%	47%	2	COSM1074697
#9			<i>IGF2R</i>		p.S828L	NM_000876.2	54%	NA	-	
#9			<i>ITPKA</i>		p.R741W	NM_002344.5	46%	NA	-	
#9		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	47%	NA	854	COSM1314
#10			<i>HSP90AA1</i>		p.T274A	NM_001017963.2	48%	51%	-	
#10		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	38%	14%	854	COSM1314
#11		<i>DNMT3A</i>			p.R882C	NM_022552.4	50%	NA	192	COSM53042
#11	<i>EZH2</i>				p.R583Q	NM_004456.4	40%	NA	-	
#11		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	49%	NA	854	COSM1314
#11	<i>SF3B1</i>				p.K700E	NM_012433.2	46%	NA	465	COSM84677
#12		<i>ASXL1</i>			p.*1542fs	NM_015338.5	63%	50%	1	COSM914371
#12			<i>DCC</i>		p.P1353L	NM_005215.3	50%	53%	-	
#12		<i>DNMT3A</i>			p.R882H	NM_022552.4	62%	50%	459	COSM52944
#12	<i>IKZF1</i>				p.N159S	NM_006060.4	38%	0%	-	
#12		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	46%	16%	854	COSM1314
#13		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	44%	15%	854	COSM1314
#13			<i>SDHC</i>		p.A3E	NM_003001.3	50%	49%	-	

Supplemental Table S-2.- List and type of mutations found in SM patients (n=20) according to the pattern of involvement of the different BM cell compartments, analyzed and their corresponding allele burden. (Continued)

Patient ID	Pattern of cell lineages involved by the mutation				Amino acid changes	Reference sequence transcript ID	BM MC Mutated allele burden	BM neutrophils Mutated allele burden	Literature citations	COSMIC ID
	MC-Restricted	Multiple myeloid lineages	Myeloid plus lymphoid lineages	Germline genetic variants or early acquired mutations						
#14			<i>EPHA7</i>		p.Q809R	NM_004440.3	37%	NA	1	COSM4649765
#14			<i>KIT</i>		p.D816V	NM_000222.2	52%	NA	854	COSM1314
#14	<i>PIK3CD</i>				p.L598P	NM_005026.3	37%	NA	-	
#15			<i>DST</i>		p.Y8T	NM_015548.4	48%	NA	-	
#15		<i>EZH2</i>			p.L50W	NM_004456.4	44%	NA	-	
#15		<i>IKZF1</i>			p.N159S	NM_006060.4	46%	NA	-	
#15		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	51%	NA	854	COSM1314
#16			<i>CREBBP</i>		p.P153L	NM_004380.2	49%	52%	-	
#16		<i>KIT</i>			p.D816V	NM_000222.2	37%	1%	854	COSM1314
#16		<i>SRSF2</i>			p.P95R	NM_003016	NA	NA	95	COSM211661
#16		<i>TET2</i>			p.N275I	NM_017628.4	50%	53%	-	
#17		<i>ASXL1</i>			p.R693*	NM_015338.5	45%	NA	20	COSM132980
#17	<i>KAT6B</i>				p.E1360del	NM_012330.3	35%	NA	-	
#17			<i>KIT</i>		p.D816V	NM_000222.2	47%	NA	854	COSM1314
#17		<i>RUNX1</i>			p.V238fs	NM_001754.4	45%	NA	1	COSM24772
#18			<i>EPHB6</i>		p.F716S	NM_004445.4	69%	48%	-	
#18		<i>EZH2</i>			p.N608K	NM_004456.4	45%	49%	-	
#18			<i>KIT</i>		p.D816V	NM_000222.2	48%	46%	854	COSM1314
#18			<i>LRP1B</i>		p.R3239C	NM_018557.2	47%	43%	-	
#18		<i>ROS1</i>			p.N2333K	NM_002944.2	51%	48%	-	
#18			<i>RPS6KA2</i>		p.G487fs	NM_001006932.1	49%	51%	-	
#18		<i>SF3B1</i>			p.K666T	NM_012433.2	50%	46%	20	COSM131556
#19			<i>CYP2C19</i>		p.D360E	NM_000769.1	47%	48%	1	COSM3441969
#19		<i>EZH2</i>			p.I146T	NM_004456.4	30%	48%	-	
#19			<i>KIT</i>		p.D816V	NM_000222.2	8%	5%	854	COSM1314
#19			<i>LRP1B</i>		p.G4423D	NM_018557.2	54%	49%	-	
#19			<i>TCF3</i>		p.S72C	NM_001136139.2	48%	52%	-	

Supplemental Table S-2.- List and type of mutations found in SM patients (n=20) according to the pattern of involvement of the different BM cell compartments, analyzed and their corresponding allele burden. (Continued)

Patient ID	Pattern of cell lineages involved by the mutation				Amino acid changes	Reference sequence transcript ID	BM MC Mutated allele burden	BM neutrophils Mutated allele burden	Literature citations	COSMIC ID
	MC-Restricted	Multiple myeloid lineages	Myeloid plus lymphoid lineages	Germline genetic variants or early acquired mutations						
#20				<i>ADGRB3</i>	p.S757L	NM_001704.2	43%	45%	-	
#20		<i>CDH11</i>			p.P169L	NM_001797.2	25%	35%	2	COSM4796098
#20		<i>ICK</i>			p.G16S	NM_014920.3	29%	36%	-	
#20			<i>KIT</i>		p.D816V	NM_000222.2	20%	13%	854	COSM1314
#20				<i>MBD1</i>	p.E302Q	NM_002384.2	53%	53%	-	
#20				<i>MUC1</i>	p.A180T	NM_002456.5	52%	53%	-	
#20				<i>NFKB2</i>	p.R658W	NM_001077494.3	47%	48%	1	COSM914184
#20				<i>NOTCH4</i>	p.R157W	NM_004557.3	49%	49%	1	COSM3872974
#20		<i>SRSF2</i>			p.P95R	NM_003016	NA	NA	95	COSM211661
#20		<i>RUNX1</i>			p.N109T	NM_001754.4	25%	13%	-	
#20				<i>SOCS1</i>	p.R181C	NM_003745.1	35%	46%	2	COSM4170731
#20		<i>TET2</i>			p.E368*	NM_017628.4	91%	97%	1	COSM41898

Mutated allele burden in BM MC and neutrophil cell populations expressed as percentage of total genetic sequence reads. Literature citations represent the number of times those mutations have been cited, according to the COSMIC database (v85, released 08-MAY-18); del, deletion; fs, frameshift mutation; ID, patient code number used to identify patients analyzed in this study; NA, not available; -, not yet registered in the COSMIC database; *, stop codon.

Supplemental Table S-3.- List of mutations found in the second cohort of 14 advanced SM patients included in this study and their corresponding allele burden.

Patient ID	Gene	Amino acid change	Reference sequence transcript ID	BM allele burden	Literature citations	COSMIC ID
#21	<i>SF3B1</i>	p.K666T	NM_012433	15%	32	COSM131556
#23	<i>RUNX1</i>	p.R166Q	NM_001754	40%	19	COSM36055
#24	<i>RUNX1</i>	p.R162K	NM_001754	88%	21	COSM96546
#25	<i>TET2</i>	p.H192Y	NM_001127208	44%	-	
#25	<i>ASXL1</i>	p.I641fs	NM_015338	49%	3	COSM6017849
#28	<i>KAT6B</i>	p.C1704F	NM_012330	55%	-	
#28	<i>DNMT3A</i>	p.N879D	NM_175629	28%	4	COSM1583135
#28	<i>RUNX1</i>	p.R162K	NM_001754	90%	21	COSM96546
#29	<i>SRSF2</i>	p.P95R	NM_003016	43%	105	COSM211661
#29	<i>RUNX1</i>	p.A142T	NM_001754	40%	-	
#30	<i>SRSF2</i>	p.P95A	NM_003016	43%	6	COSM307352
#31	<i>RUNX1</i>	p.R107C	NM_001754	29%	17	COSM24736
#32	<i>RUNX1</i>	p.P86fs	NM_001754	54%	-	
#32	<i>EZH2</i>	p.Q545X	NM_004456	81%	1	COSM3366844
#33	<i>ROS1</i>	p.S252A	NM_002944	52%	-	

Mutated allele burden in BM expressed as percentage of total genetic sequence reads. Literature citations represent the number of times those mutations have been cited, according to the COSMIC database (v85, released 08-MAY-18); ASM, aggressive systemic mastocytosis; fs, frameshift mutation; ID, patient code number used to identify patients analyzed in this study; NA, not available; ID, patient code number used to identify patients analyzed in this study; SM-AHN, systemic mastocytosis associated with another neoplasm; -, not yet registered in the COSMIC database.

Supplemental Table S-4.- Whole genome and targeted sequencing metrics for each SM patient analyzed from the first cohort (n=20)

Patient ID	Purified BM cell population analyzed	Gross mapping yield (Gb)*	Average coverage (total reads)	% Genome with coverage ≥ 20 reads	% Exome with coverage ≥ 20 reads
#1	BM mast cells		45.3		100
#2	BM mast cells		47.1		100
#3	BM mast cells		48.6		100
#4	BM mast cells		48.9		100
#5	BM mast cells		39.5		100
#6	BM mast cells		50.8		100
#7	BM mast cells		45.9		100
#8	BM mast cells		44.8		100
	BM mast cells		48.8		100
#9	BM mast cells	119.7	41.9	97.8	97.0
	BM T lymphocytes	146.6	51.3	98.8	98.7
	BM mast cells		45.7		100
#10	BM mast cells	124.1	43.4	97.5	97.3
	BM T lymphocytes	151.4	53.0	99.0	97.9
#11	BM mast cells		47.0		100
#12	BM mast cells		51.4		100
	BM mast cells		48.9		100
#13	BM mast cells	124.8	43.7	97.5	95.3
	BM T lymphocytes	148.1	51.8	98.9	98.7
	BM mast cells		42.0		100
#14	BM mast cells	154.2	53.9	98.8	98.4
	BM T lymphocytes	137.7	48.2	98.6	98.6
#15	BM mast cells		46.7		100
#16	BM mast cells		47.0		100
#17	BM mast cells		51.0		100
#18	BM mast cells		51.2		100
#19	BM mast cells		41.7		83.3
#20	BM mast cells		42.6		100

*Gross mapping yield and other genome sequencing metrics were calculated after removal of duplicate reads. BM, bone marrow, Gb, gigabytes; ID, patient code number used to identify patients analyzed in this study.

Supplemental Table S-5.- Non-synonymous coding and splice site genetic variants restricted to MC as identified by whole genome sequencing performed in a subset of four SM patients.

Patient ID	Gene name	Reference sequence transcript ID	Nucleotide change	Amino acid change	BM MC Mutated allele burden (mutant/total reads)	Literature citations	COSMIC ID
#9	-	-	-	-	-	-	-
	MMS22L	NM_198468.2	c.268A>G	p.R90G	56% (30/54)	-	-
	COG4	NM_015386.2	c.1252C>A	p.Q418K	46% (18/39)	-	-
#10	ANKRD12	NM_015208.4	c.3247A>C	p.M1083L	39% (14/36)	-	-
	ZNF544	NM_014480.3	c.1718A>G	p.E573G	32% (12/38)	-	-
	ERBB4	NM_005235.2	c.2203-1G>A	splice variant	39% (17/44)	1	COSM5608619
#13	PFAS	NM_012393.2	c.337C>A	p.L113M	41% (13/32)	-	-
	HIRA	NM_003325.3	c.2848G>C	p.G950R	31% (8/26)	-	-
	PIK3CD	NM_005026.3	c.1721T>C	p.L574P	33% (18/54)	-	-
#14	NCSTN	NM_015331.2	c.967C>A	p.R323S	56% (28/50)	-	-
	RBMX	NM_002139.3	c.1072C>G	p.P358A	21% (9/43)	-	-

Mutated allele burden in purified BM MC expressed as percentage of total genetic sequence reads. Literature citations represents the number of times those mutations have been cited, according to the COSMIC database (v85, released 08-MAY-18); ID, patient code number used to identify patients analyzed in this study; -, not yet registered in the COSMIC database.

Supplemental Table S-6.- Clinical and laboratory features of SM patients at last follow-up.

Patient ID	Leukocytes (x10 ⁹ /L)	Cytopenia	Monocytes (x10 ⁹ /L)	Neutrophils (x10 ⁹ /L)	Eosinophils (x10 ⁹ /L)	Hemoglobin (g/L)	Platelets (x10 ⁹ /L)	LDH (U/L)	SAP (U/L)	Albumin (g/L)	Splenomegaly	Hepatomegaly
#1	4.5	NO	0.4	1.8	0.1	118	134	230	<150	>35	NO	NO
#2	14.4	NO	0.9	7.8	1.1	141	350	260	<150	>35	NO	NO
#3	7.1	NO	0.4	5	0.2	148	170	159	<150	>35	NO	NO
Subtotal	7.1 (4.5-14.4)		0.4 (0.4-0.9)	5 (1.8-7.8)	0.2 (0.1-1.1)	141 (118-148)	170 (134-350)	230 (159-260)				
#4	9	NO	0.6	5.4	0.7	144	291	208	<150	>35	YES	NO
#5	2.9	NO	0.2	2.3	0.1	120	100	286	<150	>35	YES	NO
#6	4.6	NO	0.2	3	0.1	123	113	200	<150	>35	YES	YES
#7	8.8	YES	2.5	0.6	0.7	139	130	289	>150	>35	YES	YES
#8	8.1	NO	0.74	2.8	0.1	116	451	114	>150	>35	YES*	YES*
#9	3.4	NO	0.4	4.2	0.1	115	292	130	<150	>35	YES*	YES*
#10	2.6	YES	0.1	2	0.1	132	206	208	>150	>35	NO	YES*
#11	4	YES	0.3	2.7	0.1	94	107	196	>150	NA	NO	YES*
#12	1.2	YES	0.2	0.8	0.1	102	50	314	>150	NA	YES*	NO
#13	9.1	NO	0.5	4.4	1.4	126	321	472	<150	<35	NO	YES
#14	6.7	NO	0.3	4.4	0.5	134	126	221	<150	>35	YES	YES*
#15	16.4	NO	0.8	11.5	0.1	98	40	NA	<150	<35	YES*	NO
#16	13.3	NO	2.1	8.1	1.3	148	20	361	>150	<35	YES*	YES
#17	22.7	NO	3.1	11.1	3.4	101	130	374	196	>35	YES	YES
#18	20.5	NO	0.6	6.8	0.3	86	60	214	>150	>35	YES	YES
#19	3.2	NO	4	NA	NA	104	133	200	>150	>35	YES*	NO
#20	5.3	YES	0.3	1.6	0.4	107	61	407	>150	>35	YES*	YES*
#21	3.3	YES	0.3	2.1	0.1	115	252	219	<150	<35	NO	NO
#22	6.9	NO	0.2	4.6	0.1	139	319	173	<150	<35	NO	NO
#23	4.2	YES	0.2	0.3	0.2	101	16	369	>150	<35	YES	YES
#24	3.2	NO	0.2	2.5	0.3	147	185	310	<150	<35	YES*	NO
#25	3.1	NO	0.2	2.1	0.2	146	142	270	>150	<35	YES	YES
#26	5.7	YES	0.2	1.1	0.1	97	26	454	>150	>35	YES	YES
#27	5	YES	0.4	3.5	0.1	126	35	263	<150	>35	YES	YES
#28	11.7	NO	1.4	3	0.2	136	135	458	>150	>35	YES	YES
#29	1.6	YES	0.03	0.6	0.1	88	204	257	<150	<35	YES	NO
#30	3.3	YES	0.5	1.2	0.2	144	225	197	<150	<35	NO	NO
#31	3.9	NO	0.4	2.6	0.1	142	185	234	<150	<35	YES	NO
#32	5.5	NO	0.4	3.2	0.4	132	298	198	>150	>35	YES	YES
#33	2.5	NO	0.1	2	0.1	115	146	201	<150	<35	YES	YES
#34	4.4	NO	0.2	2.6	0.1	143	164	194	<150	<35	YES	NO
Subtotal	4.4 (1.2-22.7)		0.3 (0.03-4)	2.6 (0.3-11.5)	0.2 (0.1-3.4)	123 (86-148)	133 (16-451)	221 (114-472)				
Total	4.7 (1.2-22.7)		0.4 (0.03-4)	2.7 (0.3-11.5)	0.2 (0.08-3.4)	125 (86-148)	134.5 (16-451)	225.5 (114-472)				

Results expressed as median (range). Abbreviations: ID, patient code number used to identify patients analyzed in this study; LDH, lactate dehydrogenase; NA, not available; SAP, serum alkaline phosphatase, * with organ failure.

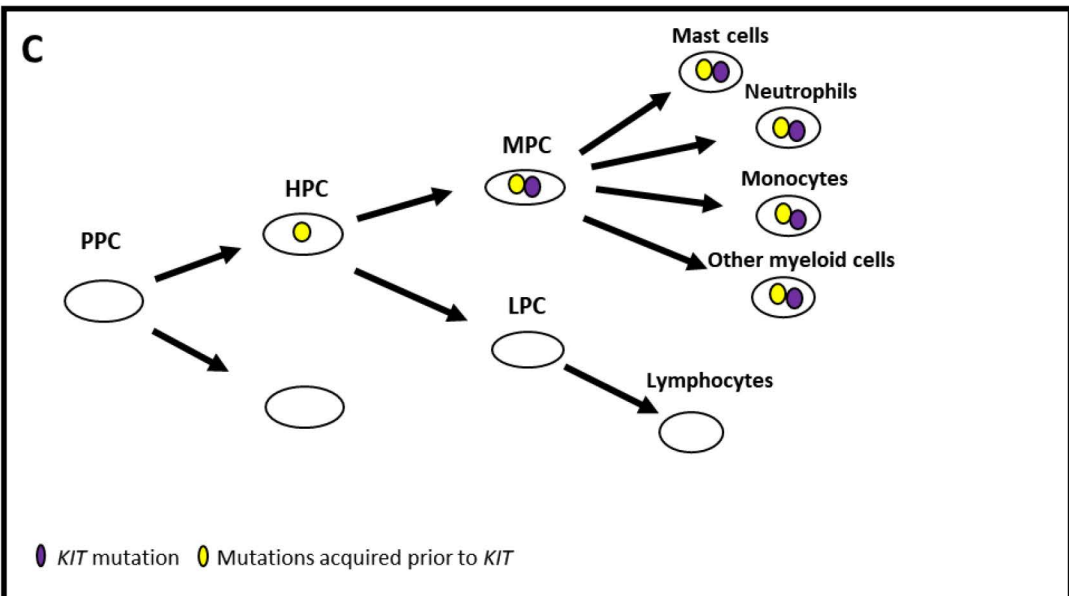
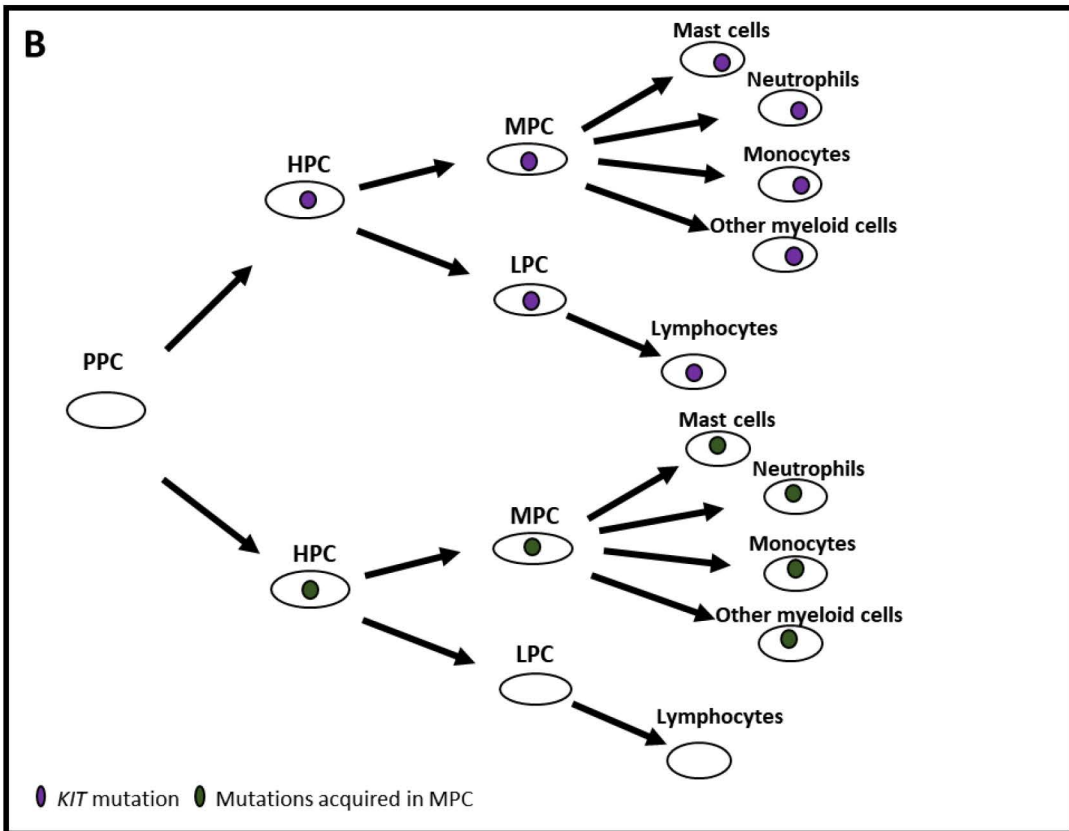
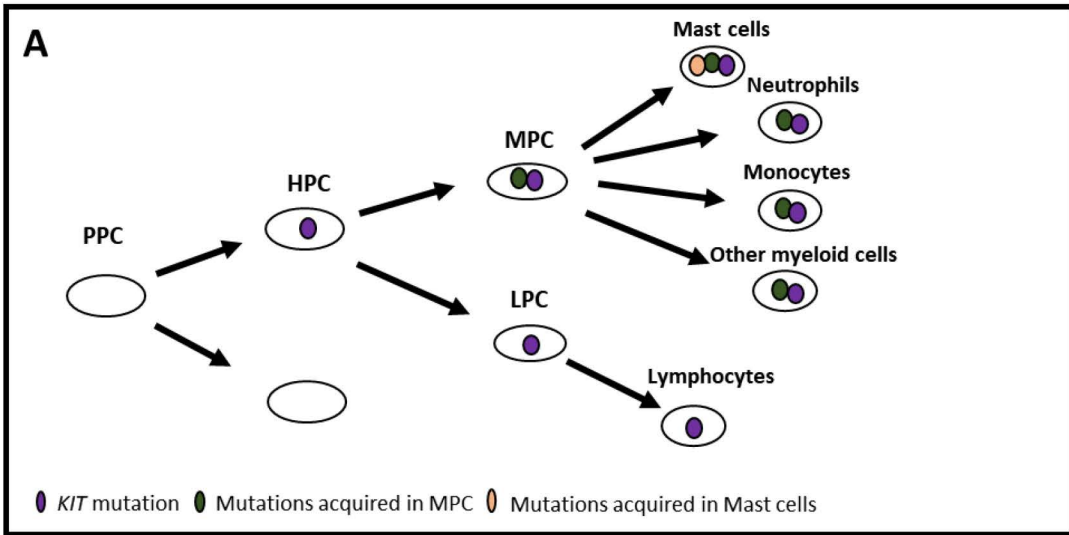
Supplemental Table S-7.- Cytoreductive treatment received and response of the SM patients at last follow-up.

Patient ID	Indication for cytoreductive therapy	Cytoreductive treatment	Response	Adverse events
#1	MRS	cladribine	Yes (PR)	Neutropenia
#2	No	No	-	-
#3	No	No	-	-
#4	No	No	-	-
#5	MRS	IFN-2 α + cladribine	Yes (PR)	Thrombocytopenia, asthenia
#6	MRS	cladribine	Yes (PR)	No
#7	No	No	-	-
#8	MRS	IFN-2 α + hydroxyurea	Yes (PR)	Increased MC-related symptoms
#9	Severe hepatosplenomegaly, MRS	cladribine	Yes (PR)	No
#10	MRS, BP	IFN-2 α + cladribine	Yes (PR)	Neutropenia, anemia
#11	MRS	cladribine	Yes (PR)	Pneumonia
#12	Severe splenomegaly, MRS	IFN-2 α + cladribine	Yes (PR)	No
#13	No	No	-	-
#14	MRS	IFN-2 α + cladribine	Yes (PR)	No
#15	No	No	-	-
#16	Severe organomegaly, MRS	hydroxyurea	Yes (PR)	Thrombocytopenia
#17	AML	idarubicin + cytarabine	No	NA
#18	MRS	hydroxyurea	No	Depression, diarrhea
#19	AML	Yes (NA)	No	Bone marrow failure
#20	Severe organomegaly, MRS	IFN-2 α + hydroxyurea	No	Weight loss, nausea, anemia
#21	MRS	hydroxyurea	No	Anemia
#22	MGUS	No	-	-
#23	AML	cladribine + idarubicin + cytarabine	Yes (CR)	Cytopenia, pneumonia, haemorrhages
#24	Severe splenomegaly, MRS	IFN-2 α + cladribine	Yes (PR)	Neutropenia, diarrhea
#25	MGUS	No	-	-
#26	AML	Yes (NA)	No	NA
#27	AML	Yes (NA)	NA	NA
#28	MRS	hydroxyurea	Yes (PR)	No
#29	AML	idarubicin + cytarabine + mitoxantrone	Yes (PR)	NA
#30	MDS	antithymocyte globulin + ciclosporin	Yes (CR)	Cytopenias
#31	MRS	cladribine	Yes (PR)	Leucopenia
#32	MRS	cladribine	Yes (PR)	No
#33	MRS	IFN-2 α + cladribine	Yes (PR)	Nausea
#34	MRS	cladribine	Yes	No

Abbreviations: **AML**, acute myeloid leukemia; **BP**, Severe bone pain secondary to patchy bone sclerosis; **CR**, complete response; **ID**, patient code number used to identify patients analyzed in this study; **MDS**, myelodysplastic syndrome; **MGUS**, monoclonal gammopathy of undetermined significance; **MRS**, severe mast cell mediator-related symptoms refractory to intensive antimediator therapy; **NA**, data on specific therapy not available; **PR**, partial response.

Supplemental Figure S-1. Proposed clonal hierarchy models for acquisition of different mutations, in addition to *KIT* D816V, in SM patients. Models A and B represent patients in which *KIT* emerges as the first mutation, on a same cell clone (model A) or in two different clones (model B). Model C represents those patients in which *KIT* and other mutation/s coexist on the same cell populations, but in which *KIT* emerges as a second event after the other mutation/s.

Abbreviations: HPC, hematopoietic precursor cell; LPC, lymphoid precursor cell; MPC, myeloid precursor cell; PPC, pluripotent precursor cell.



Artículo 2: “Frecuencia e impacto pronóstico de la mutación de *KIT* y de otras variantes genéticas en mastocitosis sistémica indolente”

Introducción. Entre 5% y 10% de los pacientes diagnosticados de ISM progresan hacia formas más avanzadas de la enfermedad, llegando en tal caso a acortar la esperanza de vida de estos pacientes. Debido a que la mutación D816V de *KIT* está presente en la gran mayoría de las SM ($\geq 90\%$), afectando tanto a formas indolentes como avanzadas de la enfermedad, esta mutación, por sí sola, no permite explicar la progresión a formas más avanzadas de la enfermedad observada en el subgrupo de pacientes con ISM que sufre una transformación maligna de la enfermedad. Sin embargo, la adquisición temprana de la mutación D816V en células stem mesenquimales (MSC) y en células stem hematopoyéticas (HSC), junto a la afectación multilineal de la MO por la mutación de *KIT* se han asociado a una mayor tasa de progresión y un peor pronóstico dentro de las ISM; ambos hallazgos constituyen además una característica casi universal de las AdvSM, en las que simultáneamente se ha demostrado la coexistencia de otras mutaciones adicionales en genes diferentes de *KIT*. Cabe señalar además, que algunas de estas mutaciones adicionales que se han asociado a peor pronóstico entre las AdvSM son compartidas de forma recurrente, con otras neoplasias de origen mielóide. Pese a la posible relevancia clínica y patogénica de estas mutaciones, en la actualidad se desconoce cuál es su frecuencia real en pacientes con ISM, y su posible impacto en la progresión de la enfermedad a formas más avanzadas de la misma.

Objetivo. Establecer la frecuencia y el impacto pronóstico de variantes genéticas de tipo somático que afectan a genes diferentes de *KIT*, en pacientes diagnosticados de ISM.

Pacientes, materiales y métodos. En conjunto, se secuenciaron de forma completa un total de 18 genes (*ASXL1*, *CBL*, *CDH11*, *DNMT3A*, *EPHA7*, *EZH2*, *ICK*, *IKZF1*, *ITGA10*, *JAK2*, *KAT6B*, *KRAS*, *PIK3CD*, *ROS1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2* y *TET2*) seleccionados por estar alterados en estudios previos en pacientes con SM. Las alteraciones de estos genes se estudiaron en una serie de 322 pacientes (170 hombres y

152 mujeres) con diagnóstico inicial de ISM, distribuidos en una cohorte de exploración (n=200) y una serie de validación (n=122).

Resultados. En conjunto, identificamos 71 variantes genéticas que afectaban a 55 de los 322 pacientes analizados (17%). Desde el punto de vista pronóstico, aquellos pacientes que albergaban variantes genéticas de naturaleza patogénica en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A* (panel A/R/D), con una carga alélica $\geq 30\%$, mostraron tasas de PFS y OS significativamente disminuidas ($p < .001$) respecto a los demás casos. El análisis multivariante demostró que niveles séricos elevados ($> 2.5 \mu\text{g/mL}$) de $\beta 2$ -microglobulina (hazard ratio –HR-: 9.8; $p = .001$) junto a una carga alélica de la mutación D816V de *KIT* en MO $\geq 1\%$ (HR: 10.1; $p = .02$) y la presencia de variantes patogénicas en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A* con una carga alélica $\geq 30\%$ (HR: 4.2; $p = .02$), constituían la mejor combinación de factores pronósticos independientes a la hora de predecir la PFS de pacientes con ISM. A su vez, la presencia de variantes patogénicas (con carga alélica $\geq 30\%$) en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A* representaba el único parámetro con valor pronóstico independiente a la hora de predecir la OS (HR: 51.8; $p < .001$) de pacientes con ISM.

Conclusiones. En conjunto, estos resultados demuestran que además de la carga alélica de *KIT* en MO y de los niveles séricos de $\beta 2$ -microglobulina, debería evaluarse en todos los pacientes recién diagnosticados de ISM la posible presencia de mutaciones en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y *DNMT3A*, con el fin de poder realizar una estratificación de riesgo más precisa, que permita identificar ya al diagnóstico, aquellos pacientes con ISM y alto riesgo de transformación maligna y/o muerte. Esto permitiría reconocer ya al diagnóstico qué casos se beneficiarían de un seguimiento más estrecho y eventualmente, de la administración temprana de tratamiento citostático y/o citorreductor.

MYELOID NEOPLASIA

Frequency and prognostic impact of *KIT* and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis

Javier I. Muñoz-González,^{1,4} Iván Álvarez-Twose,^{2,3,5} María Jara-Acevedo,^{2,4,6} Ana Henriques,^{2,3,5} Esther Viñas,^{2,6} Carlos Prieto,⁷ Laura Sánchez-Muñoz,^{2,3,5} Carolina Caldas,^{1,4} Andrea Mayado,^{1,4} Almudena Matito,^{2,3,5} Noelia Dasilva-Freire,^{1,4} Alberto Orfao,^{1,4,*} and Andrés C. García-Montero^{1,4,*}

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service, NUCLEUS, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Spanish Network on Mastocytosis, Toledo and Salamanca, Spain; ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain; ⁴Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ⁵Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha, Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain; and ⁶Sequencing Service and ⁷Bioinformatics Service, NUCLEUS, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

KEY POINTS

- D816V *KIT* allele frequency in BM, higher sβ2M levels, and A/R/D pathogenic mutations identify ISM cases at very high risk for progression.
- Pathogenic mutations in the A/R/D genes identify ISM cases with multilineal *KIT* and poorer prognosis.

Indolent systemic mastocytosis (ISM) patients have a normal life expectancy, except in the 5% to 10% of cases that progress to more advanced SM (advSM), which has a significantly poorer outcome. Mutations in genes other than *KIT* frequently found in myeloid neoplasms have been associated with a poorer outcome among advSM, whereas limited information exists about their frequency and prognostic impact in ISM. We investigated the frequency and prognostic impact of variants in 18 genes, found to be altered in advSM, in 322 ISM patients (median follow-up, 5.7 years) divided into discovery (n = 200) and validation (n = 122) cohorts. Overall, 71 genetic variants were detected in 55 of 322 (17%) patients. Mutated ISM cases, particularly those carrying *ASXL1*, *RUNX1*, and/or *DNMT3A* (A/R/D) pathogenic variant allele frequencies (VAFs) ≥ 30%, exhibited significantly shortened (P < .001) progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Multivariate analysis showed that serum β2-microglobulin (sβ2M) levels > 2.5 μg/mL (hazard ratio [HR], 9.8; P = .001), together with a *KIT*D816V VAF ≥ 1% in bone marrow (BM) (HR, 10.1; P = .02) and

pathogenic variants of A/R/D VAFs ≥ 30% (HR, 4.2; P = .02), were the best combination of independent predictors for PFS. In turn, A/R/D gene pathogenic VAF ≥ 30% was the only independent predictor for OS (HR, 51.8; P < .001). Based on these variables, 2 scoring systems were constructed for risk stratification of ISM at diagnosis with significantly different 10-year PFS (100%, 91%, 0% for scores of 0, 1, ≥2, respectively) and OS (100% and 50% for scores of 0 and 1) rates. (*Blood*. 2019;134(5):456-468)

Introduction

Indolent systemic mastocytosis (ISM) is the most prevalent subtype of systemic mastocytosis (SM) in adults.¹⁻³ Overall, ISM patients display a good prognosis with a similar outcome to that of the general population¹; however, in 5% to 10% of cases, the disease will (eventually) progress to more advanced forms of SM (ie, smoldering SM [SSM], aggressive SM [ASM], mast cell leukemia [MCL], and SM associated with another hematologic neoplasm [SM-AHN]) with a significantly reduced life expectancy.⁴⁻⁶

So far, few studies have investigated those variables that might contribute to identify ISM patients at risk for disease progression and death. In these studies, age at diagnosis >60 years and increased serum alkaline phosphatase (SAP), serum/plasma interleukin-6, and serum β2-microglobulin (sβ2M) levels, as well as multilineal involvement of bone marrow (BM) hematopoiesis by the *KIT* D816V mutation (multilineal *KIT*), presence of *KIT*

D816V-mutated BM mesenchymal stem cells (MSCs), splenomegaly, and/or a more immature immunophenotype of mast cells (MCs) by flow cytometry, have all been associated with progression to advanced SM (advSM).^{4,7-9} Of note, among these variables, only increased sβ2M levels and multilineal *KIT* have proven to be of independent prognostic value for progression-free survival (PFS),⁴ whereas age and SAP were the only independent predictors for overall survival (OS) described so far for ISM,⁴ as was confirmed recently in a large retrospective study.¹⁰ Altogether, these findings suggest that an increased percentage of *KIT*-mutated BM hematopoietic cells, together with a chronic proinflammatory immune response, might provide the basis for the progression of ISM to advSM by, for example, potentially providing the required microenvironment and genetic instability for the acquisition of additional mutations in *KIT*-mutated and nonmutated hematopoietic cells that might ultimately trigger disease progression with the potential for a shortened OS.

In the last decade, numerous mutations in multiple genes, particularly in genes involved in other non-MC myeloid neoplasias (eg, *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IDH1/2*, *U2AF1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, and *TET2*), have been reported in SM patients, in addition to *KIT* D816V or other rare *KIT* mutations.¹¹⁻¹⁵ Interestingly, a higher number of mutated genes, together with the presence of *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, and/or *EZH2* gene mutations, have been recurrently reported as independent adverse prognostic factors for OS in SM.^{12,15} However, the frequency of mutations in these and other genes has only been investigated in small series of ISM cases (10 patients,¹³ 15 patients,¹⁴ 44 patients,¹⁶ 20 patients,¹⁷ and 12 patients¹⁵) with a rather limited follow-up (median of 8 months,¹³ 24 months,¹⁴ 25 months,¹⁶ 40 months,¹⁷ and 78 months,¹⁵ respectively). Therefore, the frequency and prognostic impact of mutations in genes other than *KIT* on the outcome of ISM remain largely unknown.

Here, we investigated the frequency and prognostic impact of genetic variants in 18 genes previously found to be recurrently altered in SM (*ASXL1*, *CBL*, *CDH11*, *DNMT3A*, *EPHA7*, *EZH2*, *ICK*, *IKZF1*, *ITGA10*, *JAK2*, *KAT6B*, *KRAS*, *PIK3CD*, *ROS1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*),¹²⁻¹⁶ in parallel with the pattern of involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* D816V, D816H, and D816Y mutations (ie, multilineal *KIT* and presence of *KIT*-mutated MSCs and uncommitted hematopoietic precursor cells), as well as the *KIT* variant allele frequency (VAF) in BM and in peripheral blood (PB) and other previously defined clinical and laboratory prognostic factors, in a large series of 322 ISM patients with a long follow-up grouped into discovery (n = 200) and validation (n = 122) cohorts.

Materials and methods

Patients and samples

Overall, 322 patients (170 males and 152 females), who were divided into a discovery cohort (n = 200) and a validation cohort (n = 122) and who were diagnosed with ISM (median age at diagnosis of 44 years and 50 years; range, 0-76 years and 10-78 years, respectively) at the reference centers of the Spanish Network on Mastocytosis-Cancer Research Center (Salamanca, Spain) and the Virgen del Valle Hospital (Toledo, Spain), were studied. Diagnosis and classification of ISM were (retrospectively) established according to the World Health Organization (WHO) 2016 criteria.¹⁸ To rule out an AHN, conventional WHO cytomorphic and immunophenotypic criteria¹⁸ (based on the EuroFlow acute leukemia orientation tube and acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome antibody panels¹⁹) were used at diagnosis. All patients who progressed to SSM or advSM showed BM MC aggregates upon histology, with CD25⁺ *KIT* D816V-mutated and cytologically altered BM MCs. These patients were thoroughly investigated to rule out SSM or advSM, and none showed ≥ 2 B-findings and/or any C-finding¹⁸ at diagnosis. Only those ISM patients with available genomic DNA (gDNA) extracted from whole-BM samples obtained at diagnosis were included in the study. Prior to entering the study, each individual gave his/her written informed consent to participate according to the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local institutional Ethics Committees.

The clinical and biological features of patients within the validation cohort were similar to those of the discovery series, with the exception of older age at diagnosis (50 years vs 44 years,

$P = .04$), lower serum baseline tryptase (sBT) levels (26 $\mu\text{g/L}$ vs 32.9 $\mu\text{g/L}$, $P = .02$), and higher SAP (74 U/L vs 66 U/L, $P = .03$) and immunoglobulin E (IgE; 26.5 KU/L vs 20.7 KU/L, $P = .04$) levels (supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site).

KIT mutational analyses

Analysis of *KIT* genetic variants at codon 816 was performed on gDNA obtained from fluorescence-activated cell sorted and purified (ie, $\geq 98\%$ purity) BM MCs, maturing neutrophils and/or monocytes, T cells, and, whenever available (n = 45), MSCs, using a previously described peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction (PCR) method.^{20,21} According to the pattern of involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation, patients were classified as having MC-restricted ISM (ISM_{MC}) or multilineal ISM (ISM_{MMU}) when the *KIT* mutation was detected (only) in BM MCs or in BM MCs and neutrophils/monocytes and/or T cells, respectively.^{4,20} In those ISM cases who carried the *KIT* D816V mutation (n = 313/322; 97%), a real-time allele-specific oligonucleotide PCR (ASO-qPCR) method was subsequently used to determine the *KIT* D816 VAF in BM (n = 313) and, whenever available, in PB (n = 96) using whole (BM and/or PB) gDNA, as described elsewhere.^{3,22}

Targeted BM gDNA sequencing

A customized gDNA library was designed for targeted sequencing of a total of 15 genes (*ASXL1*, *CDH11*, *DNMT3A*, *EPHA7*, *EZH2*, *ICK*, *IKZF1*, *ITGA10*, *KAT6B*, *PIK3CD*, *ROS1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, and *TET2*) previously found to be recurrently mutated in SM patients based on a broader panel of up to 410 genes,¹⁵ with a global exon coverage $>99\%$ (ie, 219-bp gap distance for a total coverage of 58 305 bp). Briefly, 200 ng of whole BM gDNA per patient was used for the preparation of individual libraries with a TruSeq Custom Amplicon Low Input Kit (Illumina, San Diego, CA), and gDNA was sequenced at a 2×150 -bp read length on a HiSeq 2500 genome sequencer (Illumina), following the manufacturer's instructions. In addition, the *CBL*, *KRAS*, and *JAK2* genes were sequenced in a subset of 107 of 200 (53%) patients in the discovery cohort and, for the *CBL* gene only, in all 122 patients in the validation cohort.

Sequencing resulted in an average of 645 407 paired-end filter reads per sample, with a mean coverage of 1660 \times . To align reads to the hg19 human reference sequence, the Smith-Waterman algorithm was used.²³ For variant calling, an Illumina Somatic Variant Caller/Genome Analysis Toolkit (GATK) was used, and filtering was manually conducted as previously described¹⁵: (1) only those nonsynonymous coding genetic variants identified with $\geq 1\%$ allele coverage were initially selected, (2) the sequences obtained were subsequently compared with the 5000 exomes,²⁴ the Iberian Populations in Spain 1000 Genomes Project,²⁵ and the ExAC²⁶ population databases to discriminate between somatic variants and single nucleotide polymorphisms, (3) from the remaining genetic variants, only those that had not been previously reported in Spanish, African, or European (non-Finnish) populations and/or those with a minor allele frequency $< 0.1\%$ were considered, and (4) potentially deleterious variants, as defined by the SIFT²⁷ and PolyPhen²⁸ algorithms, were finally selected. All genetic variants identified were subsequently confirmed by Sanger sequencing on gDNA extracted from BM and/or PB from the same patient (kindly provided by the Spanish National DNA Bank Carlos III, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <http://www.bancoadn.org>). For

a more stringent approach to pathogenicity, variants were classified as variants of unknown significance (VUS) or pathogenic variants, as described elsewhere.^{29,30}

Statistical analyses

To assess the statistical significance (set at $P < .05$) of differences observed among groups, the Mann-Whitney U test was used. Receiver operating characteristic curve analysis was used to select the most sensitive and specific *KIT*-mutated BM and PB allele frequency threshold for the discrimination between ISM_{MC} and ISM_{MML} patients and to identify the most accurate cutoffs to predict for patient outcome for other variables (ie, age at diagnosis, hemoglobin levels, absolute neutrophil counts [ANCs], platelet counts, and VAF of the *ASXL1/RUNX1/DNMT3A [A/R/D]* genes). Pearson's correlation coefficient (r) was used to measure the relationship between variables. PFS and OS curves were plotted from the time of diagnosis to disease progression (PFS), death (OS), or the last follow-up visit (PFS and OS) using the Kaplan-Meier method; the log-rank test was used to establish the statistical significance of differences between survival curves. For multivariate analyses, the covariate adjustment model³¹ was applied to those variables that showed a prognostic impact on PFS and OS in the univariate analysis and then the Cox proportional hazard regression model was used. All statistical analyses were performed with SPSS software (SPSS version 20.0; IBM Corporation, Armonk, NY).

Results

Gene mutational profile of ISM patients

Targeted next-generation sequencing revealed a total of 71 genetic variants in 55 of 322 ISM patients: 35 of 200 (18%) in the discovery cohort (range, 0-2 mutated genes per case) and 20 of 122 (16%) in the validation cohort (range, 0-4 gene variants per case) (Table 1; supplemental Table 1). These variants involved 15 of 18 genes tested (*ASXL1*, *CBL*, *CDH11*, *DNMT3A*, *EPHA7*, *ITGA10*, *JAK2*, *KAT6B*, *KRAS*, *PIK3CD*, *ROS1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, and *TET2*) (supplemental Table 2). With the exception of the *KAT6B* and *CDH11* genes, which were mutated in a single ISM case, the other 13 genes were recurrently mutated in between 2 and 18 patients (median, 2 mutated cases per gene). Most variants identified (50/71; 70%) had been previously reported in the COSMIC database, whereas the remaining 21 of 71 variants (30%) are described here for the first time (supplemental Table 2). Of note, only 30 of 71 (42%) genetic variants other than *KIT*, involving 8 of 18 genes tested (ie, *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *ITGA10*, *JAK2*, *RUNX1*, *SRSF2*, and *TET2*), were considered pathogenic mutations, affecting 23 of 55 (42%) patients (supplemental Table 2). With the exception of *SRSF2* (0% vs 2%, $P = .04$) and *ITGA10* (1% vs 5%, $P = .03$), similar mutational profiles were found in the discovery and validation cohorts (supplemental Table 1).

Of note, the 35 of 200 ISM patients (ie, from the discovery cohort) carrying ≥ 1 gene variant, in addition to mutated *KIT* (ie, multimutated ISM cases), showed more advanced age at diagnosis (median, 50 years vs 43 years among ISM patients with isolated *KIT* mutation; $P = .003$), together with a higher proportion of cases with increased (≥ 2.5 $\mu\text{g/mL}$) s β 2M levels (22% vs 6.5% cases, respectively; $P = .006$), disease progression (18% vs 4.8% cases, respectively; $P = .008$), and death (12% vs 0% cases, respectively; $P < .001$) (Table 2). This translated into

shorter PFS ($P < .001$) and OS ($P = .002$) among multimutated ISM patients compared with patients with an isolated *KIT* mutation ($n = 166$) (Table 3). Interestingly, among the 35 multimutated patients, VAF analyses revealed that, in most cases (32/35, 91%), the *KIT* mutation was a secondary event to the other gene variant, whereas it could be considered to appear simultaneously or to be an earlier event in only 3 of 35 cases (patients #45, #134, and #193) (supplemental Table 2).

Pattern of involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation

Most ISM patients analyzed in the discovery cohort (191/200; 95.5%) carried the *KIT* D816V mutation in their BM MCs, whereas a few presented other variants at codon 816 of *KIT*: *KIT* D816Y in 6 cases (3%) and *KIT* D816H in another 3 cases (1.5%). In 94 cases (47%), involvement of BM hematopoietic cells other than MCs was confirmed in highly purified fluorescence activated cell sorting-sorted T cells, monocytes, and/or neutrophils, including 93 of 191 cases (49%) that had the *KIT* D816V mutation and 1 of 6 cases with the *KIT* D816Y mutation (Table 1). In the remaining 106 ISM patients (53%), *KIT* mutation was restricted to BM MCs (ISM_{MC}), with or without involvement of CD34⁺ precursors (Table 1). Receiver operating characteristic curve analysis showed that, among ISM cases carrying the *KIT* D816V mutation ($n = 191$), *KIT* VAF $\geq 1\%$ in BM and $\geq 6\%$ in PB were the most discriminating cutoffs to define BM and PB multilineal *KIT*, with overall accuracies of 87% (sensitivity, 79%; specificity, 95%) and 71% (sensitivity, 32%; specificity, 98%), respectively. Interestingly, a BM *KIT* VAF $\geq 1\%$ correlated significantly with a PB *KIT* VAF $\geq 6\%$ ($r = 0.5$, $P < .001$), s β 2M ≥ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.4$, $P < .001$), and, to a lesser extent, also sBT ≥ 200 $\mu\text{g/L}$ ($r = 0.3$, $P < .001$) and the BM MC tumor burden evaluated by flow cytometry ($r = 0.31$, $P < .001$).

Of note, although the frequency of multimutated ISM cases was similar ($P > .05$) in ISM_{MC} and ISM_{MML} patients (16/35 [46%] vs 19/35 [54%]), with an overall similar frequency of mutated and nonmutated genes in both patient groups, a significant difference ($P = .01$) was observed between the groups for the presence of ≥ 1 pathogenic variant in genes other than *KIT* (3/14 [21%] vs 11/14 [79%]) (Table 1). In addition, the number of cases that had *KIT* mutations other than *KIT* D816V at codon 816 (ie, *KIT* D816H/Y) was significantly higher among ISM_{MC} patients than ISM_{MML} patients (7.5% vs 1%, respectively; $P = .03$) (Table 1).

From a clinical point of view, ISM patients with a BM *KIT* VAF $\geq 1\%$ (vs $< 1\%$ *KIT* BM VAF) showed a greater frequency of skin lesions (92% vs 68%, $P < .001$), hepatomegaly (12% vs 3.6%, $P = .03$), and splenomegaly (9.1% vs 1.8%, $P = .02$); elevated s β 2M (≥ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ in 28% vs 0% cases; $P < .001$), SAP (≥ 140 U/L in 8.6% vs 0% patients; $P = .002$), and sBT (≥ 200 $\mu\text{g/L}$ in 17% vs 0.9% cases; $P < .001$) (Table 2); and a greater proportion of cases with *KIT* D816V⁺ MSCs (62% vs 0%, $P < .001$) and lower hemoglobin (145 g/L vs 138 g/L; $P < .001$) and IgE (29 KU/L vs 11.2 KU/L; $P = .001$) (Table 2). Similar ($P > .05$) ANCs and platelet counts were observed in the 2 ISM patient groups defined by the BM *KIT* D816V VAF cutoff $\geq 1\%$ (Table 2).

Impact of the gene mutational profile on patient outcome

After a median follow-up of 9 years (range, 2-35), 14 of 200 ISM patients (7%) had progressed to more advanced forms of SM.

Table 1. ISM gene mutational profiles and pattern of BM involvement by the *KIT* mutation in the discovery patient cohort (N = 200)

Gene mutational profile	BM <i>KIT</i> mutational profile					Total (N = 200)
	ISM _{MC} (n = 106)	MAF (%)	ISM _{MML} (n = 94)	MAF (%)	P	
Gene variants						
<i>KIT</i> D816V	98/106 (92.5)		93/94 (99)		.03	191/200 (95.5)
<i>KIT</i> D816H/Y*	8/106 (7.5)		1/94 (1)			9/200 (4.5)
<i>ASXL1</i>	54/106 (5)	36	3/94 (3)	36	NS	7/200 (4)
<i>CBL</i>	0/30 (0)	—	1/77 (1)	12	NS	1/107 (1)
<i>CDH11</i>	0/106 (1)	16	1/94 (1)	50	NS	1/200 (1)
<i>DNMT3A</i>	3/106 (3)	23	7/94 (7)	39	NS	10/200 (5)
<i>EZH2</i>	0/106 (0)	—	0/94 (0)	—	NS	0/200 (0)
<i>EPHA7</i>	0/106 (0)	—	1/94 (1)	42	NS	1/200 (1)
<i>ICK</i>	0/106 (0)	—	0/94 (0)	—	NS	0/200 (0)
<i>IKZF1</i>	0/106 (0)	—	0/94 (0)	—	NS	0/200 (0)
<i>ITGA10</i>	1/106 (1)	38	1/94 (1)	53	NS	2/200 (1)
<i>JAK2</i>	0/30 (0)	—	2/77 (3)	29	NS	2/107 (2)
<i>KAT6B</i>	1/106 (1)	54	0/94 (0)	—	NS	1/200 (0.5)
<i>KRAS</i>	0/30 (0)	—	2/77 (3)	22	NS	2/107 (2)
<i>PIK3CD</i>	2/106 (2)	27	1/94 (1)	49	NS	3/200 (2)
<i>ROS1</i>	1/106 (1)	51	1/94 (2)	49	NS	2/200 (1.5)
<i>RUNX1</i>	0/106 (0)	—	2/94 (2)	49	NS	2/200 (1)
<i>SF3B1</i>	2/106 (2)	49	0/94 (0)	—	NS	2/200 (1)
<i>SRSF2</i>	0/106 (0)	—	0/94 (0)	—	NS	0/200 (0)
<i>TET2</i>	2/106 (2)	33	2/94 (2)	35	NS	4/200 (2)
≥1 gene variant other than <i>KIT</i>	16/106 (15)	34	19/94 (20)	42	NS	35/200 (18)
≥1 pathogenic variant other than <i>KIT</i>	3/106 (3)	18	11/94 (12)	40	.01	14/200 (7)
Pattern of involvement by the <i>KIT</i> mutation:						
<i>KIT</i> D816V allele frequency ≥ 1% in BM	5/98 (5)		73/93 (78)		<.001	78/191 (40)
<i>KIT</i> D816V allele frequency ≥ 6% in PB	1/58 (2)		12/38 (32)		<.001	13/96 (14)

Unless otherwise noted, results are expressed as no. of cases (%).

MAF, mean allele frequency; NS, not statistically significant; —, no mutations found.

*Six ISM_{MC} cases showed the D816Y *KIT* mutation and 3 patients had the D816H *KIT* mutation (2 ISM_{MC} cases and 1 ISM_{MML} patient).

This included progression from ISM to SSM in 5 cases (2.5%), to ASM in 7 cases (3.5%), and to SM-AHN in 2 patients (1%). Of note, all 14 cases that progressed from ISM to more advanced SM had a BM *KIT* VAF ≥ 1%, with the presence of the *KIT* D816V mutation in BM MSCs in all 9 cases tested (supplemental Table 3). During follow-up, 4 of 200 patients (2%) died of SM-related causes, after progression of ISM to ASM (n = 3) or SM-AHN (n = 1) (supplemental Table 3).

Univariate analysis of prognostic factors for PFS and OS revealed that pathogenic variants involving the *A/R/D* genes (particularly for VAF ≥ 30%), together with the presence of ≥1 pathogenic variant in any of the 8 of 18 genes other than *KIT* found to be mutated in our series and the presence of multilineal *KIT*, including BM *KIT* D816V VAF ≥ 1% and the presence of *KIT* D816V+ MSCs and PB *KIT* VAF ≥ 6%, were all associated with shorter PFS and OS (Table 3). Interestingly, the only patient (#149) harboring a pathogenic variant in the *CBL* gene also carried an *ASXL1* pathogenic mutation (supplemental Table 3). Other clinical and biological parameters that showed a significant adverse impact on patient PFS in univariate analyses included age at diagnosis ≥55 years ($P = .008$), sβ2M ≥ 2.5 μg/mL

($P < .001$), SAP > 140 U/L ($P = .001$), and lactate dehydrogenase < 230 IU/L ($P = .002$); in turn, only sβ2M and SAP levels showed a significant impact ($P < .001$) on patient OS (Table 3). Of note, among 14 multimitated ISM patients who carried pathogenic variants in genes other than *KIT* (Table 3), cases with mutations in the *A/R/D* genes at VAF ≥ 30% (n = 8) displayed significantly higher sBT levels (131 vs 26.2 μg/L, $P = .01$) and disease progression (to SSM or advSM) rates (75% vs 0%, $P = .001$) compared with the other mutated cases (n = 6).

Multivariate analysis of prognostic factors (Table 4), based on those parameters that showed a significant impact on patient outcome in the univariate analysis, revealed that a BM *KIT* D816V allele frequency ≥ 1% (hazard ratio [HR], 10.1; 95% confidence interval [CI], 1.1-90; $P = .02$), together with increased (≥2.5 μg/mL) sβ2M levels (HR, 9.8; 95% CI, 2.6-36; $P < .001$) and the presence of pathogenic variants within *A/R/D* genes with VAF ≥ 30% (HR, 4.2; 95% CI, 1.2-10; $P = .02$), was the best combination of independent predictors for PFS ($P < .001$) (Table 4; Figure 1A-B). In turn, the presence of *A/R/D* pathogenic variants at VAF ≥ 30% (HR: 51.8; 95% CI: 4.1-647) was the only independent predictor for OS ($P = .002$) (Table 4; Figure 1B-C).

Table 2. Clinical-biological features and outcome of ISM patients from the discovery series (n = 200) grouped according to their gene mutational profile and the pattern of BM involvement of hematopoiesis by the KIT mutation

Clinical and biological features	Overall gene mutational profile			BM KIT mutational profile			TOTAL (N = 200)
	Isolated KIT mutation (n = 165)	≥1 Mutation other than KIT (n = 35)	P	KIT D816V < 1% VAF (n = 113)	KIT D816V ≥ 1% VAF (n = 78)	P	
Age at diagnosis, y*	43 (0-76)	50 (30-66)	.003	41 (16-64)	49 [0-76]	<.001	44 (0-76)
Sex (female)	81/165 (49)	16/35 (46)	NS	52/113 (46)	42/78 (54)	NS	97/200 (49)
Skin lesions	127/165 (77)	24/35 (69)	NS	77/113 (68)	72/78 (92)	<.001	151/200 (76)
Organomegalies:							
Hepatomegaly	11/161 (6.8)	4/35 (11)	NS	4/111 (3.6)	9/77 (12)	.03	15/196 (7.7)
Splenomegaly	9/161 (5.6)	1/35 (2.9)	NS	2/111 (1.8)	7/77 (9.1)	.02	10/196 (5.1)
Osteolysis/osteoporosis (without bone fractures)	24/139 (17)	5/29 (16)	NS	13/95 (13.7)	15/70 (21.4)	NS	29/170 (17)
Mild cytopenia	10/162 (6.2)	3/34 (8.8)	NS	6/111 (5.4)	7/76 (9.2)	NS	13/196 (6.6)
Hemoglobin (g/L)*	142 (100-190)	142 (100-170)	NS	145 (100-190)	138 (100-160)	<.001	142 (100-190)
ANC (×10 ⁹ /L)*	3.5 (1.6-10)	3.9 (2.1-9.5)	NS	3.8 (1.6-10)	3.3 (1.6-7.4)	NS	3.6 (1.6-10)
Platelets (×10 ⁹ /L)*	233 (100-480)	240 (102-344)	NS	240.5 (100-480)	228 (102-451)	NS	234 (100-480)
BM MC (%) by flow cytometry	0.1 (0.001-15.5)	0.26 (0.02-3.7)	.006	0.06 (0.002-1.2)	0.3 (0.001-15.5)	<.001	0.1 (0.001-15.5)
BM aggregates ≥30%	0/165 (0)	0/35 (0)	NS	0/113 (0)	0/78 (0)	NS	0/200 (0)
sBT (μg/L)*	32.4 (4-1298)	39.5 (11-362)	NS	27.2 (4-210)	59.9 (11-1298)	<.001	32.9 (4-1298)
≥200 μg/L	11/164 (6.7)	3/35 (8.6)	NS	1/113 (0.9)	13/77 (17)	<.001	14/199 (7)
LDH (U/L)*	256 (112-530)	253 (97-419)	NS	270 (97-421)	243 (112-530)	.006	256 (97-530)
<230 U/L	42/158 (26)	8/32 (25)	NS	22/110 (20)	27/71 (38)	.008	50/190 (26)
SAP (U/L)*	63 (6-290)	79.5 (14-233)	.006	63 (31-135)	76 (6-290)	.008	66 (6-290)
≥140 U/L	6/158 (3.8)	1/31 (3.2)	NS	0/113 (0)	6/69 (8.6)	.002	7/189 (3.7)
sβ2M (μg/mL)*	1.6 (0.9-4.3)	1.9 (1.2-6.9)	.02	1.6 (1.1-2.4)	2 (0.9-6.9)	<.001	1.7 (0.9-6.9)

Unless otherwise noted, results are expressed as number of cases (%). Per definition, all (ISM) cases showed hemoglobin levels ≥ 100 g/L, neutrophil counts ≥ 1000/μL, and platelet counts ≥ 100 × 10⁹/μL. LDH, lactate dehydrogenase; NS, not statistically significant.

*Data are median (range).

Table 2. (continued)

Clinical and biological features	Overall gene mutational profile			BM <i>KIT</i> mutational profile		
	Isolated <i>KIT</i> mutation (n = 165)	≥1 Mutation other than <i>KIT</i> (n = 35)	P	<i>KIT</i> D816V < 1% VAF (n = 113)	<i>KIT</i> D816V ≥ 1% VAF (n = 78)	P
	≥2.5 μg/mL	10/157 (6.3)	7/33 (21)	.006	0/113 (0)	20/71 (28.2)
IgE (KU/L)*	19.3 (2-2395)	27.4 (2-262)	NS	29 (2-1364)	11.2 (2-2395)	.001
≥100 KU/L	20/145 (14)	2/30 (6.7)	NS	15/101 (15)	5/68 (7.4)	NS
Progression to SSM or advSM	8/165 (4.8)	6/35 (17)	.008	0/113 (0)	14/78 (18)	<.001
Deaths	0/165 (0)	4/35 (11.4)	<.001	0/113 (0)	4/78 (5.1)	.02
						TOTAL (N = 200)
						17/187 (9)
						20.7 (2-2395)
						22/176 (13)
						14/200 (7)
						4/200 (2)

Unless otherwise noted, results are expressed as number of cases (%). Per definition, all (ISM) cases showed hemoglobin levels ≥ 100 g/L, neutrophil counts ≥ 1000/μL, and platelet counts ≥ 100 × 10⁹/μL. LDH, lactate dehydrogenase; NS, not statistically significant. *Data are median (range).

According to the above results, a scoring system was constructed to predict PFS for ISM patients based on the presence of a BM *KIT* D816V VAF ≥ 1% (1 point), and/or increased (≥2.5 μg/mL) sβ2M levels (1 point), and/or the presence of pathogenic variants in *A/R/D* genes at VAF ≥ 30% (1 point): score 0, 119 patients (64%); score 1, 51 cases (27%); score 2, 11 cases (6%); and, score 3, 6 cases (3%). As expected, the 17 patients who showed co-existence of ≥2 adverse features (scores 2 and 3) had a significantly ($P < .001$, for scores 2 and 3) poorer PFS (median of 10 and 2 years, respectively) than did those with lower (≤1) scores (median PFS not reached) (Figure 2A). Similarly, a scoring system based on the presence of pathogenic variants in the *ASXL1*, *RUNX1*, and/or *DNMT3A* genes (*A/R/D* gene panel) at VAF ≥ 30% (1 point) also proved to be a strong predictor ($P < .001$) for OS among ISM patients, with median OS rates of 7 years vs not reached for cases with a score 1 vs a score 0, respectively (Figure 2D). When these 2 scoring systems were applied to the validation cohort of ISM patients (Figure 2B-E) and the whole ISM patient series (n = 322), similar results (Figure 2C-F) were observed with regard to PFS ($P < .001$ and $P < .001$, respectively) and OS ($P = .04$ and $P < .001$, respectively).

Discussion

The activating *KIT* D816V mutation is a hallmark of SM^{20,32}; it is present in ≥90% of patients when sensitive molecular approaches are used.^{3,22} Despite the high frequency of *KIT* D816V in non-advanced SM and advSM,²⁰ on its own, this mutation cannot explain the progression of ISM to SSM and advSM or a distinct patient survival. However, acquisition of the *KIT* D816V mutation in MSCs and uncommitted hematopoietic precursor cells,³³ in association with multilineal involvement of BM hematopoiesis by *KIT*, has been recurrently associated with a poorer outcome in ISM patients.⁴ At the same time, it represents a hallmark of ASM and ASM-AHN cases, where it is typically observed in association with (additional) mutations in genes other than *KIT*; in this regard, some specific mutational profiles have been recurrently shown to confer an adverse outcome in SM.^{12-16,34} Altogether, these findings suggest that multilineal *KIT*, together with mutations in genes other than *KIT*, might provide the genetic background required for disease progression and death. However, there are still limited data about the frequency and potential prognostic impact on ISM of mutations in genes other than *KIT* that are associated with advSM, and its potential relationship with multilineal *KIT* also remains to be investigated. Thus, of the 18 genes reported to be recurrently mutated in advSM and analyzed here, only 11 (*ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IKZF1*, *JAK2*, *KRAS*, *SF3B1*, *SRSF2*, *RUNX1*, *TET2*) have been investigated in >5 ISM cases/series, for a total of 81 ISM patients analyzed in 4 distinct series¹³⁻¹⁶; no data are available about the relationship between the frequency and prognostic impact of mutations within these genes and its association with multilineal *KIT*.

We investigated, for the first time, the frequency and prognostic impact of different genetic variants in 18 genes, other than *KIT*, in a large series of 200 ISM patients studied at diagnosis and followed for a median of 9 years; results were subsequently validated in an additional cohort of 122 ISM patients. Remarkably, all of the ISM patients who progressed to SSM or advSM (and eventually died) showed “high-risk” ISM^{15,33} features at diagnosis (ie, ISM with BM *KIT* VAF ≥ 1%, D816V⁺ MSCs, and high serum baseline tryptase levels), but they did not meet the

Table 3. ISM included in the discovery cohort (n = 200): univariate analyses of prognostic factors for PFS and OS

	No. of cases/total cases	PFS		OS	
		Median (y)	P*	Median (y)	P*
Clinical and laboratory variables					
Age at diagnosis					
≥55 y	52/200	NR	.008	NR	NS
<55 y	148/200	32		NR	
Organomegalies				NR	
Hepatomegaly					
No	181/196	32	NS	NR	NS
Yes	15/196	NR		NR	
Splenomegaly					
No	186/196	32	NS	NR	NS
Yes	10/196	NR		NR	
Hepatomegaly/splenomegaly					
No	174/196	32	NS	NR	NS
Yes	22/196	NR		NR	
Osteolysis/osteoporosis					
Yes	141/170	32	NS	NR	NS
No	29/170	NR		NR	
Biochemical features					
ANC					
≤2.6 × 10 ⁹ /L	30/184	NR	NS	NR	NS
>2.6 × 10 ⁹ /L	154/184	NR		NR	
No. of platelets					
≤150 × 10 ⁹ /L	8/189	NR	NS	NR	NS
>150 × 10 ⁹ /L	181/189	32		NR	
Hemoglobin					
≤110 g/L	1/189	NR	NS	NR	NS
>110 g/L	188/189	32		NR	
LDH					
>230 U/L	140/190	NR	.001	NR	NS
≤230 U/L	50/190	30		NR	
SAP					
<140 U/L	182/193	32	.001	NR	<.001
≥140 U/L	7/193	NR		NR	
sβ2M					
<2.5 μg/mL	170/187	NR	<.001	NR	<.001
≥2.5 μg/mL	17/187	5		NR	
IgE					
<100 KU/L	154/176	30	NS	NR	NS
≥100 KU/L	22/176	NR		NR	
Genetic features					
Gene variants					
ASXL1					
WT	193/200	32		NR	
VUS	5/200	NR	NS	NR	NS
Pathogenic	2/200	2	<.001	NR	<.001
CDH11					
WT	199/200	32		NR	
VUS	1/200	NR	NS	NR	<.001
DNMT3A					
WT	190/200	32		NR	
VUS	3/200	NR	NS	NR	NS
Pathogenic	7/200	6	<.001	NR	<.001

LDH, lactate dehydrogenase; NR, not reached; NS, not statistically significant; WT, wild-type.

*Versus WT group.

†Ninety-three cases had the *KIT* D816V mutation and 1 had the *KIT* D816H mutation.

Table 3. (continued)

	No. of cases/total cases	PFS		OS	
		Median (y)	P*	Median (y)	P*
<i>EPHA7</i>					
WT	199/200	32		NR	
VUS	1/200	NR	NS	NR	NS
<i>ITGA10</i>					
WT	198/200	32		NR	
Pathogenic	2/200	NR	NS	NR	NS
<i>KAT6B</i>					
WT	199/200	32		NR	
VUS	1/200	NR	NS	NR	NS
<i>PIK3CD</i>					
WT	197/200	32		NR	
VUS	3/200	NR	NS	NR	NS
<i>ROS1</i>					
WT	197/200	32		NR	
VUS	3/200	NR	NS	NR	NS
<i>RUNX1</i>					
WT	198/200	32		NR	
VUS	1/200	NR	NS	NR	NS
Pathogenic	1/200	2	<.001	NR	<.001
<i>SF3B1</i>					
WT	198/200	32		NR	
VUS	2/200	NR	NS	NR	NS
<i>TET2</i>					
WT	194/200	32		NR	
VUS	2/200	NR	NS	NR	NS
Pathogenic	2/200	NR	NS	NR	NS
<i>A/R/D</i> gene pathogenic variants					
No	191/200	32		NR	
Yes	9/200	5	<.001	NR	<.001
<i>A/R/D</i> gene pathogenic variants					
≥30%	192/200	32		NR	
<30%	8/200	4	<.001	7	<.001
Number of mutated cases					
Isolated <i>KIT</i> mutation	165/200	32		NR	
≥1 VUS variant	21/200	NR	NS	NR	NS
≥1 Pathogenic variant other than <i>KIT</i>	14/200	6	<.001	NR	<.001
<i>KIT</i> mutational profile in the BM					
MC restricted	106/200	NR	<.001	NR	.009
Multilineal involvement†	94/200	30		NR	
BM <i>KIT</i> D816V allele frequency					
<1%	118/191	NR	<.001	NR	.004
≥1%	73/191	30		NR	
PB <i>KIT</i> D816V allele frequency					
<6%	83/96	NR	<.001	NR	.03
≥6%	13/96	15		NR	

LDH, lactate dehydrogenase; NR, not reached; NS, not statistically significant; WT, wild-type.

*Versus WT group.

†Ninety-three cases had the *KIT* D816V mutation and 1 had the *KIT* D816H mutation.

WHO diagnostic criteria for SSM or advSM (ie, <2 B-findings and no C-findings).¹⁸

In line with previous data reported in the literature in smaller series, showing that 16% (mean) of cases are mutated (range, 11-40),¹³⁻¹⁷ 17% of our ISM patients had multiple mutations (ie, ≥1

mutation in addition to *KIT* D816). Of note, this frequency is significantly lower than that reported previously for SSM patients (3/6 cases; 50%) and advSM patients, including ASM (22/39 cases; 56%), SM-AHN (131/184 cases; 71%), and MCL (23/36 cases; 64%), investigated for a variable number of genes (range, 7-410),^{12-16,34} including the 18 genes analyzed here.

Table 4. ISM: multivariate analyses of prognostic factors for PFS and OS (n = 187)*

Prognostic factor	PFS		OS	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age at diagnosis ≥ 55 y		NS		NT
s β 2M ≥ 2.5 μ g/mL	9.8 (2.6-36)	<.001		NS
LDH < 230 U/L		NS		NT
SAP > 140 U/L		NS		NS
A/R/D pathogenic mutations with allele frequency $\geq 30\%$	4.2 (1.2-10)	.02	51.8 (4.1-647)	.002
A/R/D pathogenic mutations		NS		NS
≥ 1 pathogenic mutation other than <i>KIT</i>		NS		NS
<i>KIT</i> D816V allele frequency $\geq 1\%$ in BM	12.0 (1.3-108)	.02		NS
<i>KIT</i> D816V allele frequency $\geq 6\%$ in PB		NS		NS
Multilineal involvement of BM hematopoiesis by <i>KIT</i> D816V		NS		NS

CI, confidence interval; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; NS, not statistically significant; NT, not tested.

*With the exception of PB *KIT* D816V allele frequency $\geq 6\%$, which was performed in only 96 cases.

Similarly to ISM patients with a BM *KIT* VAF $\geq 1\%$, multimutated ISM cases showed more adverse prognostic features than ISM patients with an isolated *KIT* mutation (eg, elevated s β 2M and SAP levels), in association with significantly shorter PFS and OS rates. In line with these findings, a significantly different overall frequency of multimutated cases, as well as of patients carrying pathogenic variants in genes other than *KIT*, was found among ISM patients with (vs without) BM *KIT* VAF $\geq 1\%$. Altogether, these results confirm and extend previous observations from our group and from other investigators with regard to the impact of multilineal *KIT* on PFS of ISM cases and of pathogenic variants in genes other than *KIT* on OS of advSM patients.^{4,12,13,15,16,35} In line with this, as well as with previous findings in advSM,³⁵ the comparison between VAF of *KIT* and other mutated genes suggests that the *KIT* mutation might be a secondary event in the great majority of multimutated patients.

Of the 18 genes investigated here, the most frequently mutated genes were *ASXL1* and *DNMT3A*. *ASXL1* has frequently been reported to be mutated in advSM, in association with a shorter OS^{12,17}; in contrast, despite the fact that the *DNMT3A* gene has frequently been found to be mutated in SM¹⁴⁻¹⁶ and other non-MC myeloid neoplasias,^{36,37} controversial results have been reported in the literature with regard to the impact of *DNMT3A* genetic variants on OS of patients with advSM and other non-MC myeloid neoplasias.^{14-16,36,37} Here, the presence of pathogenic variants in ≥ 1 of these 2 genes, and/or *RUNX1* gene mutations (*A/R/D* gene panel), had a strong adverse prognostic impact on our ISM patients. These results confirm the adverse prognostic impact of the *ASXL1* and *RUNX1* genes on advSM,^{12,15,16} as well as among ISM cases. In contrast, none of our patients from the discovery cohort had *SRSF2* and *EZH2* genetic variants, suggesting that these adverse genetic markers might emerge at later stages of disease, after advSM is already established (or just

prior to disease progression). Interestingly, *SRSF2* was found to be mutated in only 2 patients from the validation cohort who progressed to ASM and SM-AHN (supplemental Table 4) and in whom the *SRSF2* mutations appeared to be a secondary event to other deleterious variants in genes other than *KIT* (*TET2* and *DNMT3A*), with VAF of 34% vs 48% and 20% vs 53%, respectively (supplemental Table 2). In line with this hypothesis, *SRSF2* and *EZH2* gene mutations have been reported in SM-AHN patients^{12,13,15,16} and, to a lesser extent, in MCL¹³ and ASM patients,^{13,16} whereas none of the 81 ISM cases investigated previously in the literature carried an *SRSF2* and/or *EZH2* gene mutation.

Interestingly, when BM VAF $\geq 30\%$ was established as a cutoff for the *A/R/D* pathogenic variants, a slight increase in their discriminatory prognostic power for PFS and OS was observed, because all ISM patients that progressed and died had pathogenic variants in *A/R/D* genes, with high ($\geq 30\%$) VAF for the mutated genes (supplemental Tables 1 and 2).

Despite all of the above data, multivariate analysis of prognostic factors for PFS and OS showed that increased s β 2M levels, together with *KIT* VAF $\geq 1\%$ in BM and the presence of pathogenic *A/R/D* gene VAF $\geq 30\%$, were the only variables that retained an independent prognostic value for PFS, with the pathogenic *A/R/D* mutations with VAF $\geq 30\%$ also being the only independent predictor for OS in ISM patients. Based on these 3 variables, 2 scoring systems were constructed that resulted in patient groups with significantly different outcomes in terms of PFS and OS. Thus, these included a large group of patients with high PFS and OS rates ($>90\%$) at 10 years, together with a small subgroup of ISM patients with significantly higher risk of undergoing disease progression and death at 10 years (100% and 50%, respectively). Altogether, these results are

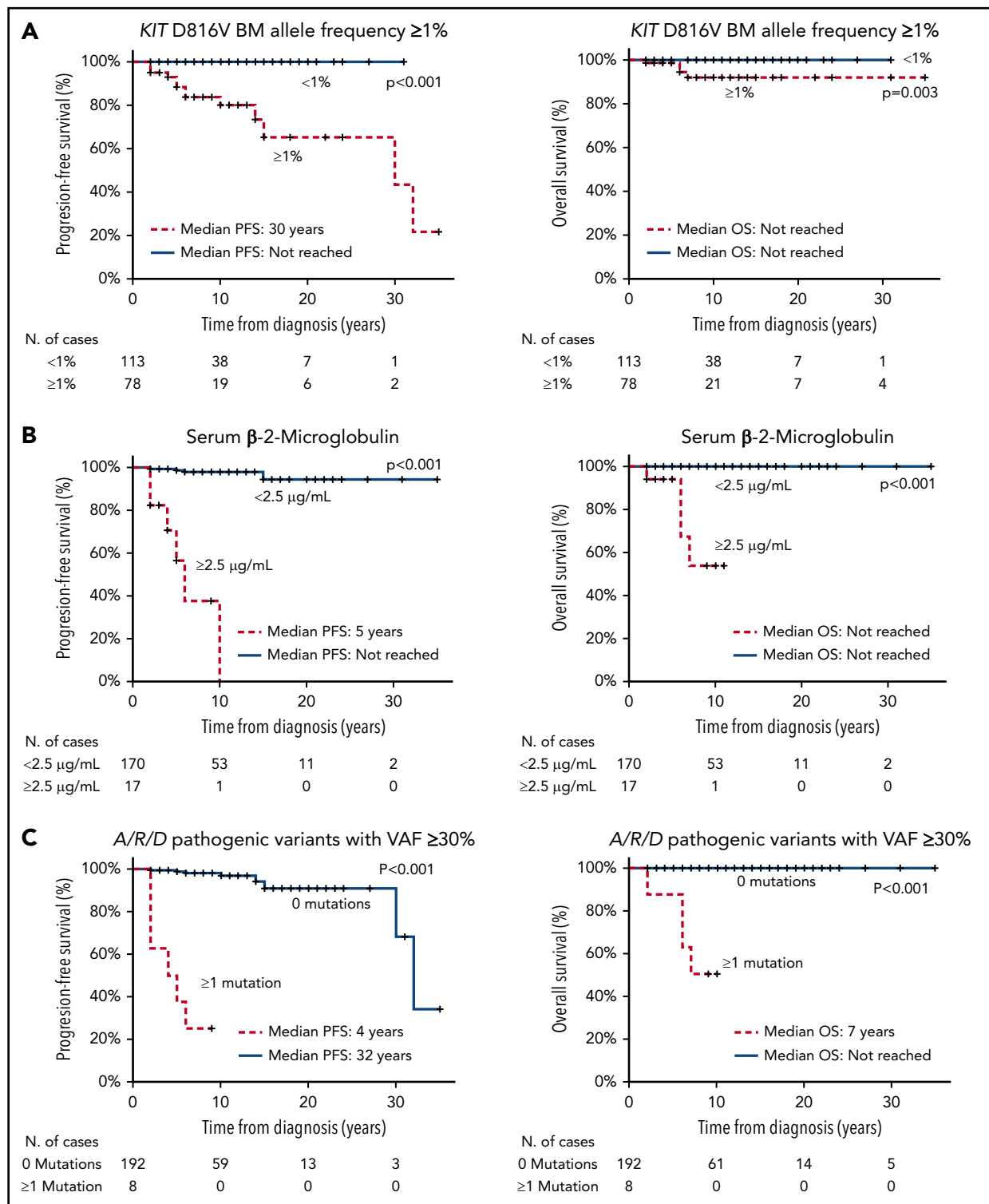


Figure 1. PFS and OS curves of the variables with independent prognostic value in the multivariate analysis. PFS (left panels) and OS (right panels) curves of ISM patients grouped according to the *KIT* D816V allele frequency in the BM (A), s β 2M levels (B), and the presence vs absence of pathogenic variants in the A/R/D gene panel with VAFs $\geq 30\%$ (C).

fully in line with previous observations from our group in an independent cohort of 145 ISM patients in whom the mutational status for genes other than *KIT* had not been investigated⁴; in addition, they also show for the first time that detection of multilineal *KIT* based on laborious analysis of the *KIT* mutation in (multiple) purified BM cell populations might be replaced by

a much simpler, faster, and easy-to-standardize quantitative ASO-qPCR approach to evaluate the *KIT* VAF in whole-BM samples.²² This change in *KIT* detection procedure is also probably supported by the fact that assessment of the *KIT* VAF in BM provides information about the degree of involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation and the overall

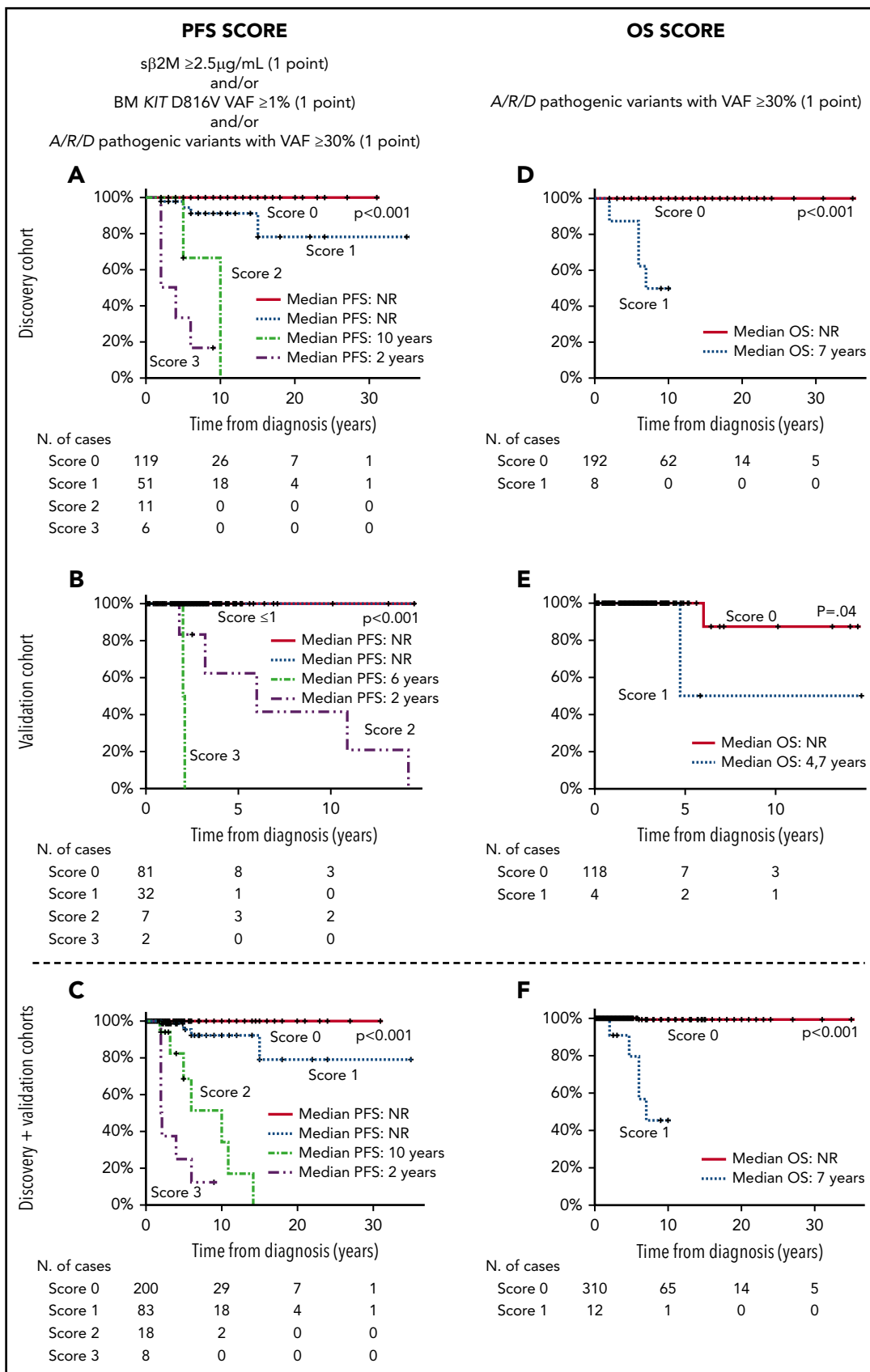


Figure 2. PFS and OS curves of ISM patients, grouped according to the proposed scoring systems, for the discovery and/or the validation patient cohorts. Scoring systems for PFS (A,C,E) and OS (B,D,F) are based on (1) the combination of sβ2M levels at diagnosis (score 1 when ≥ 2.5 μg/mL), and/or the *KIT* D816V VAF in BM (score 1 when ≥ 1%), and/or pathogenic variants in the A/R/D gene panel with VAF ≥ 30% (score 1 when ≥ 1 mutation with VAF ≥ 30% in any of these 3 genes) (A,C,E) and (2) pathogenic variants in the A/R/D gene panel with VAF ≥ 30% (score 1 if there was a mutation in any of these 3 genes with VAF ≥ 30%) (B,D,F). Please note that all patients who scored 1 in (A) had multilineage involvement of BM hematopoiesis by the *KIT* mutation with sβ2M levels < 2.5 μg/mL. NR, not reached.

MC tumor burden, as supported also by the significant, but marginal, correlation observed here and in previous studies between BM *KIT* VAF $\geq 1\%$ and sBT levels and BM MC tumor burden evaluated by flow cytometry and histopathology.³⁸

Interestingly, we confirm the independent prognostic impact of s β 2M levels in ISM.⁴ High s β 2M has also been associated with a poorer outcome in many hematological malignancies other than ISM, such as multiple myeloma, mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, and non-Hodgkin lymphoma, in general,³⁹⁻⁴³ whereas it remains to be specifically investigated in advSM. The precise source of s β 2M in ISM (as well in other hematological tumors) still remains to be fully identified. This is primarily due to the fact that β 2M is constitutively produced and exposed on the surface membrane of nearly all nucleated cells in association with the HLA class I α molecule, from which it is released to the serum in a soluble form.⁴⁴ Previous studies have shown that s β 2M levels increase in parallel with a greater cell turnover⁴⁰ and/or during an immune response (eg, following native antigen interactions with the α 1 and α 2 HLA type I domains) and subsequent disruption of HLA-I α binding to the β 2-microglobulin molecule.⁴⁵

Unlike in previous studies,^{4,12} we could not confirm the independent prognostic value of high SAP levels for OS, which was replaced by the *A/R/D* pathogenic variants with VAF $\geq 30\%$. In this regard, it should be noted that only a small number of all ISM patients showed high s β 2M levels at diagnosis and *A/R/D* pathogenic variants with VAF $\geq 30\%$, with all but 1 dying in the first 6 years following diagnosis of ISM, after they had already undergone disease progression. Interestingly, all such patients also had multilineal *KIT* with BM VAF $\geq 1\%$, thereby representing a very small subgroup of ISM patients with a particularly adverse outcome. However, because of the low number of deaths observed within our ISM cohort, our results regarding OS (despite confirmation in a validation cohort) should be taken with caution; thus, further studies in other independent and larger ISM patient cohorts, with longer follow-up, are required to confirm these still-preliminary findings. Altogether, our results indicate that BM *KIT* VAF and s β 2M levels must be evaluated in every newly diagnosed ISM patient, for early risk stratification and identification of the few ISM cases who are at high risk for disease progression and who might benefit from a closer follow-up and, eventually, also (early) cytoreductive therapy. In addition, testing for the *A/R/D* pathogenic mutations and their VAF should be mandatory in ISM patients, either at diagnosis or just after they progress to SSM or advSM, to identify those cases at higher risk for death.

REFERENCES

- Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727-5736.
- Valent P, Akin C, Bonadonna P, et al. Mast cell activation syndrome: importance of consensus criteria and call for research. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(3):1008-1010.
- Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, et al. Detection of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis:

diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015; 28(8):1138-1149.

- Escribano L, Alvarez-Twose I, Sánchez-Muñoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-521.
- Pardanani A, Tefferi A. Systemic mastocytosis in adults: a review on prognosis and treatment based on 342 Mayo Clinic patients and current literature. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(2):125-132.

- Gotlib J, Pardanani A, Akin C, et al. International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) & European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) consensus response criteria in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;121(13):2393-2401.
- Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. An immature immunophenotype of bone marrow mast cells predicts for multilineage D816V *KIT* mutation in systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2012;26(5):951-958.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) (PI16/00642, CIBERONC, CB16/12/00400); Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (SA013U16, FEDER); Asociación Española de Mastocitosis y enfermedades relacionadas (AEDM 2017); and Fondos de Investigación para Enfermedades Raras del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. M.J.-A. was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (PTA-2016)-Universidad de Salamanca. C.P. was supported by a Personal Técnico de Apoyo (PTA) fellowship (PTA2015-10483-I) from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness. A.M. was supported by CIBERONC (ISCIII). The Spanish National DNA Bank Carlos III was supported by ISCIII and fondos FEDER (PT13/0001/0037 and PT17/0015/0044).

Authorship

Contribution: J.I.M.-G. performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript; M.J.-A. and I.A.-T. supported the statistical analyses, collected data, and reviewed the manuscript; E.V., C.C., C.P., and A. Mayado analyzed data and reviewed the manuscript; A.H. provided patients' clinical data and reviewed the manuscript; L.S.-M., A. Matito, and N.D.-F. reviewed the manuscript; and A.O. and A.C.G.-M. designed the study, analyzed the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: J.I.M.-G., 0000-0001-8982-5663; I.Á.-T., 0000-0002-1190-4473; M.J.-A., 0000-0001-7965-7512; C.P., 0000-0001-8178-9768; A. Mayado, 0000-0003-1498-7398; A. Matito, 0000-0002-9547-4844; A.O., 0000-0002-0007-7230; A.C.G.-M., 0000-0003-4360-1386.

Correspondence: Alberto Orfao, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, Paseo de la Universidad de Coimbra, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: orfao@usal.es; and Andrés C. García-Montero, Edificio Multiusos I+D+i, C/Espejos, 37007 Salamanca, Spain; e-mail: angarmon@usal.es.

Footnotes

Submitted 19 November 2018; accepted 23 May 2019. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 31 May 2019; DOI 10.1182/blood.2018886507.

*A.O. and A.C.G.-M. contributed equally to this work and should be considered last authors.

Data will be published in COSMIC database.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

8. Jawhar M, Schwaab J, Hausmann D, et al. Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(12):2342-2350.
9. Mayado A, Teodosio C, Garcia-Montero AC, et al. Increased IL6 plasma levels in indolent systemic mastocytosis patients are associated with high risk of disease progression. *Leukemia*. 2016;30(1):124-130.
10. Pardanani A, Shah S, Mannelli F, et al. Mayo alliance prognostic system for mastocytosis: clinical and hybrid clinical-molecular models. *Blood Adv*. 2018;2(21):2964-2972.
11. Pardanani A, Lasho T, Barraco D, Patnaik M, Elala Y, Tefferi A. Next generation sequencing of myeloid neoplasms with eosinophilia harboring the FIP1L1-PDGFR mutation. *Am J Hematol*. 2016;91(3):E10-E11.
12. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-143.
13. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013; 122(14):2460-2466.
14. Traina F, Visconte V, Jankowska AM, et al. Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43090.
15. Muñoz-González JI, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv*. 2018;2(21):2814-2828.
16. Pardanani A, Lasho T, Elala Y, et al. Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: Derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. *Am J Hematol*. 2016;91(9):888-893.
17. Naumann N, Jawhar M, Schwaab J, et al. Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(5):252-259.
18. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017; 129(11):1420-1427.
19. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, et al; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(9):1908-1975.
20. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-2372.
21. Sotlar K, Escribano L, Landt O, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol*. 2003;162(3):737-746.
22. Kristensen T, Vestergaard H, Møller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13(2): 180-188.
23. Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*. 1981;147(1):195-197.
24. Fu W, O'Connor TD, Jun G, et al; NHLBI Exome Sequencing Project. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants [published correction appears in *Nature* 2013;495(7440): 270]. *Nature*. 2013;493(7431):216-220.
25. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al; 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
26. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al; Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536(7616):285-291.
27. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812-3814.
28. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4): 248-249.
29. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):4-23.
30. Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
31. Delgado J, Pereira A, Villamor N, López-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in hematologic malignancies: recommendations for clinicians. *Haematologica*. 2014;99(9): 1410-1420.
32. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L; REMA. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007;138(1):12-30.
33. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. KIT D816V-mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood*. 2016;127(6): 761-768.
34. Jawhar M, Schwaab J, Meggendorfer M, et al. The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica*. 2017; 102(6):1035-1043.
35. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia*. 2015;29(5):1115-1122.
36. Tie R, Zhang T, Fu H, et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e93353.
37. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7): 1153-1158.
38. Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, et al. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014; 69(6):810-813.
39. Yoo C, Yoon DH, Suh C. Serum beta-2 microglobulin in malignant lymphomas: an old but powerful prognostic factor. *Blood Res*. 2014;49(3):148-153.
40. Wu L, Wang T, Gui W, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Oncology*. 2014;87(1):40-47.
41. Seo S, Hong JY, Yoon S, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Oncotarget*. 2016;7(47): 76934-76943.
42. Yoo C, Yoon DH, Kim S, et al. Serum beta-2 microglobulin as a prognostic biomarker in patients with mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2016;34(1):22-27.
43. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, et al; Spanish Network of Cancer Research Centers (C03/10). Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia*. 2005;19(3):449-455.
44. Güssow D, Rein R, Ginjaar I, et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *J Immunol*. 1987;139(9):3132-3138.
45. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J*. 1997;321(Pt 2): 265-279.

Supplemental Table S-1.- Comparison of clinical-biological and genetic features of discovery

CLINICAL AND BIOLOGICAL FEATURES	Total N=322	Discovery N=200	Validation N=122	P-value
Age at diagnosis (years)*	46 [0-78]	44 [0-76]	50 [10-78]	.04
Sex (F)	152/322 (47%)	97/200 (49%)	55/122 (45%)	NS
Skin lesions	231/322 (72%)	151/200 (76%)	80/122 (66%)	NS
Organomegalies:				
Hepatomegaly	19/314 (6%)	15/196 (8%)	4/118 (3%)	NS
Splenomegaly	18/315 (6%)	10/196 (5%)	8/119 (7%)	NS
Osteolysis/osteoporosis (without bone fractures)	46/292 (16%)	29/170 (17%)	17/122 (14%)	NS
Mild cytopenia	21/312 (7%)	13/196 (6.6%)	8/116 (7%)	NS
Hemoglobin (g/L)*	142 [100-190]	142 [100-190]	143 [110-180]	NS
ANC (x 10 ⁹ /L)*	3.6 [0.5-10]	3.6 [1.6-10]	3.6 [0.5-10]	NS
N. of platelets (x 10 ⁹ /L)*	240 [100-480]	235 [100-480]	243 [114-418]	NS
sBT (µg/L)*	30.3 [4-1298]	32.9 [4-1298]	26 [5-914]	.02
≥200 µg/L	200/320 (6%)	14/199 (7%)	6/121 (5%)	NS
LDH (U/L)*	262 [90-704]	256 [97-530]	274 [90-704]	NS
<230 U/L	78/301 (26%)	50/190 (26%)	28/111 (25%)	NS
SAP (U/L)*	69 [6-290]	66 [6-758]	74 [34-279]	.03
≥140 U/L	17/303 (6%)	11/193 (6%)	10/114 (9%)	NS
sβ2M (µg/mL)*	1.72 [0.2-6.9]	1.7 [0.9-6.9]	1.9 [0.2-4.5]	NS
≥2.5 µg/mL	34/309 (11%)	17/187 (9%)	17/122 (14%)	NS
IgE (KU/L)*	21.7 [2-2395]	20.7 [2-2395]	26.5 [2-815]	.04
≥100 KU/L	48/279 (17%)	22/176 (13%)	26/103 (25%)	.007
Progression to SSM or advSM	21/322 (7%)	14/200 (7%)	7/122 (6%)	NS
Death	6/322 (2%)	4/200 (2%)	2/122 (2%)	NS
GENETIC FEATURES		Discovery N=200	Validation N=122	P-value
D816V KIT	313/322 (97%)	191/200 (95.5%)	122/122 (100%)	NS
ASXL1	8/322 (3%)	7/200 (4%)	1/122 (1%)	NS
CBL	2/322 (0.6%)	1/107 (1%)	1/122 (1%)	NS
CDH11	1/322 (0.3%)	1/200 (1%)	0/122 (0%)	NS
DNMT3A	18/322 (6%)	10/200 (5%)	8/122 (7%)	NS
EPHA7	2/322 (0.6%)	1/200 (1%)	1/122 (1%)	NS
ITGA10	8/322 (3%)	2/200 (1%)	6/122 (5%)	.03
JAK2	2/107 (2%)	2/107 (2%)	NT	-
KAT6B	1/322 (0.3%)	1/200 (1%)	0/122 (0%)	NS
KRAS	2/107 (2%)	2/107 (2%)	NT	-
PIK3CD	3/322 (1%)	3/200 (2%)	0/122 (0%)	NS
ROS1	2/322 (0.6%)	2/200 (1%)	0/122 (0%)	NS
RUNX1	2/322 (0.6%)	2/200 (1%)	0/122 (0%)	NS
SF3B1	2/322 (0.6%)	2/200 (1%)	0/122 (0%)	NS
SRSF2	2/322 (0.6%)	0/200 (0%)	2/122 (2%)	.04
TET2	9/322 (3%)	4/200 (2%)	5/122 (4%)	NS
≥1 variant other than <i>KIT</i>	55/322 (17%)	35/200 (18%)	20/122 (16%)	NS
≥1 pathogenic variant other than <i>KIT</i>	23/322 (7%)	14/200 (7%)	9/122 (7%)	NS
A/R/D mutations	27/322 (8%)	18/200 (9%)	9/122 (7%)	NS
A/R/D pathogenic mutations	17/322 (5%)	9/200 (5%)	8/122 (7%)	NS
A/R/D pathogenic mutations AF ≥30% in BM	12/322 (4%)	8/200 (4%)	4/122 (3%)	NS
<i>KIT</i> D816V allele frequency ≥1% in BM	108/313 (35%)	78/191 (40%)	30/122 (25%)	.003

Results expressed as number of cases and percentage between brackets or *as median values and [range]. Per definition all (ISM) cases showed hemoglobin levels ≥ 100 g/L, neutrophil counts $\geq 1000/\mu\text{L}$ and platelet counts $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$. **AdvSM**, aggressive SM, SM associated with another neoplasm and mast cell leukemia; **AF**, allele frequency; **ANC**, absolute neutrophil count; **BM**, bone marrow; **s β 2M**, serum beta-2-microglobulin; **F**, female; **IgE**, immunoglobulin E; **ISM**, indolent systemic mastocytosis; **LDH**, lactate dehydrogenase; **NS**, statistically not significant; **NT**, not tested; **SAP**, serum alkaline phosphatase; **sBT**, serum baseline tryptase; **SSM**, smouldering SM; **Mild cytopenia**, was established considering hemoglobin levels < 120 g/L and/or platelets $< 120 \times 10^9/\text{L}$ and/or ANC $< 2.6 \times 10^9/\text{L}$.

Supplemental Table S-2.- List of genetic variants identified in ISM patients and their corresponding allele frequency in the discovery (panel A) and validation (panel B) cohorts.

A: Discovery cohort

Patient ID#	Pattern of KIT D816V BM involvement	Gene	Amino acid change		Reference sequence transcript ID	BM allele burden	COSMIC ID	Number of References	Variant nature
			Coding	Protein					
#6	MML	DNMT3A	c.A269G	p.N90S	NM_175630	43%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	7%	COSM1314	854	Pathogenic
#12	MM	RUNX1	c.T346C	p.F116L	NM_001754	48%	COSM6022396	5	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.7%	COSM1314	854	Pathogenic
#19	MML	DNMT3A	c.C2644T	p.R882C	NM_022552	47%	COSM53042	353	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	24%	COSM1314	854	Pathogenic
#33	MM	ASXL1	c.2894_2896del	p.965_966del	NM_015338	35%	COSM4385115	2	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	4%	COSM1314	854	Pathogenic
#36	MC	SF3B1	c.A422G	p.Y141C	NM_001005526	50%	COSM241581	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.2%	COSM1314	854	Pathogenic
#42	MM	JAK2	c.C1814A	p.S605Y	NM_004972	19%	COSM6849487	1	VUS
		KRAS	c.T560A	p.I187N	NM_004985	20%	COSM6006398	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.2%	COSM1314	854	Pathogenic
#45	MM	TET2	c.4479delG	p.K1493fs	NM_001127208	41%	COSM43488	1	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	49%	COSM1314	854	Pathogenic
#49	MC	DNMT3A	c.C2644T	p.R882C	NM_175629	4%	COSM53042	353	Pathogenic
		DNMT3A	c.T2264C	p.F755S	NM_175629	30%	COSM2911748	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	1%	COSM1314	854	Pathogenic
#53	MM	ROS1	c.G2729T	p.G910V	NM_002944	47%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	8%	COSM1314	854	Pathogenic
#56	MM	TET2	c.1837dupG	p.612fs	NM_017628	29%	COSM4759845	1	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	8%	COSM1314	854	Pathogenic
#59	MC	DNMT3A	c.A269G	p.N90S	NM_175630	48%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0%	COSM1314	854	Pathogenic
#62	MM	PIK3CD	c.C2461T	p.R821C	NM_005026	49%	COSM1503840	7	VUS
		EPHA7	c.C1997T	p.T666I	NM_004440	42%	COSM4155328	3	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.9%	COSM1314	854	Pathogenic
#67	MML	JAK2	c.G1849T	p.V617F	NM_004972	39%	COSM12600	41459	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.9%	COSM1314	854	Pathogenic
#68	MC	ASXL1	c.G4561T	p.A1521S	NM_015338	11%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0%	COSM1314	854	Pathogenic
#72	MC	DNMT3A	c.G1743C	p.W581C	NM_175629	14%	COSM133127	16	Pathogenic
		DNMT3A	c.G2159T	p.R720L	NM_175629	20%	COSM1407104	3	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.02%	COSM1314	854	Pathogenic
#73	MC	SF3B1	c.A422G	p.Y141C	NM_001005526	48%	COSM241581	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0%	COSM1314	854	Pathogenic
#84	MC	TET2	c.C4832A	p.S1611Y	NM_001127208	48%	COSM1049765	2	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0%	COSM1314	854	Pathogenic
#87	MC	KAT6B	c.G2612A	p.R871Q	NM_012330	54%	COSM3686865	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0%	COSM1314	854	Pathogenic
#88	MM	CDH11	c.G1430T	p.R477M	NM_001797	50%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	1.1%	COSM1314	854	Pathogenic
#96	MC	PIK3CD	c.C2944T	p.982W	NM_005026	8%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.1%	COSM1314	854	Pathogenic
#101	MM	ITGA10	c.C3223T	p.R1075X	NM_003637	53%	-	-	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	3%	COSM1314	854	Pathogenic
#106	MC	ASXL1	c.C404G	p.S135C	NM_015338	27%	COSM6092858	2	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0%	COSM1314	854	Pathogenic
#114	MC	ASXL1	c.2894_2896del	p.965_966del	NM_015338	46%	COSM4385115	2	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.9%	COSM1314	854	Pathogenic
#118	MC	ASXL1	c.G656T	p.G219V	NM_015338	50%	-	-	VUS
		ROS1	c.A5446C	p.T1816P	NM_002944	51%	COSM4340412	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	1.3%	COSM1314	854	Pathogenic
#125	MM	DNMT3A	c.C1913G	p.S638C	NM_175629	14%	COSM5878792	2	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	3%	COSM1314	854	Pathogenic
#134	MML	RUNX1	c.T438G	p.N146K	NM_001754	50%	COSM5879756	11	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	40%	COSM1314	854	Pathogenic

#137	MML	ASXL1	c.1888_1910del	p.H630fs	NM_015338	35%	COSM41716	28	Pathogenic
		DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	40%	COSM52944	851	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	8%	COSM1314	854	Pathogenic
#143	MC	PIK3CD	c.G274A	p.V92M	NM_005026	46%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.1%	COSM1314	854	Pathogenic
#149	MML	ASXL1	c.2531delC	p.T844fs	NM_015338	38%	COSM6494661	3	Pathogenic
		CBL	c.T1150C	p.C384R	NM_005188	12%	COSM34057	13	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	21%	COSM1314	854	Pathogenic
#152	MM	DNMT3A	c.C958T	p.R320X	NM_175629	38%	COSM133721	9	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	1%	COSM1314	854	Pathogenic
#159	MM	DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	50%	COSM52944	851	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	9.9%	COSM1314	854	Pathogenic
#184	MM	KRAS	c.G210T	p.Q70H	NM_004985	24%	COSM5008063	2	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	9.9%	COSM1314	854	Pathogenic
#189	MC	TET2	c.G2179T	p.A727S	NM_017628	17%	COSM222930	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.2%	COSM1314	854	Pathogenic
#190	MC	ITGA10	c.C3499T	p.Q1167X	NM_003637	38%	-	-	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.1%	COSM1314	854	Pathogenic
#193	MML	DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	42%	COSM52944	851	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	37%	COSM1314	854	Pathogenic

B: Validation cohort

Patient ID#	Pattern of KIT D816V BM involvement	Gene	Amino acid change		Reference sequence transcript ID	BM allele burden	COSMIC ID	Number of References	Variant nature
			Coding	Protein					
#204	MML	TET2	c.C1954T	p.Q652X	NM_017628	48%	COSM42047	10	Pathogenic
		TET2	c.836_849del	p.T279fs	NM_017628	43%	COSM5944490	1	Pathogenic
		DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	48%	COSM52944	851	Pathogenic
		SRSF2	c.C284G	p.P95R	NM_003016	34%	COSM211661	106	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	8,6%	COSM1314	854	Pathogenic
#211	MML	DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	45%	COSM52944	851	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	28%	COSM1314	854	Pathogenic
#235	MML	DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	19%	COSM52944	851	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	9,4%	COSM1314	854	Pathogenic
#251	MM	ITGA10	c.C2958G	p.I986M	NM_003637	46%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	2,9%	COSM1314	854	Pathogenic
#273	MM	ITGA10	c.C671T	p.T224M	NM_003637	44%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	8%	COSM1314	854	Pathogenic
#283	MC	ITGA10	c.C2529G	p.I843M	NM_001303041	40%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	<1%	COSM1314	854	Pathogenic
#284	MM	ASXL1	c.1927dupG	p.G642fs	NM_015338	24%	COSM1411076	102	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	2%	COSM1314	854	Pathogenic
#302	MC	ITGA10	c.G1005C	p.Q335H	NM_001303041	24%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.5%	COSM1314	854	Pathogenic
#325	MC	DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	44%	COSM52944	851	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.02%	COSM1314	854	Pathogenic
#327	MC	EPHA7	c.A2024C	p.Q675P	NM_004440	40%	-	-	VUS
		ITGA10	c.G1993A	p.D665N	NM_003637	45%	COSM4576223	1	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.01%	COSM1314	854	Pathogenic
#331	MC	DNMT3A	c.G2645A	p.R882H	NM_175629	6%	COSM52944	851	Pathogenic
		TET2	c.3764dupA	p.Y1255fs	NM_001127208	40%	COSM110747	1	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.08%	COSM1314	854	Pathogenic
#339	MC	DNMT3A	c.C1139T	p.A380V	NM_175629	42%	COSM1019237	8	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.2%	COSM1314	854	Pathogenic
#344	MC	ITGA10	c.T2332A	p.S778T	NM_003637	43%	-	-	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.5%	COSM1314	854	Pathogenic
#346	MC	TET2	c.T4184A	p.V1395E	NM_001127208	46%	-	-	VUS
		DNMT3A	c.C1988T	p.S663L	NM_175629	49%	COSM1583141	1	VUS
		TET2	c.1859dupA	p.Y620fs	NM_017628	40%	COSM5990055	1	Pathogenic
		DNMT3A	c.C2141T	p.S714F	NM_175629	36%	COSM5580894	30	Pathogenic
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.2%	COSM1314	854	Pathogenic
#360	MC	TET2	c.A5669G	p.N1890S	NM_001127208	33%	COSM5708976	5	VUS
		KIT	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.5%	COSM1314	854	Pathogenic
#365	MC	ROS1	c.G3080A	p.G1027D	NM_002944	47%	-	-	VUS

		<i>KIT</i>	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.3%	COSM1314	854	Pathogenic
#367	<i>MC</i>	<i>ROS1</i>	c.G6200T	p.C2067F	NM_002944	46%	-	-	VUS
		<i>KIT</i>	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	3%	COSM1314	854	Pathogenic
#383	<i>MC</i>	<i>DNMT3A</i>	c.A1258T	p.K420X	NM_175629	15%	-	-	Pathogenic
		<i>KIT</i>	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.3%	COSM1314	854	Pathogenic
#388	<i>MC</i>	<i>CBL</i>	c.C1648T	p.R550W	NM_005188	49%	COSM6910465	1	VUS
		<i>KIT</i>	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	0.06%	COSM1314	854	Pathogenic
#390	<i>MM</i>	<i>SRSF2</i>	c.C284G	p.P95R	NM_003016	20%	COSM211661	106	Pathogenic
		<i>TET2</i>	c.824A>T	p.N275I	NM_017628.4	53%	-	-	VUS
		<i>KIT</i>	c.A2447T	p.D816V	NM_000222.2	1.8%	COSM1314	854	Pathogenic

Mutated allele burden in BM expressed as percentage of total gene sequence reads. The number of references represents the number of times a mutation has been reported in the literature, according to the COSMIC database (v85, released 08-MAY-18); Abbreviations: **del**, deletion; **fs**, frameshift mutation; **NA**, not available; **VUS**, variant of unknown significance; -, not yet registered in the COSMIC database.

Supplemental Table S-3.-ISM patients from the discovery cohort who showed progression to advanced SM (n=14): clinical and biological features at diagnosis and at disease progression.

PATIENT ID#	#200		#196		#193		#145		#159		#41		#134		#146		#52		#158		#19		#137		#149		#5			
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
Sex	F		M		M				F		F		M		F		M		M		M		M		F		M		M	
Age (years)	71	76	44	46	62	66	27	33	57	62	39	54	66	68	11	25	0	32	32	62	57	63	47	49	53	55	58	59		
CLINICAL/BIOLOGICAL FEATURES																														
Skin lesions	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Hepatomegaly (H) /splenomegaly	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Spleen size (cm)	13		15		15		14		15		15		16		17		17		15		15		17		17		17			
Osteolysis/osteoporosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM MC morphohy	<30	<30	90		<30	<30	<30	90	<30	80	<30	50	<30	30	<30	90	<30	60	<30	90	<30	<30	<30	70	<30	<30	<30	<30	<30	70
BM MC aggregates (%)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spindle-shaped MC	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dysmyelopoiesis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hypoalbuminaemia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Weight loss	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemoglobin <110 g/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANC <1 x 10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. of platelets <100 x 10 ⁹ /L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sBT µg/l	208	289	267	310	197	83	325	348	102	235	175	240	270	305	1077	1970	332	430	1298	2036	362	1507	290	312	160	181	210	258		
LDH <230 U/L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	NA	+	NA	+	NA	+	+	+	-	-	-	-	+	+		
SAP >140 U/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	NA	+	NA	+	NA	+	NA	+	-	-	NA	-	+	+	+	+	+	+
sβ2M ≥2.5 µg/mL	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	NA	+	NA	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MUTATIONAL PROFILE																														
Multilineal involvement	MML		MML		MML		MM*		MM		MML*		MML		MML*		MML*		MML*		MML*		MML*		MML		MML		MML	
D816V+MSC	NA		+		NA		NA		NA		+		+		NA		+		+		+		+		+		+		+	
BM allele burden (%)	31		8		37		11		10		2*		49		7		59*		7		24*		8		21		13			
Other mutations	-		-		+		-		+		-		-		-		-		-		+		+		+		+		+	
					DNMT3A				DNMT3A												DNMT3A		DNMT3A		ASXL1		ASXL1		ASXL1	
OUTCOME																														
Type of disease progression	SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM		SSM	
PFS (years)	5		2		4		6		5		15		2		14		32		30		6		6		2		2		9	
OS (years)	11		10		10		17		10		18		6		31		35		35		7		7		6		2		18	
Exitus	-		-		-		-		-		-		+		-		-		-		+		+		+		+		-	

Abbreviations: **ANC**, absolute neutrophil count; **ASM**, aggressive systemic mastocytosis; **BM**, bone marrow; **D**, at diagnosis; **F**, Female; **LDH**, lactate dehydrogenase; **M**, male; **MIM**, multilineal (myeloid) BM involvement by the D816V *KIT* mutation **MIML**, multilineal (myeloid+lymphoid) BM involvement by the D816V *KIT* mutation; **MSC**, mesenchymal stem cells; **NA**, not available; **NS**, not statistically significant; **OS**, overall survival; **P**, at progression; **PFS**, progression free survival; **SAP**, serum alkaline phosphatase; **sBT**, serum baseline tryptase; **sB2M**, serum beta-2-microglobulin; **SM-AHN**, systemic mastocytosis associated to another hematologic neoplasm; **SSM**, smoldering systemic mastocytosis; -, values considered negative for the specified threshold/absent; +, values considered positive for the specified threshold/present; *, analyses were not performed at diagnosis but prior to disease progression; **§**, with organ impairment.

Supplemental Table S-4.-ISM patients from the validation cohort who showed progression to advanced SM (n=7): clinical and biological features at diagnosis and at disease progression.

PATIENT ID#		#206		#215		#284		#204		#253		#390		#211	
		D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P
Sex		F		M		M		M		F		M		F	
Age (years)		65	69	61	72	43	57	73	75	52	54	66	70	35	37
CLINICAL/BIOLOGICAL FEATURES															
Skin lesions		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hepatomegaly (H) /splenomegaly		-	+	-	+	-	+	-	+H	-	+	-	+§	-	+H
Spleen size (cm)		15		14		13				18		22			
Osteolysis/osteoporosis		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BM MC morphology															
BM MC aggregates (%)		<30	30	<30	50	<30	NA	<30	<30	<30	90	<30	<30	<30	NA
Spindle-shaped MC		+		+		+		+		+		+		+	
Dysmyelopoiesis		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Hypoalbuminaemia		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Weight loss		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Hemoglobin <110 g/L		-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
ANC <1 x 10 ⁹ /L		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N. of platelets <100 x 10 ⁹ /L		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
sBT µg/l		127	197	380	230	802	914	730	851	190	386	123	53	188	56
LDH <230 U/L		-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SAP >140 U/L		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
sβ2M ≥2.5 µg/mL		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MUTATIONAL PROFILE															
KIT D816V	Multilineal involvement	MM		MML		MM		MML		MM		MM		MML	
	BM allele burden (%)	40		40		2.1		8.6		6.2		1.8		28	
Other mutations		-		-		ASXL1		SRSF2 DNMT3A TET2		-		SRSF2 TET2		DNMT3A	
OUTCOME															
Type of disease progression		SSM		SSM		SSM		ASM		ASM		SM-AHN		SM-AHN	
PFS (years)		3		11		14		2		2		6		2	
OS (years)		5		14		15		3		3		6		5	
Exitus		-		-		-		-		-		+		+	

Abbreviations: **ANC**, absolute neutrophil count; **ASM**, aggressive systemic mastocytosis; **BM**, bone marrow; **D**, at diagnosis; **F**, Female; **LDH**, lactate dehydrogenase; **M**, male; **MM**, multilineal (myeloid) BM involvement by the D816V *KIT* mutation **MML**, multilineal (myeloid+lymphoid) BM involvement by the D816V *KIT* mutation; **MSC**, mesenchymal stem cells; **NA**, not available; **NS**, not statistically significant; **OS**, overall survival; **P**, at progression; **PFS**, progression free survival; **SAP**, serum alkaline phosphatase; **sBT**, serum baseline tryptase; **sβ2M**, serum beta-2-microglobulin; **SM-AHN**, systemic mastocytosis associated to another hematologic neoplasm; **SSM**, smoldering systemic mastocytosis; -, values considered negative for the specified threshold/absent; +, values considered positive for the specified threshold/present; *, analyses were not performed at diagnosis but prior to disease progression; §, with organ impairment.

Artículo 3: “Propuesta de un algoritmo pronóstico universal para pacientes diagnosticados de mastocitosis sistémica”

Introducción. La SM constituye un grupo heterogéneo de enfermedades hematológicas entre las que se incluyen una gran mayoría de pacientes (90%-95%) con una esperanza de vida normal (NonAdvSM) y un grupo más reducido de casos con pronóstico adverso (AdvSM). Sin embargo, el pronóstico de cada paciente a nivel individual dentro de estos dos grupos de SM (y en cada uno de los distintos subtipos diagnósticos OMS de SM) sigue siendo muy heterogéneo. Así, mientras una pequeña parte de las NonAdvSM progresa a formas avanzadas de la enfermedad con un incremento importante del riesgo de muerte, una proporción significativa de los pacientes diagnosticados de formas AdvSM presentan un curso clínico estable durante años. Así, aunque la clasificación actual de la OMS constituye una herramienta muy útil para la estratificación al diagnóstico de los pacientes con SM en formas no avanzadas y avanzadas de la enfermedad, no proporciona información suficiente para predecir la futura evolución de la enfermedad a nivel individual, dentro de cada subtipo diagnóstico de SM. Por este motivo, recientemente se han diseñado y validado diferentes algoritmos pronósticos en los que en base a distintas combinaciones de parámetros clínicos, de laboratorio y moleculares, se propone una estratificación de los pacientes con formas NonAdvSM y/o AdvSM según su riesgo de progresión y/o muerte; esto permitiría en principio, un seguimiento más adecuado de la enfermedad y la toma de decisiones terapéuticas de forma optimizada para cada paciente. No obstante, un análisis detallado de los beneficios de estos modelos de estratificación de riesgo en SM demuestra que cada uno de ellos se ha elaborado partiendo de un conjunto de parámetros clínicos, biológicos y genéticos distintos, no habiéndose realizado en ningún estudio independiente una validación simultánea de los mismos.

Objetivo. En este trabajo nos propusimos diseñar y validar en una amplia cohorte de pacientes con SM representativa de la heterogeneidad real de esta enfermedad, un algoritmo pronóstico capaz de predecir de forma robusta y fiable la progresión de la enfermedad a formas más graves de la misma y/o la supervivencia global de pacientes con SM, basado en el análisis simultáneo de todos los parámetros que han demostrado tener valor pronóstico independiente en estudios previos; en un

segundo paso, nuestro objetivo se centró en determinar la capacidad predictiva del algoritmo resultante del análisis anterior, respecto a los sistemas de estratificación de riesgo propuestos previamente.

Pacientes, materiales y métodos. En conjunto estudiamos un total de 1275 pacientes con diferentes formas de SM distribuidos en una serie de exploración (n=422) y una cohorte de validación (n=853). En estos pacientes analizamos simultáneamente todas las variables que habían sido identificadas previamente como factores pronósticos independientes en los 7 algoritmos pronósticos definidos en los años 2018 y 2019. La capacidad predictiva del algoritmo resultante (GPSM, abreviado del inglés “*Global Prognostication Score for Mastocytosis*”) se comparó con la de los demás modelos predictivos propuestos para pacientes con SM a través del índice de Harrell’s (índice C), con el objetivo de identificar cual sería la mejor combinación de parámetros clínicos, biológicos y genéticos para predecir la PFS y la OS de pacientes con SM.

Resultados. De acuerdo con los resultados de los análisis univariante y multivariante de factores pronósticos realizados en la serie exploratoria de pacientes con SM, elaboramos dos nuevos modelos predictivos (GPSM) para PFS y OS. El modelo GPSM-PFS estaba basado en la combinación de tres factores pronósticos (adversos) independientes que incluían: un número de plaquetas en sangre $\leq 100 \times 10^9/L$ y niveles elevados de s β 2M ($\geq 2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$) y de triptasa basal ($\geq 125 \text{ng}/\text{mL}$) en suero. A su vez el modelo GPSM-OS se basó en los niveles de hemoglobina en sangre ($\leq 110 \text{g}/\text{L}$ vs $> 110 \text{g}/\text{L}$), los niveles séricos de fosfatasa alcalina ($< 140 \text{UI}/\text{L}$ vs $\geq 140 \text{UI}/\text{L}$) y la presencia vs ausencia de mutaciones en los genes *ASXL1/RUNX1/DNMT3A*. Ambos modelos permitieron estratificar al conjunto de pacientes con SM en grupos de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo, tanto en la cohorte exploratoria como en la de validación. De forma similar, pudimos corroborar que los 7 modelos pronósticos propuestos previamente estratificaban a los pacientes con SM en grupos con distinto riesgo de progresión y/o muerte. No obstante, la comparación directa entre estos modelos y los dos modelos propuestos en este trabajo mostró que los sistemas GPSM-PFS (índice C: 0,84) y REMA-PFS (índice C: 0,83) constituían

en nuestra serie global de 1275 pacientes los dos algoritmos con mejor capacidad predictiva para PFS, especialmente cuando restringimos el análisis a aquellos pacientes con formas NonAdvSM (índice C: 0,85 y 0,93, respectivamente). En contrapartida, los *scores* GPSM-OS y AdvSM-IPSM resultaron ser los de mayor capacidad predictiva para OS, tanto en la serie global de pacientes con SM (índice C: 0,92 y 0,90, respectivamente) como cuando se restringía el análisis a los pacientes con AdvSM (índice C: 0,72 y 0,73, respectivamente)

Conclusiones: En conjunto, estos resultados demuestran que en la actualidad es posible clasificar los pacientes con SM de forma robusta y fiable según su riesgo de progresión y/o muerte, basándose únicamente en biomarcadores detectables en sangre y disponibles de forma universal en laboratorios de todo el mundo, lo que ayudará a definir en el futuro estrategias de seguimiento y de tratamiento más adecuadas para los pacientes con SM de nuevo diagnóstico, tanto en el contexto de ensayos clínicos como en el mundo real.



Prognostication Score for Systemic Mastocytosis

Javier I Muñoz-González, MSc^{1,2}, Iván Álvarez-Twose, MD^{2,3}, María Jara-Acevedo, PhD^{2,4}, Roberta Zanotti, MD¹⁴, Cecelia Perkins MPH¹¹, Mohamad Jawhar, MD¹², Wolfgang R. Sperr, MD¹⁵, Khalid Shoumariyeh, MD¹³, Juliana Schwaab, MD¹², Georg Greiner, MD¹⁸, Ana Henriques, PhD^{2,3}, Carolina Caldas, MSc^{1,2}, Carlos Fernández-Giménez, MD^{1,2}, Laura Sánchez-Muñoz, MD^{2,3}, Andrea Mayado, PhD^{1,2}, Alba Pérez-Pons, MSc^{1,2}, Annette Schmitt-Graeff, MD¹⁶, Justus Duyster, MD¹³, Ilaria Tanasi, MD¹⁴, Francesco Olivieri, BSc¹⁷, Elvira Mora-Casterá, MD⁵, Irene Luna, MD⁵, Leonor Senent, MD⁵, Maria-Helena Baiñas, MD⁶, Amanda Nuñez-García, MD⁷, Manuel Jurado-Chacón, MD⁷, Guillermo Martín-Sánchez, MD⁸, Enrique Colado, MD⁹, Blanca Xicoy, MD¹⁰, Georgina Gener-Ricós, MD¹⁰, Jason Gotlib, MD¹¹, Patrizia Bonadonna, MD¹⁷, Andreas Reiter, MD¹², Peter Valent, MD¹⁵, Andrés C García-Montero, PhD^{1,2,*}, Alberto Orfao, MD^{1,2,*}

Summary

Background. Several risk stratification models have been recently proposed for systemic mastocytosis (SM) but have not been directly compared. Here we designed and validated a risk stratification model for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of SM based on all currently available prognostic factors, and compared its predictive capacity for patient outcome with that of other risk scores.

Methods. In a discovery cohort of 422 SM patients, we evaluated the prognostic impact of previously identified independent prognostic features for PFS and OS and designed a global prognostic score for mastocytosis (GPSM). The GPSM score was validated in an independent cohort of 853 patients and compared to pre-existing risk models in the entire patient series (n=1275), using PFS and OS as endpoints and the C-index as readout.

Findings. The GPSM scores for PFS and OS were based on unique combinations of independent prognostic factors for PFS (platelet count $\leq 100 \times 10^9/L$, serum $\beta 2$ microglobulin $\geq 5 \mu g/mL$ and serum baseline tryptase $\geq 125 ng/mL$) and OS (haemoglobin $\leq 110 g/L$, serum alkaline phosphatase $\geq 140 IU/L$ and *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* and/or *DNMT3A* gene mutations), which showed clear-cut discrimination between low-risk and high-risk patients in the discovery and validation cohorts, with a small group of intermediate-risk patients. The GPSM-PFS score was an accurate predictor of PFS of SM (C-index: 0.84) particularly among non-advanced SM (C-index: 0.85). In turn, the GPSM-OS score was an excellent predictor of OS in the entire cohort (C-index: 0.92) and in advanced SM (C-index: 0.72).

Interpretation: All evaluated risk classifications predict outcome in SM. However, the REMA-PFS and GPSM-PFS models for PFS and the AdvSM-IPSM and GPSM-OS scores for OS emerged as the most accurate models, indicating that robust prognosis and patient management may be prospectively achieved based on biomarkers that are easily accessible and widely available in diagnostic laboratories worldwide.

Funding: Instituto Salud Carlos III; FEDER; Junta Castilla-León; Charles and Ann Johnson Foundation; Stanford Cancer Institute Innovation Fund; Austrian Science Fund.

Introduction

Systemic mastocytosis (SM) is a clinically heterogeneous group of haematological diseases that comprises indolent SM patients who (usually) exhibit a normal life expectancy, smouldering SM and other less frequent advanced forms of SM (AdvSM) with poor prognosis, including aggressive SM, SM with an associated haematological neoplasm, and mast cell leukaemia. These SM subtypes are defined by the World Health Organization (WHO)-based classification and related WHO criteria providing useful prognostic information.^{1,10,11} However, the prognoses of individual patients within each WHO SM subvariant show substantial heterogeneity, whereas a high degree of prognostic overlap may also exist across the AdvSM subtypes (aggressive SM, SM with associated haematological neoplasm and mast cell leukaemia).²⁻⁴ Thus, while a fraction of non-advanced SM (NonAdvSM; indolent SM and smouldering SM) patients will progress to more advanced forms of SM and eventually die,^{9,12} some patients with aggressive SM, SM with associated

haematological neoplasm or mast cell leukaemia may demonstrate stable disease for years despite their generally worse survival.⁵⁻⁷ In the last two decades, several clinical, laboratory and molecular prognostic factors have been identified in SM.^{5,9,12-14} More recently, several of these prognostic factors have been combined in up to seven distinct scoring systems currently available for risk stratification of SM patients in general or within their NonAdvSM and AdvSM subgroups.^{5,6,8,9} However, each of these risk stratification models is based on the analysis of distinct sets of pre-selected clinical, laboratory and/or molecular variables, including also the use of different cut-off values for some of the variables employed in these risk scores.^{5,6,8,9} Until now, no study has simultaneously compared all independent prognostic factors included in the previously proposed risk score systems for their prognostic value in SM. In addition, the proposed score systems have not been directly compared to provide guidance on which are more accurate to predict patient

Lancet Haematol 2020

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), University of Salamanca, Salamanca, Spain; Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ²Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain; ³Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast) and CIBERONC, Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain; ⁴Sequencing Service (NUCLEUS), CIBERONC, University of Salamanca and Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL) Salamanca, Spain; ⁵Hospital Universitario y Politécnico de la Fe (Valencia, Spain). ⁶Hospital San Pedro Alcantara (Cáceres, Spain). ⁷Hospital Virgen de las Nieves (Granada, Spain). ⁸Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL) (Santander, Spain). ⁹Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). ¹⁰Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain), and Josep Carreras Leukemia Research Institute; ¹¹Universitat Autònoma de Barcelona. ¹²Division of Hematology, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine / Stanford Cancer Institute, Stanford, California. ¹³Hematology and Oncology, University Hospital Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany. ¹⁴Department of Medicine I, Medical Center - University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany, and German Cancer Consortium (DKTK) Partner Site Freiburg and German Cancer Research

Center (DKFZ), Heidelberg, Germany. ¹⁴Section of Hematology, Department of Medicine, Verona University Hospital, Verona, Italy. ¹⁵Department of Internal Medicine I, Division of Hematology and Ludwig Boltzmann Institute for Hematology and Oncology, Medical University of Vienna, Austria. ¹⁶Albert-Ludwigs-University Freiburg, Freiburg, Germany. ¹⁷Allergy Unit, Verona University Hospital, Verona, Italy. ¹⁸Department of Laboratory Medicine and Ludwig Boltzmann Institute for Hematology and Oncology, Medical University of Vienna, Austria. *These two authors have equally contributed to this work and they should both be considered as 'last and corresponding authors'.

Correspondance: **Professor Alberto Orfao, MD, PhD.** Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, Paseo de la Universidad de Coimbra, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 48 11. Fax: +34 923 29 47 95. e-mail: orfao@usal.es; **Dr Andrés C. García-Montero, PhD.** Edificio Multisusos I+D+i, C/ Espejos, 37007 Salamanca, Spain. Phone: +34 923 29 45 00 Ext: 5475. e-mail: angarmon@usal.es

Research in context

Evidence before this study

Systemic mastocytosis (SM) comprises a highly heterogeneous group of haematological diseases stratified into non-advanced subtypes of SM (NonAdvSM) and advanced SM (AdvSM) with prognostic implications.^{1,2} However, within the NonAdvSM and AdvSM, and each WHO category of SM, the patients' prognoses and outcomes still remain highly heterogeneous with substantial overlap among distinct subtypes of AdvSM.²⁻⁷ Because of this, up to seven different risk stratification models (MAPS, MARS, CRS, REMA-PFS, REMA-OS, NonAdvSM-IPSM, and AdvSM-IPSM) for SM have been proposed since 2018.^{5,6,8,9} However, the independent prognostic factors included in these seven risk stratification models have never been investigated simultaneously. Thus, the different risk stratification classifications have not been directly compared to provide guidance on the most robust and accurate models. In practice, this is particularly relevant since these risk stratification models for SM rely on different combinations of parameters that include both widely available clinical and laboratory parameters and more complex molecular markers that are not readily available in many centres.

Added value of the study

We investigated the prognostic impact of all clinical, laboratory, and genetic variables that had previously emerged as independent prognostic factors in recently proposed risk stratification models for both progression-free survival (PFS) and/or overall survival (OS) of SM, NonAdvSM, and AdvSM, based on a large discovery cohort of 422 patients. Consequently, we designed and validated a global prognostic score for PFS (GPSM-PFS) and OS (GPSM-OS) of SM in an independent international multicentre cohort of 853 SM patients. Direct comparison of the GPSM scores and all pre-existing risk stratification models revealed that the GPSM-PFS score together with the REMA-PFS model were the best predictors for PFS in SM, particularly among NonAdvSM; in turn, the AdvSM-IPSM and the GPSM-OS scores proved to be the most robust predictors for OS in the entire SM cohort and among AdvSM.

Implications of all the available evidence

Altogether, our findings indicate that robust risk stratification can be achieved in SM based on blood/plasma-derived biomarkers that are widely available and easily accessible in routine diagnostic laboratories worldwide, for adequate risk stratification, treatment selection, and patient management.

outcomes (e.g. progression-free survival, PFS and overall survival, OS) in both NonAdvSM and AdvSM. Their selection has become of relevance due to an increasing number of new drugs becoming available with the potential to improve response rates in SM.^{15,16}

In the current study, we developed and validated a risk stratification model based on simultaneous evaluation of all clinical, laboratory and molecular variables that have been previously reported to have independent prognostic value (for PFS and OS) in SM, among a large (discovery plus validation) cohort of 1275 patients. Subsequently, we compared the new scoring system, with other recently proposed risk stratification models for SM, including the Mayo Alliance Prognostic System (MAPS),⁸ the Spanish Network on Mastocytosis scores (REMA-PFS and REMA-OS),⁹ the Clinical Risk Score (CRS),⁶ the Mutation-Adjusted Risk Score for AdvSM (MARS)⁶ and the International Prognostic Scoring Systems for Mastocytosis (NonAdvSM-IPSM and AdvSM-IPSM)⁵.

Patients and Methods

Patients and samples. A retrospective study based on a total of 1275 SM patients divided in two different (discovery and validation) cohorts was performed. The discovery set consisted of 422 SM patients diagnosed at the reference centres of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA): Cancer Research Centre (Salamanca, Spain) and Virgen del Valle Hospital (Toledo, Spain) while the validation set included 853 SM patients had been diagnosed in different centres of

excellence for mastocytosis in the USA and Europe (Appendix p 3). Patients who had undergone an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (n=28) were excluded from both study cohorts. Diagnosis and classification of SM were established according to the WHO criteria and retrospectively revised as per the WHO 2016 classification.¹ For all analyses, SM patients were also classified in NonAdvSM vs AdvSM, with the following distribution: 372 NonAdvSM (368 indolent SM and 4 smouldering SM) and 50 AdvSM (18 aggressive SM, 31 SM with associated haematological neoplasm, and 1 mast cell leukaemia) in the discovery cohort (Appendix p 5), plus 626 NonAdvSM (608 indolent SM and 18 smouldering SM) and 227 AdvSM (44 aggressive SM, 171 SM with associated haematological neoplasm, and 12 mast cell leukaemia) in the validation cohort. Each individual patient was further assigned to the risk groups defined by the following recently proposed score systems: MAPS,⁸ REMA-PFS⁹ and REMA-OS,⁹ CRS,⁶ MARS⁶ and both the NonAdvSM-IPSM⁵ and AdvSM-IPSM⁵ based on clinical, laboratory, and molecular prognostic features (Appendix p 5). Progression of SM was defined only as transformation to a more advanced form of SM and/or associated haematological neoplasm from diagnosis to the last follow-up: i) indolent SM to smouldering SM, aggressive SM, SM with associated haematological neoplasm or mast cell leukaemia, ii) smouldering SM to aggressive

SM, SM with associated haematological neoplasm or mast cell leukaemia; and iii) aggressive SM to SM with associated haematological neoplasm or mast cell leukaemia. In addition, SM patients with associated haematological neoplasm showing leukaemic transformation of the associated haematological neoplasm (e.g. from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukaemia) were also considered to have disease progression. Patients with mast cell leukaemia were excluded from PFS analysis since no further progression can occur, except evolution to a high-grade associated haematological neoplasm. Cyto-reductive treatment given to AdvSM patients is shown in the Appendix (pp 7–14). Prior to entering the study, each individual gave his/her written informed consent to participate according to the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local institutional ethics committees (reference 2016/PI16/00642).

Clinical and laboratory studies. All clinical and laboratory features (and their corresponding cut-offs) that had previously been identified to be of independent prognostic value for OS, PFS and/or event-free survival – i.e. such as age at diagnosis (≥ 60 y),^{5,6,8} haemoglobin (≤ 110 g/L or ≤ 100 g/L),^{5,6} platelet counts ($\leq 150 \times 10^9$ /L or $\leq 100 \times 10^9$ /L),^{5,6,8} serum alkaline phosphatase (SAP; ≥ 140 IU/L or ≥ 100 IU/L),^{5,6,8} serum baseline tryptase (sBT; ≥ 125 ng/mL),⁵ serum β -2 microglobulin (≥ 2 M; $\geq 5 \mu\text{g/mL}$),^{9,12} white blood cell (WBC) counts ($\geq 16 \times 10^9$ /L),⁵ *KIT* D816V allele frequency in bone marrow ($\geq 1\%$),⁹ presence of one or more *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1*, and/or *DNMT3A* gene mutations^{6,8,9,14} were all assessed at diagnosis. Due to the retrospective value of the study within the entire cohort of patients (n=1275), 602 (47%) cases had available data for every variable under study; these included 359/422 (85%) patients in the discovery cohort and 243/853 (28%) cases in the validation series (Appendix p 5).

Molecular analyses. Targeted next-generation sequencing was performed locally in whole bone marrow-derived genomic DNA (gDNA) for the *ASXL1*, *DNMT3A*, *KIT*, *RUNX1*, and *SRSF2* genes for every patient. Technical details regarding library preparation, exome DNA sequencing, alignment, variant calling and filtering of the variants is provided in the appendix (pp 3–4). Analysis of genetic variants of *KIT* at codon 816 was performed in parallel in whole bone marrow gDNA from SM patients in the discovery cohort by a real-time allele-specific oligonucleotide PCR, as described elsewhere¹⁷ and in the Appendix (pp 3–4).

Statistical methods. PFS and OS curves were plotted by the Kaplan-Meier method and measured as time from diagnosis to progression to more advanced forms of SM and death or to the last visit in case of stable disease and patients that remained alive, respectively. For PFS analysis, death was not censored for consistency with previous studies analysing PFS in SM.⁵ To calculate weighted 95% confidence intervals for PFS and OS the Greenwood's correction was used. The log-rank test was used to establish the statistical significance of differences between survival curves. For multivariate analysis, the covariate adjustment model followed by the Cox proportional hazard regression (with forward stepwise variable selection) model was applied to those variables that showed prognostic impact on PFS and OS in the univariate analysis. For those three variables for which >2 distinct cut-offs had been used previously (i.e. haemoglobin ≤ 100 g/L or ≤ 110 g/L, platelets counts $\leq 100 \times 10^9$ /L or $\leq 150 \times 10^9$ /L, and SAP ≥ 100

IU/L or ≥ 140 IU/L), each cut-off was separately considered in the multivariate analysis. The one with the higher hazard ratio (HR) and lower p-value was chosen for subsequent analyses. Harrell's concordance index (C-index) and 95% confidence intervals (CI) were used to evaluate the ability of the individual prognostic scores to predict outcome. C-index was initially calculated as Somers' D differences and then transformed into the Harrell's C-index (Somers' D+1)/2.¹⁸ C-index values of <0.7 indicated no discrimination, while 0.7–0.8 reflected fair, 0.8–0.9 good and >0.9 C-index values excellent discrimination. The predictive impact on PFS and OS between the different score models was compared in the entire SM patient cohort as well as in the major NonAdvSM and/or AdvSM cohorts, depending for which group each individual prognostic models had been initially proposed; in addition, PFS and OS analyses were repeated in the subgroup of patients, in which all prognostic variables had been simultaneously assessed (n=602). All statistical analyses were performed with the SPSS software version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY).

Results

Discovery and Validation sets. A total of 1275 SM patients were studied including a discovery cohort of 422 SM patients (219 men and 203 women; median age at diagnosis: 48 years [range: 0–79 years]) and a validation cohort of 853 SM patients (476 men and 377 women; median age at diagnosis of 55 years [range: 0–91 years]) followed for a median of 5.0 years (range: 0–15 years) and 4.6 years (range: 0–35 years), respectively. Patients in both cohorts showed overall similar clinical, biological, and molecular features, although a greater frequency of SM-AHN cases (75.3% vs 62%, $p=0.04$) at the expense of lower prevalence of ASM was observed among AdvSM in the validation vs the discovery cohorts (19.4% vs 36%, $p=0.004$) (Appendix p 5). At the moment of closing this study, 34 patients in the discovery cohort (24 NonAdvSM and 10 AdvSM) and 47 patients in the validation cohort (19 NonAdvSM and 29 AdvSM) had progressed to more advanced forms of SM while 28 patients in the discovery cohort (6 NonAdvSM and 22 AdvSM) and 135 in the validation cohort (22 NonAdvSM and 113 AdvSM) had died of SM-related causes with 10-year PFS (90%, 95% CI: 86–94%; and 89%, 95% CI: 85–93%, respectively) and OS (87%, 95% CI: 81–93%; and 72%, 95% CI: 66–78%, respectively).

Progression-free and overall survival estimates of the prognostic scores. As expected, our results confirmed the clinical value of all seven prognostic score models (i.e. the REMA-PFS, REMA-OS, NonAdvSM-IPSM, AdvSM-IPSM, MAPS, CRS, and MARS) ($p < 0.001$) employed to predict for PFS and/or

Table 1. Prognostic impact of individual clinical, laboratory and molecular variables included in recently proposed prognostic scores for SM (n=422): univariate and multivariate analysis for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).

VARIABLES	N	Univariate analysis						Multivariate analysis			
		PFS*			OS			PFS*		OS	
		5y (%)	10y (%)	P	5y (%)	10y (%)	P	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Age (at diagnosis) <60 y	329	96	94	<0.001	98	96	<0.001				
≥60 y	93	84	73		86	72		NS		NS	
Haemoglobin ≤100 (g/L)	22	68	54	<0.001	58	27	<0.001				
>100 (g/L)	400	95	92		97	95		NS		NS	
Haemoglobin ≤110 (g/L)	33	67	47	<0.001	65	37	<0.001			4.7 (1.7-12.7)	0.002
>110 (g/L)	389	96	94		98	96		NS			
N. of platelets ≤100 (x 10 ⁹ /L)	25	61	51	<0.001	54	41	<0.001	3.2 (1.3-7.6)	0.008		NS
>100 (x 10 ⁹ /L)	397	95	93		98	95					
N. of platelets ≤150 (x 10 ⁹ /L)	50	66	61	<0.001	69	53	<0.001			NS	NS
>150 (x 10 ⁹ /L)	372	97	94		99	97		NS			
SAP <100 (IU/L)	295	99	98	<0.001	99	98	<0.001			NS	NS
≥100 (IU/L)	99	75	67		86	74		NS			
SAP <140 (IU/L)	339	98	96	<0.001	99	98	<0.001			7.4 (2.0-26.6)	0.002
≥140 (IU/L)	55	62	53		75	55					
sBT <125 (ng/mL)	343	99	98	<0.001	100	98	<0.001	6.4 (1.8-23.1)	0.004		
≥125 (ng/mL)	75	70	60		80	68					
sβ2M <2.5 (μg/mL)	328	100	98	<0.001	100	100	<0.001	11.8 (3.2-43.3)	<0.001		
≥2.5 (μg/mL)	75	67	53		78	58					
WBC <16 (x10 ⁹ /L)	412	95	92	<0.001	97	93	<0.001			NS	NS
≥16 (x10 ⁹ /L)	10	76	NR		47	NR		NS			
<i>KIT</i> D816V AF <1% in BM	248	99	99	<0.001	98	98	<0.001			NS	NS
≥1% in BM	149	85	76		90	79		NS			
<i>S/A/R/D</i> Wild type	370	96	95	<0.001	99	97	<0.001			6.5 (2.2-18.8)	0.001
Mutated	52	76	59		70	53					
<i>S/A/R/D</i> 0 Mutations	370	95	93	<0.001	98	96	<0.001			NS	NS
1 Mutation	36	76	66		75	48		NS			
≥2 Mutations	16	66	44		35	35					

Abbreviations: AF, allele frequency; BM, bone marrow; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; NR, not reached; NS, not statistically significant; SAP, serum alkaline phosphatase; *S/A/R/D*, *SRSF2/ASXL1/RUNX1/DNMT3A*; sβ2M, serum beta-2-microglobulin; sBT, serum baseline tryptase; WBC, white blood cells; y, years; *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.

OS on both the discovery cohort (Table 3) and the entire set (Appendix pp 14–18) of patients with SM. This was reflected by a significantly lower 5-year and 10-year PFS and OS rates from the low-risk to the high-risk patient groups, as defined in each classification model for both the entire patient cohort and for the NonAdvSM or AdvSM patient groups for which each score had been specifically proposed (Table 3 and Appendix pp 14–18).

Interestingly, similar results were found between the PFS and OS estimates for patients included in the originally reported data sets for each of the score models compared to our cohort, including similar i) 10-year PFS rates for NonAdvSM-IPSM low-risk (96% vs 98%), intermediate-1 (86% vs 84%) and intermediate-2 risk (76% vs 59%) patients; ii) median PFS rates (years) for the REMA-PFS score 0 [not reached (NR) vs NR], score 1 (NR vs NR), score 2 (10 vs 7) and score 3 (2 vs 2); and iii) median OS for the MARS low-risk (NR vs NR), intermediate (4.3 vs 4.1) and high-risk (1.9 vs 2) groups; and iv) the

CRS low-risk (NR vs 11), intermediate (3.9 vs 4.4) and high-risk (2.5 vs 1.9) cases; as well as v) the MAPS low-risk (NR vs NR), intermediate-1 (7 vs 6.3), intermediate-2 (3 vs 3.9) and high-risk (1 vs 3) patient groups; and vi) the REMA-OS score 0 (NR vs NR) and score 1 (7 vs 5) groups of patients.

Construction of a Global Prognostic Score for SM (GPSM). Currently available prognostic scores for SM only assess a fraction of all clinical, laboratory, and molecular variables each that have independent prognostic value in SM. Thus, we first investigated the prognostic impact of all these prognostic variables in a discovery cohort of 422 SM patients in which all variables were available in 85% of cases (Appendix p 5). Overall our results confirmed that when individually examined, all clinical, laboratory, and molecular variables assessed have prognostic impact on both PFS and OS of our SM patients ($p < 0.001$) (univariate analysis in Table 1). Multivariate analyses based on the same variables revealed distinct combinations of independent parameters to predict PFS and for OS (Table 1) that included: i) platelet counts $< 100 \times 10^9/L$ (HR: 3.2; 95% CI: 1.3–7.6; $p = 0.008$), together with sβ2M $\geq 2.5 \mu g/mL$ (HR: 11.8; 95% CI: 3.2–43.3; $p < 0.001$) and sBT $\geq 125 ng/mL$ (HR: 6.4; 95% CI: 1.8–23.1; $p = 0.004$) for PFS; and ii) haemoglobin $\leq 110 g/L$ (HR: 4.7; 95% CI: 1.7–12.7; $p = 0.002$), SAP $\geq 140 IU/L$ (HR: 7.4; 95% CI: 2.0–26.6; $p = 0.002$) and the *S/A/R/D* (*SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* and/or *DNMT3A*) gene mutations (HR: 6.5; 95% CI: 2.2–18.8; $p = 0.001$) for OS (Table 1). Based on the relative weight (i.e. HR) of these variables in multivariate analysis, two separate (global) prognostic score (GPS) models were developed, with the aim to predict PFS (GPSM-PFS) and OS (GPSM-OS) in patients with SM (Table 2). Subsequently, patients were stratified into the low-risk, intermediate-risk, and high-risk groups defined by these GPSM models for PFS (score of 0; 1–3.5; and > 3.5 ; respectively) and OS (score of 0; 1–1.5; and ≥ 2 ; respectively), with the following patient distribution in the discovery cohort: 304 low-risk, 47 intermediate-risk, and 48 high-risk patients with 5 year-PFS rates of 100%, 95% and 58%, respectively, and 10 year-PFS rates of 99%, 83% and 46%, respectively ($p < 0.001$; data was missing in 23 patients); and, ii) 330 low-risk, 43 intermediate-risk and 38 high-risk cases with median 5 year-OS of 100%, 94% and 62%, respectively, and 10 year-OS of 100%, 94% and 30%, respectively ($p < 0.001$; data missing in 11 cases), (Figure 1A).

Table 2. Global prognostic score models (GPSM) for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of SM patients.

VARIABLES	PFS	OS
	Score	Score
Haemoglobin ≤ 110 (g/L)		1
N. of platelets ≤ 100 ($\times 10^9/L$)	1	
SAP ≥ 140 (IU/L)		1.5
sBT ≥ 125 (ng/mL)	2	
s β 2M ≥ 2.5 (μ g/mL)	3.5	
<i>SRSF2</i> , <i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , and/or <i>DNMT3A</i> gene mutations		1
GPSM		
Low-risk	0	0
Intermediate-risk	1–3.5	1–1.5
High-risk	>3.5	≥ 2

Abbreviations: **SAP**, serum alkaline phosphatase; **s β 2M**, serum beta-2-microglobulin; **sBT**, serum baseline tryptase.

Of note, patients in the intermediate risk group for the GPSM-PFS or the GPSM-OS models showed low s β 2M and SAP levels associated with other adverse features. This translated in a closer (but poorer) outcome to that of low-risk cases. This would allow for a simplified categorization of SM patients into just low-risk and high-risk cases with both GPSM-PFS (10-year PFS rates of 98% and 44% for low [score of 0–3.5] and high-risk [score >3.5] cases, respectively) and GPSM-OS (10 year-OS rates of 99% and 28%, for low-risk [score of 0–1.5] and high-risk [score >1.5] patients, respectively). These results were further confirmed in a multicentre-based validation cohort of SM patients with clearly distinct outcomes for low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients as defined by the GPSM scores for PFS and OS: i) GPSM-PFS stratified 480 patients as low-risk, 90 intermediate-risk, and 100 high-risk SM patients with 5 year-PFS rates of 98% vs 93% vs 75%, respectively, and 10 year-PFS of 96% vs 93% vs 54, respectively ($p < 0.001$); and GPSM-OS identified 612 low-risk, 41 intermediate-risk, and 115 high-risk cases, with 5 year-OS of 99%, 61% and 30%, respectively, and 10 year-OS of 97%, 35% and 23, respectively ($p < 0.001$) (Figure 1B).

Comparison between the GPSM score for PFS and OS and other risk stratification models for SM. Comparison among the distinct scoring systems, including the GPSM score proposed herein, showed important differences among the scoring models (Figure 2). Thus, in the entire cohort (discovery + validation set), the proposed GPSM-PFS and the REMA-PFS scores were those showing the highest predictive value for PFS, as reflected by (highest) C-index values of 0.84 and 0.83 (vs 0.77 for the other models tested), respectively (Figure 2A). In turn, the GPSM-OS and AdvSM-IPSM scores were the scoring models that showed best discrimination for OS (C-index of 0.92 and 0.90), together with the MAPS (C-index: 0.88) and MARS (C-index: 0.86) risk stratification models (Figure 2B). When NonAdvSM and AdvSM patients were considered separately, similar results were observed. Thus, the GPSM-PFS and REMA-PFS models were those displaying the

highest C-index values for PFS within NonAdvSM patients (0.85 vs 0.93, respectively) (Figure 2C), while the AdvSM-IPSM score and the GPSM-OS were the best models for OS within AdvSM patients (C-index: 0.73 and 0.72 vs 0.64–0.69 for the other risk stratification models tested) (Figure 2D). Very similar results were observed when the distinct prognostic scores were compared exclusively among those 602 patients (441 NonAdvSM [431 indolent SM and 10 smouldering SM] and 161 AdvSM [38 aggressive SM, 117 SM with associated haematological neoplasm, and 6 mast cell leukaemia]) in whom data was available on all variables selected for the entire set of prognostic models (Figure 2, right panels).

Contribution of the GPSM scores to re-stratification of patient risk-groups defined by other prognostic models.

Interestingly also, both the GPSM-PFS and the GPSM-OS models could effectively discriminate between patients with significantly distinct outcomes among those classified in individual risk categories defined by the NonAdvSM-IPSM, REMA-PFS, AdvSM-IPSM, MARS, CRS, and MAPS scoring models (Appendix pp 19–21). For example, re-stratification of patients assigned to distinct risk groups by the REMA-PFS based on the GPSM-PFS score proved useful to redefine the REMA-PFS low (score 0) ($p < 0.001$), intermediate-1 (score 1) ($p = 0.01$), and intermediate-2 (score 2) ($p = 0.04$), into two and three subgroups of SM patients with significantly different outcomes (Figure 3A); in addition, a small group of patients (6/394) that were included in the REMA-PFS high-risk category but showed a better outcome were also identified based on the GPSM-PFS criteria (Figure 3A). Similarly, the GPSM-OS score allowed more accurate re-stratification of low and intermediate risk groups as defined by the AdvSM-IPSM model into two and three patient subgroups with significantly different OS ($p < 0.001$) for both AdvSM-IPSM low risk (AdvSM-1) and intermediate risk categories (AdvSM-2 and AdvSM-3) (Figure 3B). Similar results were obtained when the GPSM scores were used for re-stratification of patients included in the risk groups as defined by the NonAdvSM-IPSM score for PFS and the REMA-OS, CRS, MARS, and MAPS models (Appendix pp 19–21) for OS.

Discussion

Here, we investigated in a large cohort of 1275 SM patients the prognostic impact of all clinical, laboratory, and molecular variables that have emerged as independent prognostic factors in recently proposed risk stratification models for both PFS and/or OS. As expected, we confirmed the prognostic impact of all individual prognostic factors

Table-3. Prognostic impact on progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) of the WHO classification and the different scores previously proposed for mastocytosis in the discovery cohort of 422 SM patients: univariate analysis.

Prognostic Score	Univariate analysis																				
	N	All SM						NonAdvSM						AdvSM							
		PFS*			OS			PFS*			OS			PFS*			OS				
	5y (%)	10y (%)	P	5y (%)	10y (%)	P	N	5y (%)	10y (%)	P	5y (%)	10y (%)	P	N	5y (%)	10y (%)	P	5y (%)	10y (%)	P	
WHO (Valent P et al. Blood 2016)																					
Indolent SM	368	96	93		99	97															
Smouldering SM	4	100	100		100	100															
SM-AHN	18	45	34	<0.001	60	44	<0.001														
Aggressive SM	31	92	92		70	64															
Mast cell leukaemia	1	100	NR		100	NR															
REMA-PFS (Munoz-Gonzalez JI et al. Blood 2019)																					
Score 0	217	100	100					214	100	100											
Score 1	111	97	91	<0.001				101	99	93	<0.001										
Score 2	46	68	54					24	70	47											
Score 3	10	40	20					8	25	13											
REMA-OS (Munoz-Gonzalez JI et al. Blood 2019)																					
Score 0	398				96	94	<0.001					99	99								
Score 1	24				76	50						89	56	<0.001							
NonAdvSM – IPSM (Sperr W et al. Lancet Haematol 2019)																					
Low risk	249	99	98		99	98		245	99	99		99	99								
Intermediate risk 1	108	89	82	<0.001	95	89	<0.001	91	93	86	<0.001	99	96	0.002							
Intermediate risk 2	38	64	48		75	55		18	49	37		100	75								
AdvSM – IPSM (Sperr W et al. Lancet Haematol 2019)																					
AdvSM-1	342	99	97		100	99								5	100	100			100	100	
AdvSM-2	46	77	71	<0.001	91	69	<0.001							10	89	89	NS		89	59	0.02
AdvSM-3	26	69	51		68	61								23	68	56			62	62	
AdvSM-4	8	55	NR		46	NR								8	55	NR			46	NR	
MAPS (Pardanani A et al. Blood Advances 2018)																					
Low risk	371				99	98															
Intermediate 1	8				100	80	<0.001							4					100	100	NS
Intermediate 2	6				82	NR								5					78	52	
High risk	37				59	45								37					59	45	
CRS (Jawhar M et al. J Clin Oncol 2019)																					
Low risk	375				99	97	<0.001							11					80	67	NS
Intermediate risk	28				76	57								20					65	57	
High risk	16				55	35								16					55	35	
MARS (Jawhar M et al. J Clin Oncol 2019)																					
Low risk	381				99	97	<0.001							12					91	78	
Intermediate risk	17				88	60								13					84	72	0.03
High risk	24				45	31								24					45	31	

Abbreviations: **AdvSM**: advanced systemic mastocytosis; **NonAdvSM**, non-advanced systemic mastocytosis; **NR**, not reached; **NS**, not statistically significant; **SM**, systemic mastocytosis; *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.

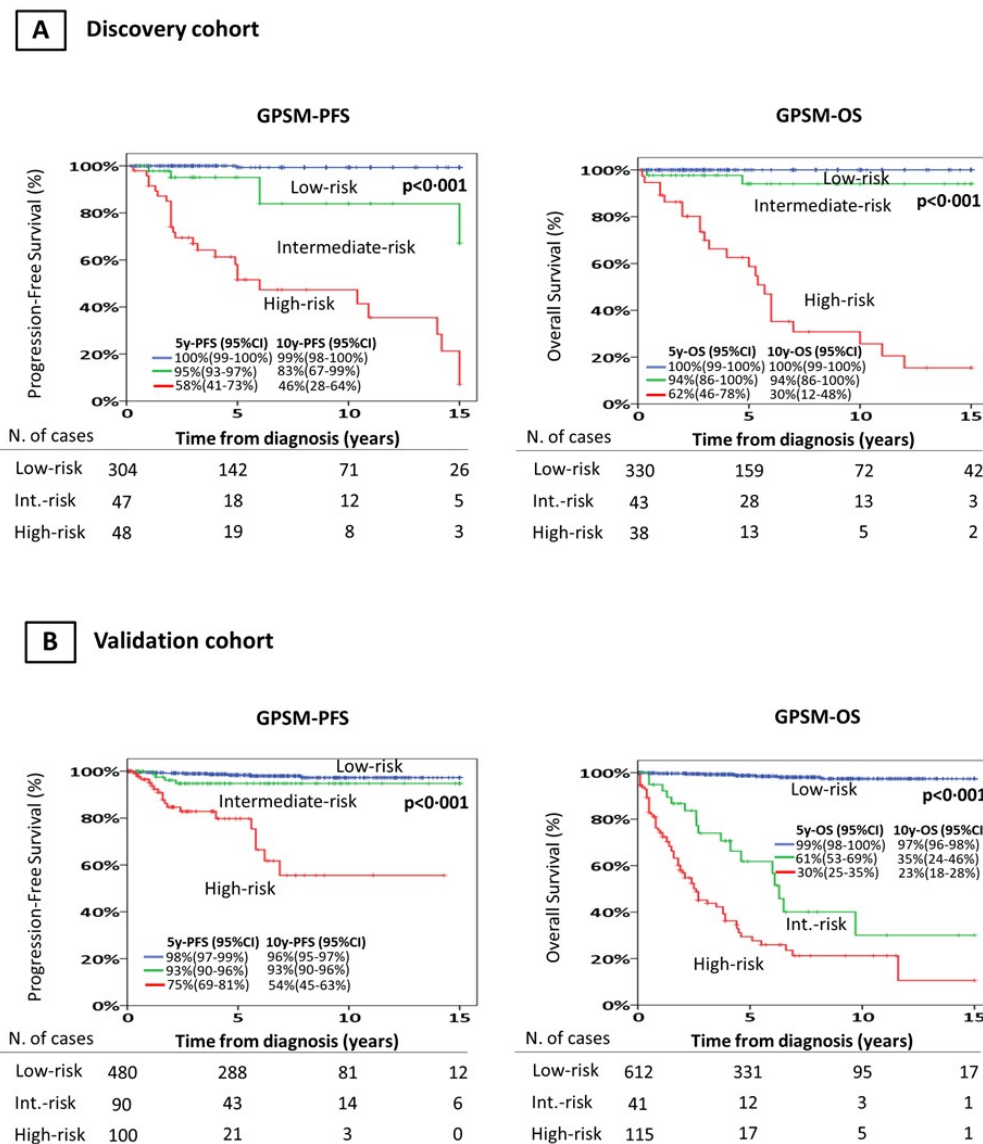
included in these models^{5,6,8,9} with similar median PFS and OS rates in our cohort compared to those reported in the original data sets for each score model.^{5,6,8,9} However, multivariate analysis based on the Spanish REMA cohort of

422 SM patients revealed two unique combinations of independent prognostic factors for improved prediction of PFS and OS.

These included a combination of widely available parameters such as the platelet count, sBT, and sβ2M levels for PFS and a set of other variables (haemoglobin, SAP, and the S/A/R/D mutations) for OS. Several of these parameters have been tested frequently, and some emerged as independent prognostic factors (platelet counts <100×10⁹/L, SAP≥140 UI/L, and presence of mutations within the S/A/R/D genes) in at least two prognostic models. Finally, some risk factors, like sβ2M, had not been applied broadly in many centres and were thus only selected in a single risk model.⁹ Based on all prognostic factors evaluated, we established two separate prognostic scores, one for predicting PFS (GPSM-PFS) and one for predicting OS (GPSM-OS) in patients with SM. In addition, both models proved to be of value for risk stratification in the total cohort of SM patients, as well as in both the NonAdvSM and AdvSM patients groups when examined separately. Overall, our results confirmed that all previously proposed prognostic scoring systems for SM stratified our patients into two to four risk groups with significantly distinct outcomes in terms of PFS and/or OS.

Since complete data on all individual prognostic factors was missing in a substantial fraction of the patients, particularly in the validation cohort, due to the retrospective and multicentric nature of the study, all analysis were reported in the cohort of 602 patients with complete data with identical results. Despite all the above, we observed important differences between them, depending on the prognostic outcome (endpoint) examined (PFS vs OS) and the specific group of SM patients analysed (all patients vs NonAdvSM or AdvSM cases). Thus, further comparison of the GPSM models vs previously reported risk classifications performed in the entire patient cohort showed that all four models evaluated for PFS^{5,9} provided a

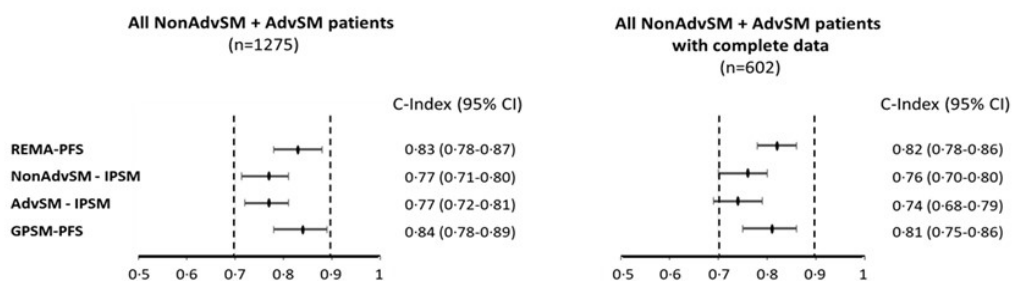
Figure 1. Progression-free survival (PFS*) (panel A) and overall survival (OS) (panel B) Kaplan-Meier estimates of SM patients stratified according to the proposed global prognostic scores for SM (GPSM) in the discovery and validation cohorts. Abbreviations: NR, not reached; *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.



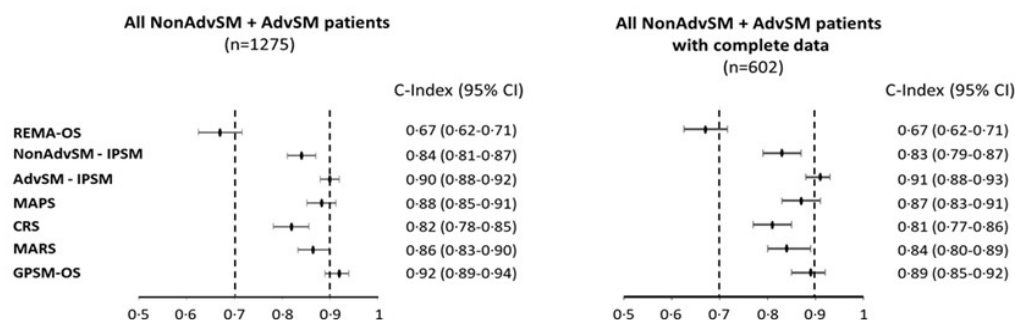
good prediction of PFS, with the best performance being attained by the GPSM-PFS and the REMA-PFS scores. Similarly, all risk score models except the REMA-OS score performed well in evaluating OS. Despite this, the AdvSM-IPSM and the GPSM-OS scores, together with the MAPS and MARS models, were those showing the best performance for OS. Of note, both the GPSM-PFS score and the GPSM-OS model proved useful in discriminating patients with distinct survival rates (PFS and OS, respectively) among individual risk groups, as defined by the other previously proposed risk stratification models. Similar results for the distinct score systems were observed for PFS of NonAdvSM, when the REMA-PFS followed by the GPSM-PFS models emerged as the most robust risk classifications. Of note, these two scores (GPSM-PFS and REMA-PFS) are the only models in which sβ2M was available and selected for patient risk stratification, suggesting this variable provides important information related to the likelihood of SM patients undergoing disease progression, particularly among NonAdvSM.

Figure 2. Comparative analysis of the impact of currently available risk stratification scores vs the proposed GPSM model to predict for progression-free survival (PFS*) and overall survival (OS) in SM. Panels A and B show PFS and OS in the entire patient cohort, respectively; panel C, PFS in the NonAdvSM; and panel D, OS in AdvSM. In each panel (A to D) data is shown for the entire SM cohort (n=1275) of NonAdvSM (n=998) and AdvSM (n=277) patients (left column), and for those patients with available complete data on all prognostic factors (right columns) for all SM groups (n=602) including NonAdvSM (n=441) and AdvSM (n=161). Results are expressed as median C-index values and 95% confidence intervals, where C-index values ≤ 0.7 indicate no discrimination, between >0.7 and ≤ 0.8 fair discrimination, between >0.8 and ≤ 0.9 good and >0.9 an excellent discrimination. *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.

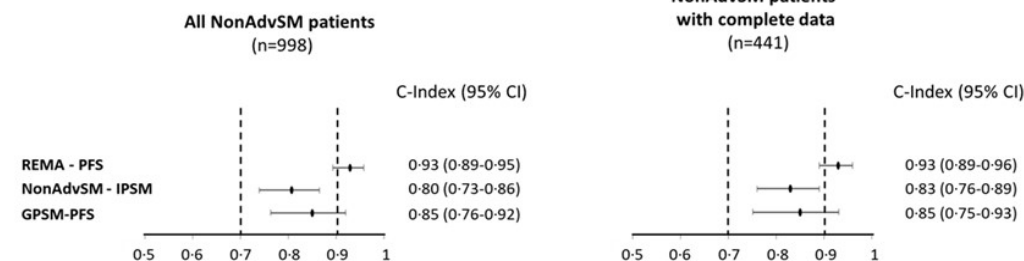
A Entire SM patient cohort (PFS)



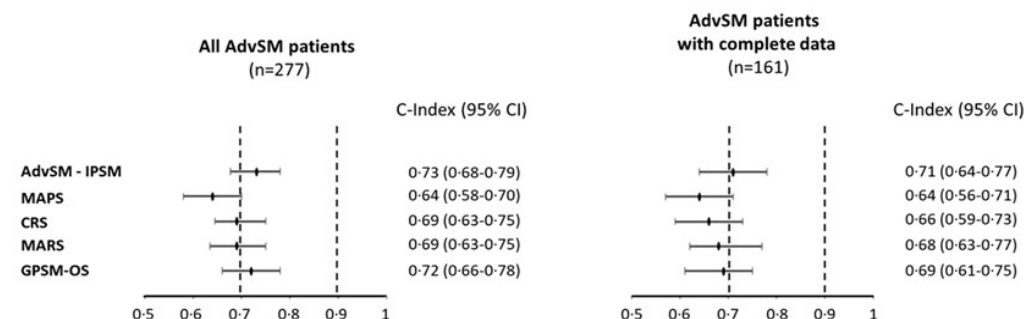
B Entire SM patient cohort (OS)



C NonAdvSM patients (PFS)



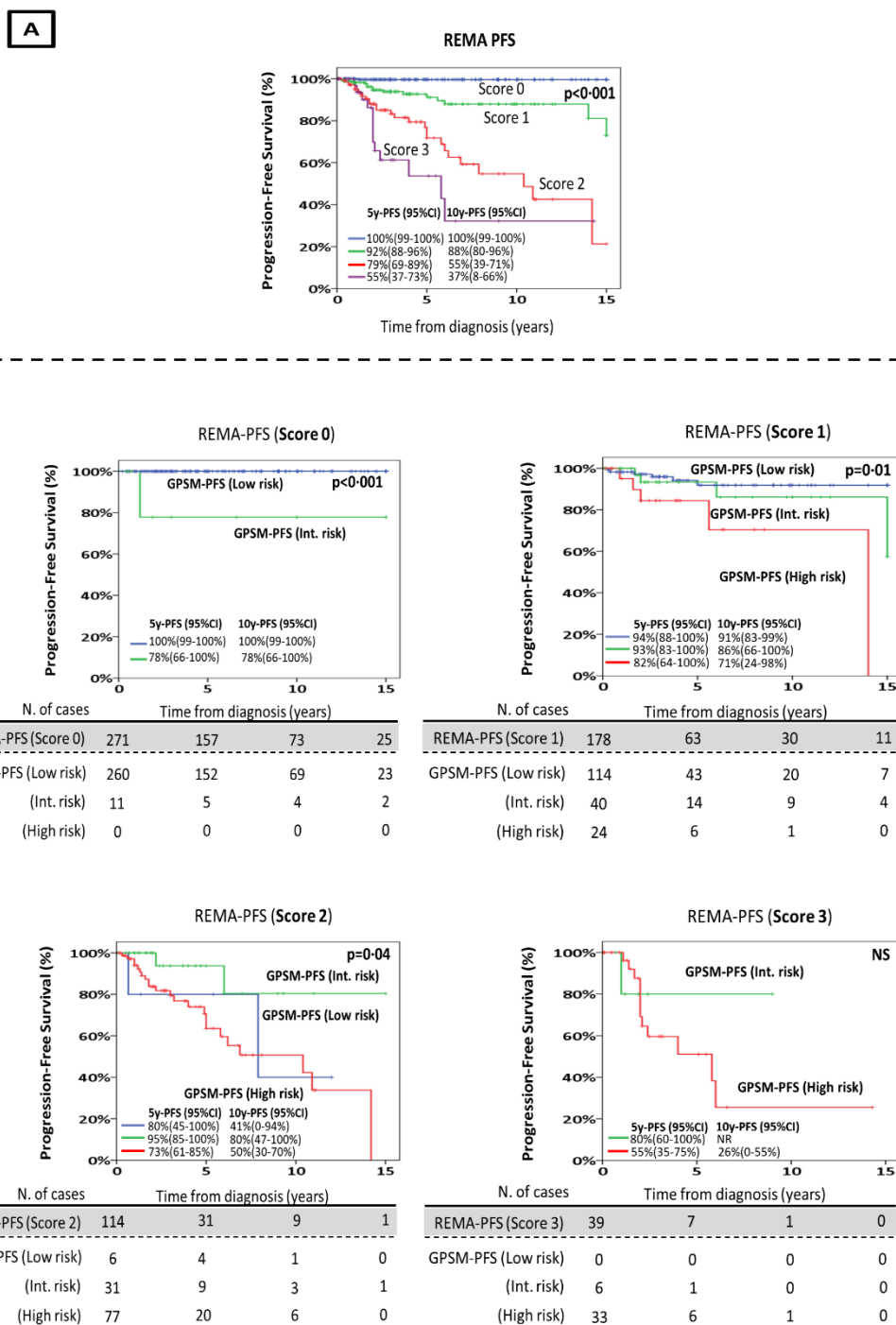
D AdvSM patients (OS)



The better performance for PFS of these scores including sβ2M could be related to the fact that in contrast to other biomarkers such as serum baseline trypsin that closely reflect the tumour burden, sβ2M is a marker of undergoing immune response that also reflects the interaction between the neoplastic mast cells and the tumour microenvironment,¹⁹ leading to an independent predictive value, as also recurrently shown for other haematological malignancies.²⁰ In contrast, none of the scores evaluated was able to adequately predict progression to more advanced forms of SM within AdvSM patients (data not shown). This might be because the classification of SM in NonAdvSM vs AdvSM is already a most potent prognostic score model and because most AdvSM patients already display diagnostic features associated with a large mast cell tumour burden and poorer prognostic PFS features, usually in the absence of progression to even more advanced disease subtypes (overall progression of 39/277 AdvSM cases, 14%) prior to death. In addition, the definition of the onset of another neoplasm within SM with associated haematological neoplasm and mast cell leukaemia remains a challenge due to the clinical heterogeneity of the different associated haematological neoplasms that have been reported in association with SM^{4,21,22} and the lack of progression of the great majority of mast cell leukaemia cases.^{2,23,24}

Similarly, all the risk scores tested could predict OS among AdvSM and NonAdvSM cohorts. Despite this, the AdvSM-IPSM and GPSM-OS scores displayed the highest predictive value among all risk models tested in both the NonAdvSM and AdvSM patient groups. Altogether, the REMA-PFS score followed by the herein proposed GPSM-PFS model are robust for prognostic stratification of NonAdvSM patients already at diagnosis into groups with different probabilities of undergoing disease progression. In contrast, the AdvSM-IPSM and GPSM-OS scores followed by the MAPS and MARS systems were the best predictive models for OS of SM patients, particularly of AdvSM patients. It is open for discussion why a score solely based on the analysis of clinical and laboratory parameters without molecular biomarkers (i.e. AdvSM-IPSM), showed an equivalent and perhaps better performance vs other molecular-based risk stratification models. In part, this might be due to the fact that the variables selected might better reflect the overall genetic and molecular instability of the tumour, and thereby replacing the overall value of the molecular markers. However, it should also be considered that among all risk stratification models proposed so far, the AdvSM-IPSM model was based on the largest cohort of (multicentre) SM patients, which might confer it greater robustness and reproducibility.^{5,6,8,9}

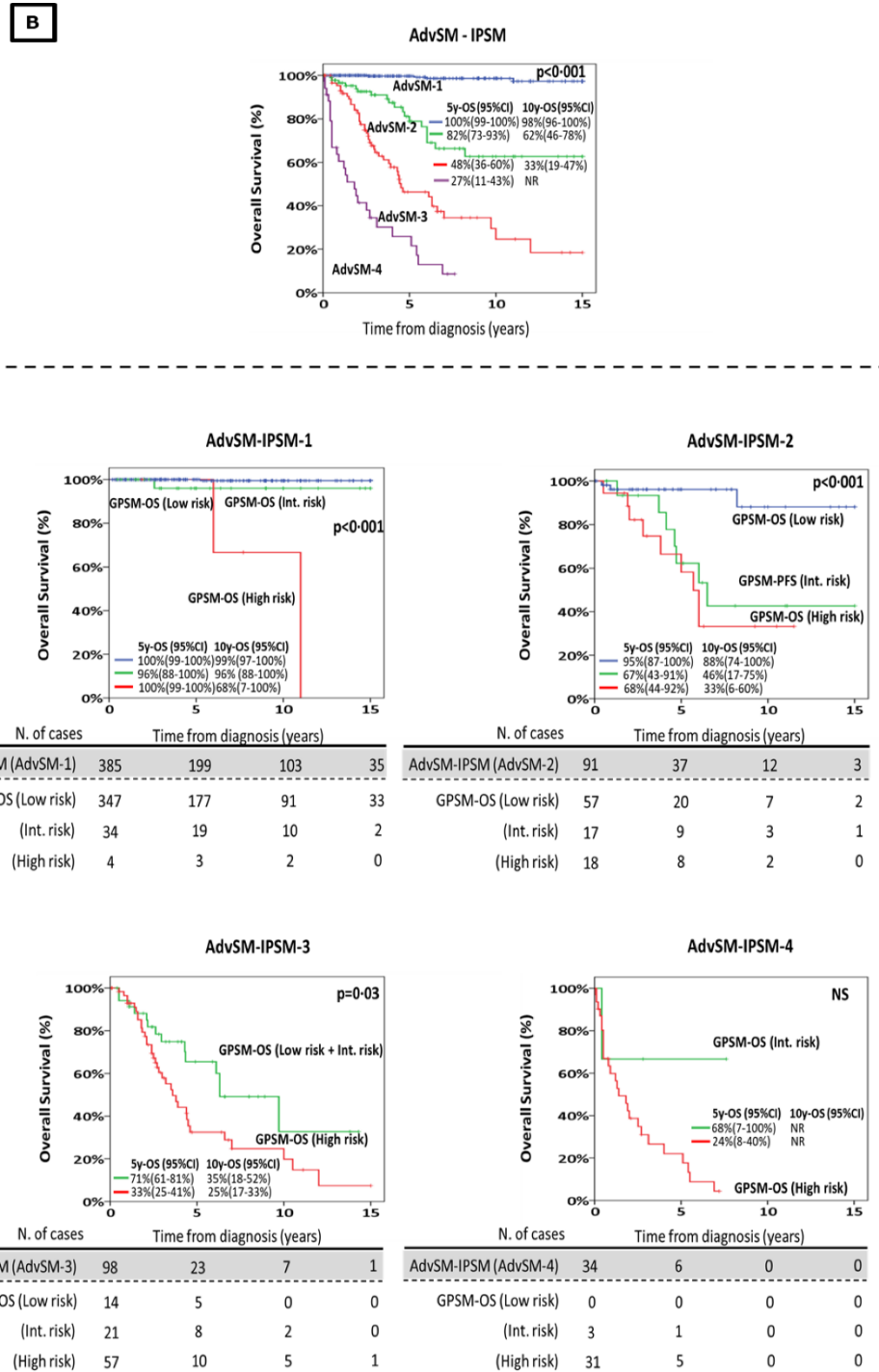
Figure 3. Kaplan-Meier estimates of the prognostic impact of the GPSM-PFS and GPSM-OS scores on progression-free survival (PFS*) and overall survival (OS) of SM patients classified into distinct risk groups by the REMA-PFS⁹ (panel A) and AdvSM-IPSM⁵ (panel B) risk stratification models. In panel A the impact of the GPSM-PFS score on PFS is shown, while in panel B the prognostic value of the GPSM-OS score on OS is displayed. ⁹, Muñoz-Gonzalez JL, *et al.* Blood 2019; ⁵, Sperr W, *et al.* Lancet Haematol 2019. *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.



Taken together, our findings have several important practical implications. First, they indicate in case genetic mutations other than the *KIT* allele burden in bone marrow are not available, they are not strictly required for adequate prognostication. Secondly, they show that even in case the *KIT* allele burden in bone marrow was not assessed at diagnosis, its prognostic impact on PFS (as proposed previously by the REMA-PFS score) may be satisfactorily replaced in the herein proposed GPSM-PFS score by inexpensive and widely available laboratory parameters such as the platelet count in blood combined with sBT levels along with sβ2M, already selected also in the REMA-PFS, in the absence of strict need for bone marrow-associated prognostic markers.

Similarly, risk stratification of SM patients for OS based on the AdvSM-IPSM score has the advantage over the GPSM-OS, MAPS, and MARS scores of relying on a set of easily accessible blood markers such as haemoglobin levels, platelet and WBC counts, and sBT, while it does not require more complex analyses of genetic mutations associated with patient outcome in other SM prognostic models.^{8,9,14,25} However, assessing these genetic mutations has the advantage of being a stable and reliable marker for patient follow-up,²⁶ that are not (usually) altered by current drug treatments or by infectious/allergic processes, unlike other clinical and laboratory parameters such as sBT and sβ2M serum levels.²⁷⁻³⁰

Figure 3. Kaplan-Meier estimates of the prognostic impact of the GPSM-PFS and GPSM-OS scores on progression-free survival (PFS*) and overall survival (OS) of SM patients classified into distinct risk groups by the REMA-PFS⁹ (panel A) and AdvSM-IPSM⁵ (panel B) risk stratification models. In panel A the impact of the GPSM-PFS score on PFS is shown, while in panel B the prognostic value of the GPSM-OS score on OS is displayed. ⁹, Muñoz-Gonzalez JI, *et al.* Blood 2019; ⁵, Sperr W, *et al.* Lancet Haematol 2019. *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.



Of note, even under these circumstances, the AdvSM-IPSM score model outperformed the other scores that are based on a combination of clinical and laboratory parameters and molecular markers, indicating that when not available gene mutations other than diagnostic *KIT* mutations might be replaced by other more widely available laboratory parameters for prognostic purposes in SM patients. Another advantage of the GPSM-PFS and AdvSM-IPSM score models relies on their potential utility for minimally invasive blood-based patient monitoring and (potential) re-stratification during follow-up as they do not require more invasive procedures such as those involved in bone marrow sampling. However, further longitudinal studies in large series of SM patients with long follow-up are required to confirm this hypothesis.

Overall, our findings provide guidance on the performance of currently available prognostic scores that facilitate selecting the most informative risk models for adequate patient stratification, therapeutic decisions and clinical management of SM patients, both in the real world and in future clinical trials.

Contributors

ACGM and AO designed the study. JIMG, IAT, MJA, RZ, CP, MJ, WRS, KS, JS, AH, CC, CFG, LSM, AM, APP, ASG, JD, IT, FO, EMC, IL, LS, MHB, ANG, MJC, GMS, EC, BX, GGR, JG, PB, AR and PV collected data for the study. JIMG, IAT, RZ, JS, MJ, AR, JG, WRS, PV, ACGM and AO performed data analysis and interpretation. JIMG, IAT, RZ, KS, JG, WRS, PV, ACGM and AO wrote the paper. All authors critically reviewed the manuscript, and approved the final version of the document.

Declaration of interest

We declare no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Madrid, Spain) and Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) (PI16/00642, PI19/01166, CIBERONC, CB16/12/00400); Consejería de Educación, Junta de Castilla y León (SA013U16, FEDER) (Valladolid, Spain); Asociación Española de Mastocitosis y enfermedades relacionadas (AEDM 2019); and Fondos de Investigación para Enfermedades Raras del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Madrid, Spain). A.M was supported by CIBERONC (ISCIII, Madrid, Spain). The Spanish National DNA Bank Carlos III was supported by ISCIII and fondos FEDER (PT17/0015/0044). We thank the support of the Biobank from the Hospital Virgen de la Salud (Bio-HVS -B.0000520- Toledo, Spain) for sample processing. J.G. was supported by the Charles and Ann Johnson Foundation and the Stanford Cancer Institute Clinical Innovation Fund. P.V. was supported by the Austrian Science Fund (FWF) grants P32470-B and F4704-B20.

References

- Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood* 2017; **129**: 1420-27.
- Valent P, Akin C, Hartmann K, et al. Advances in the Classification and Treatment of Mastocytosis: Current Status and Outlook toward the Future. *Cancer Res* 2017; **77**: 1261-70.
- Jawhar M, Schwaab J, Meggendorfer M, et al. The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica* 2017; **102**: 1035-43.
- Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma* 2000; **37**: 473-86.
- Sperr WR, Kundi M, Alvarez-Twose I, et al. International prognostic scoring system for mastocytosis (IPSM): a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* 2019; **6**: e638-e49.
- Jawhar M, Schwaab J, Alvarez-Twose I, et al. MARS: Mutation-Adjusted Risk Score for Advanced Systemic Mastocytosis. *J Clin Oncol* 2019; **37**: 2846-56.
- Reiter A, George TI, Gotlib J. New developments in diagnosis, prognostication, and treatment of advanced systemic mastocytosis. *Blood* 2020; **135**: 1365-76.
- Pardanani A, Shah S, Mannelli F, et al. Mayo alliance prognostic system for mastocytosis: clinical and hybrid clinical-molecular models. *Blood Adv* 2018; **2**: 2964-72.
- Munoz-Gonzalez JI, Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, et al. Frequency and prognostic impact of *KIT* and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis. *Blood* 2019; **134**: 456-68.
- Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; **25**: 603-25.
- Horny H.P Metcalfe D.D BJM BBJ, Akin C, Escribano L et al. Mastocytosis, in WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SH CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008. 54-63 p.
- Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**: 514-21.
- Jawhar M, Schwaab J, Hausmann D, et al. Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the *SRSF2/ASXL1/RUNX1* gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia* 2016; **30**: 2342-50.
- Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Additional mutations in *SRSF2*, *ASXL1* and/or *RUNX1* identify a high-risk group of patients with *KIT* D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia* 2016; **30**: 136-43.
- Gotlib J, Klun-Nelemans HC, George TI, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *New England Journal of Medicine* 2016; **374**: 2530-41.
- Hermine O, Hoster E, Walewski J, et al. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *The Lancet* 2016; **388**: 565-75.
- Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Munoz L, et al. Detection of the *KIT* D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol* 2015; **28**: 1138-49.
- Newson R. Parameters behind "Nonparametric" Statistics: Kendall's tau, Somers' D and Median Differences. *Stata Journal* 2002; **2**: 45-64.
- Nomura T, Huang WC, Zhou HE, Jossen S, Mimata H, Chung LW. β 2-Microglobulin-mediated signaling as a target for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; **14**: 343-52.
- Garewal H, Durie BG, Kyle RA, Finley P, Bower B, Serokman R. Serum beta 2-microglobulin in the initial staging and subsequent monitoring of monoclonal plasma cell disorders. *J Clin Oncol* 1984; **2**: 51-7.
- Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol* 2004; **57**: 604-8.
- Wang SA, Hutchinson L, Tang G, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *Am J Hematol* 2013; **88**: 219-24.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; **127**: 2391-405.
- Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Dubreuil P, Chandresis M-O, Hermine O, Damaj G. Mast cell leukemia. *Blood* 2013; **121**: 1285-95.
- Munoz-Gonzalez JI, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv* 2018; **2**: 2814-28.
- Zhang L, Vijg J. Somatic Mutagenesis in Mammals and Its Implications for Human Disease and Aging. *Annual Review of Genetics*

27. Andersohn F, Konzen C, Garbe E. Systematic review: agranulocytosis induced by nonchemotherapy drugs. *Ann Intern Med* 2007; **146**: 657-65.
28. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; **26**: 451-63.
29. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med* 1987; **316**: 1622-6.
30. Jawhar M, Schwaab J, Naumann N, et al. Response and progression on midostaurin in advanced systemic mastocytosis: KIT D816V and other molecular markers. *Blood* 2017; **130**: 137-45.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Supplementary Appendix

Proposed Global Prognostication Score for Systemic Mastocytosis

Javier I Muñoz-González, MSc^{1,2}, Iván Álvarez-Twose, MD^{2,3}, María Jara-Acevedo, PhD^{2,4}, Roberta Zanotti, MD¹⁴, Cecelia Perkins MPH¹¹, Mohamad Jawhar, MD¹², Wolfgang R. Sperr, MD¹⁵, Khalid Shoumariyeh, MD¹³, Juliana Schwaab, MD¹², Georg Greiner, MD¹⁸, Ana Henriques, PhD^{2,3}, Carolina Caldas, MSc^{1,2}, Carlos Fernández-Giménez, MD^{1,2}, Laura Sánchez-Muñoz, MD^{2,3}, Andrea Mayado, PhD^{1,2}, Alba Pérez-Pons, MSc^{1,2}, Annette Schmitt-Graeff, MD¹⁶, Justus Duyster, MD¹³, Ilaria Tanasi, MD¹⁴, Francesco Olivieri, PhD¹⁷, Elvira Mora-Casterá, MD⁵, Irene Luna, MD⁵, Leonor Senent, MD⁵, Maria-Helena Bañas, MD⁶, Amanda Nuñez-García, MD⁷, Manuel Jurado-Chacón, MD⁷, Guillermo Martín-Sánchez, MD⁸, Enrique Colado, MD⁹, Blanca Xicoy, MD¹⁰, Georgina Gener-Ricós, MD¹⁰, Jason Gotlib, MD¹¹, Patrizia Bonadonna, MD¹⁷, Andreas Reiter, MD¹², Peter Valent, MD¹⁵, Andrés C García-Montero, PhD^{1,2,*}, Alberto Orfao, MD^{1,2,*}

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), University of Salamanca, Salamanca, Spain; Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ²Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain; ³Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast) and CIBERONC, Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain; ⁴Sequencing Service (NUCLEUS), CIBERONC, University of Salamanca and Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL) Salamanca, Spain; ⁵Hospital Universitario y Politécnico de la Fe (Valencia, Spain). ⁶Hospital San Pedro Alcantara (Cáceres, Spain). ⁷Hospital Virgen de las Nieves (Granada, Spain). ⁸Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IDIVAL) (Santander, Spain). ⁹Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). ¹⁰Institut Català d'Oncologia-Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Spain), and Josep Carreras Leukemia Research Institute; Universitat Autònoma de Barcelona. ¹¹Division of Hematology, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine / Stanford Cancer Institute, Stanford, California. ¹²Hematology and Oncology, University Hospital Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany. ¹³Department of Medicine I, Medical Center - University of Freiburg, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany, and German Cancer Consortium (DKTK) Partner Site Freiburg and German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany. ¹⁴Section of Hematology, Department of Medicine, Verona University Hospital, Verona, Italy. ¹⁵Department of Internal Medicine I, Division of Hematology and Ludwig Boltzmann Institute for Hematology and Oncology, Medical University of Vienna, Austria. ¹⁶Albert-Ludwigs-University Freiburg, Freiburg, Germany. ¹⁷Allergy Unit, Verona University Hospital, Verona, Italy. ¹⁸Department of Laboratory Medicine and Ludwig Boltzmann Institute for Hematology and Oncology, Medical University of Vienna, Austria. *These two authors have equally contributed to this work and they should both be considered as 'last and corresponding authors'.

Table of Contents

Supplementary Text	3
Supplementary Tables	
Supplementary Table 1	5
Supplementary Table 2	6
Supplementary Table 3	7
Supplementary Figures	
Supplementary Figure 1	14
Supplementary Figure 2	19
References	22

Supplementary Text

Material and Methods

Patients and samples. Patients (n=853) in the validation cohort were diagnosed in the following centers: Stanford University School of Medicine / Stanford Cancer Institute, Stanford, California (n=168 patients); Department of Hematology and Oncology, Medical Center, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany (n=68 patients); Hematology and Oncology, University Hospital Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany (n=90 patients); Section of Hematology, Department of Medicine, Verona University Hospital, Verona, Italy (n=426 patients); Department of Internal Medicine I, Division of Hematology and Hemostaseology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria (n=91 patients); Department of hematology of the Hospital Universitario y Politécnico de la Fe, Valencia, Spain (n=4 patients); Hospital San Pedro Alcantara, Cáceres, Spain (n=3 patients); Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain (n=2 patients); Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain (n=2 patients); and Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain (n=1 patient).

Molecular analyses. For preparation of DNA libraries, the TruSeq Custom Amplicon Low Input kit (Illumina, San Diego, CA) was used, and gDNA from each of the 422 SM patients from the discovery cohort and 81 patients from the validation cohort, for whom genetic data was not locally available, was subsequently sequenced at a 2x150bp read length on a HiSeq 2500 genome sequencer (Illumina) with an average of 645,407 paired end filter reads per sample and a mean coverage of 1660X. Reads were then aligned to the hg19 human reference sequence using the Smith-Waterman algorithm.¹ For variant calling, the Illumina Somatic Variant Caller/Genome Analysis toolkit (GATK) was used; filtering was conducted manually using the following previously described² selection steps: i) only those non-synonymous coding genetic variants identified with $\geq 1\%$ allele coverage were initially selected; ii) the sequences obtained were subsequently compared to the 5,000 exomes,³ the IBS 1,000 Genome Project⁴ and the ExAC⁵ population databases in order to discriminate between somatic variants and single nucleotide polymorphisms (SNPs); iii) from the remaining genetic variants, only those that had not been previously reported in Spanish, African or European (non-Finnish) populations and/or those with a minor allele frequency (MAF) $< 0.1\%$ were further considered; and, iv) potentially deleterious variants as defined both by the SIFT⁶ and PolyPhen⁷ algorithms, were finally selected. All genetic variants identified were subsequently confirmed by Sanger sequencing on gDNA extracted from BM and/or PB from the same patient (kindly provided by the Spanish National DNA Bank Carlos III, University of Salamanca, Salamanca, Spain; <http://www.bancoadn.org>).

For a more stringent approach to pathogenicity, variants were classified as variants of unknown significance (VUS) or pathogenic variants, as described elsewhere.^{8,9} Only those variants classified as pathogenic were considered for the purpose of this study following the standards and guidelines of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.⁹

Supplementary Table S1.- Clinical, biological, and genetic features observed at diagnosis in NonAdvSM (n=998) and AdvSM patients (n=277) included in the Discovery and Validation cohorts.

Clinical and Biological features	NonAdvSM (n=998)			AdvSM (n=277)		
	Discovery (n=372)	Validation (n=626)	P-value	Discovery (n=50)	Validation (n=227)	P-value
WHO diagnostic subtypes						
Indolent SM	368/372 (99%)	607/626 (97%)	NS			
Smouldering SM	4/372 (1%)	19/626 (3%)	NS			
Aggressive SM				18/50 (36%)	44/227 (19.4%)	0.004
SM-AHN				31/50 (62%)	171/227 (75.3%)	0.04
Mast cell leukaemia				1/50 (2%)	12/227 (5.3%)	NS
Age at diagnosis (years)	46 (0–78)	50 (0–83)	<0.001	64 (15–79)	65 (24–91)	NS
≥60y	63/372 (16.9%)	161/626 (25.7%)	0.001	31/50 (62%)	160/227 (70.5%)	NS
Sex (F)	185/372 (49.7%)	301/626 (48.1%)	NS	18/50 (36%)	76/227 (33.5%)	NS
Organomegalies:						
Hepatomegaly	23/359 (6.4%)	36/618 (5.8%)	NS	15/38 (39.5%)	112/212 (52.8%)	NS
Splenomegaly	27/363 (7.4%)	27/619 (4.4%)	NS	33/49 (67.3%)	154/215 (71.6%)	NS
Haemoglobin (g/L)	14.5 (10–19)	14.1 (10–18.2)	NS	10.3 (7–15)	11.1 (5.8–18.1)	NS
≤100	0/372 (0%)	1/624 (0.2%)	NS	23/50 (46%)	78/226 (34.5%)	NS
≤110	5/372 (1.3%)	3/624 (0.5%)	NS	29/50 (58%)	110/226 (48.7%)	NS
N. of platelets (x 10 ⁹ /L)	241 (101–480)	253 (68–511)	0.002	98 (16–749)	140 (5–979)	NS
≤100	0/368 (0%)	1/625 (0.3%)	NS	25/50 (50.0%)	85/227 (37.4%)	NS
≤150	17/372 (4.6%)	12/625 (1.9%)	0.015	34/50 (68%)	113/227 (49.8%)	0.04
SAP (IU/L)	69 (6–290)	70 (22–343)	NS	182 (48–731)	167 (30–1679)	NS
≥100	67/354 (18.3%)	103/613 (16.8%)	NS	33/41 (80.5%)	167/237 (70.5%)	NS
≥140	27/371 (7.3%)	28/613 (4.6%)	NS	29/41 (70.7%)	134/237 (56.5%)	NS
sBT (µg/L)	29 (1–1298)	26.2 (3–819)	NS	180 (5–1469)	170.5 (4–1930)	NS
≥125	44/372 (11.8%)	50/626 (8%)	NS	32/47 (68.1%)	133/221 (60.2%)	NS
≥200	26/372 (7%)	21/626 (3.4%)	0.013	22/47 (46.8%)	88/222 (39.6%)	NS
sβ2M (µg/mL)	1.7 (0.2–6.9)	1.8 (0.17–8.88)	NS	3.5 (1.2–7.8)	3.8 (0.7–22.6)	NS
≥2.5	43/366 (11.7%)	47/519 (9.1%)	NS	33/38 (86.8%)	121/151 (80.1%)	NS
WBC (x10 ⁹ /L)	6.5 (1.2–50.3)	6.5 (2.5–30.1)	NS	6.9 (1.6–23)	8.7 (1.4–111.7)	0.02
≥16	3/372 (0.8%)	2/625 (0.3%)	NS	7/50 (14%)	52/227 (22.9%)	NS
<i>KIT</i> D816V mutation	357/372 (96%)	561/601 (93.3%)	0.02	49/50 (98%)	195/211 (92.4%)	NS
<i>KIT</i> D816V AF ≥1% BM	129/348 (37.1%)	35/90 (38.9%)	NS	35/49 (71.4%)	112/124 (90.3%)	0.001
Pathogenic gene mutations:						
<i>ASXL1</i>	4/372 (1.1%)	2/158 (1.3%)	NS	6/50 (12%)	29/160 (18.1%)	NS
<i>DNMT3A</i>	15/372 (4%)	5/158 (3.1%)	NS	6/50 (12%)	3/160 (1.9%)	0.001
<i>NRAS</i>	0/138 (0%)	1/160 (0.6%)	NS	0/13 (0%)	3/160 (1.8%)	NS
<i>RUNX1</i>	1/372 (0.3%)	0/158 (0%)	NS	14/50 (28%)	24/160 (15%)	0.01
<i>SRSF2</i>	2/372 (0.5%)	5/158 (3.2%)	0.02	21/50 (42%)	58/160 (36.3%)	NS

Results were expressed as number of cases and percentage between brackets or as median values (range). To assess the statistical significance (set at P<0.05) of differences observed among groups, the Mann-Whitney *U* test was used. Abbreviations: AdvSM: advanced systemic mastocytosis; AF, allele frequency; BM, bone marrow; F, female; NonAdvSM, non-advanced systemic mastocytosis; SAP, serum alkaline phosphatase; sBT, serum baseline tryptase; sβ2M, serum beta-2-microglobulin; SM-AHN, systemic mastocytosis with associated haematological neoplasm; WBC, white blood cell counts; *, Mast cell leukaemia patients were excluded from this analysis.

Supplementary Table S2.- Clinical, laboratory, and genetic features proposed in recently reported prognostic scores for systemic mastocytosis.

Prognostic variables	Risk-stratification model						
	REMA-PFS ²	REMA-OS ²	NonAdvSM-IPSM ⁴	AdvSM-IPSM ⁴	MAPS ¹	CRS ³	MARS ³
AdvSM					+		
Age ≥60 years (at diagnosis)			+	+	+	+	+
Haemoglobin ≤100 g/L							+
≤110 g/L				+			+
N. of platelets <100 x10 ⁹ /L				+		+	+
<150 x10 ⁹ /L					+		
sBT ≥125 µg/L				+			
sβ2M ≥2.5 µg/mL	+						
SAP ≥100 IU/L			+				
≥140 IU/L					+	+	
WBC ≥ 16 x10 ⁹ /L				+			
<i>KIT</i> D816V AF >1% BM	+						
Gene mutations other than <i>KIT</i>	+	+			+		+
	(<i>ARD</i>)	(<i>ARD</i>)			(<i>ARN</i>)		(<i>SAR</i>)

Abbreviations: AdvSM, advanced systemic mastocytosis; AF, allele frequency; *ARD*, *ASXL1/RUNX1/DNMT3A*; *ARN*, *ASXL1/RUNX1/NRAS*; BM, bone marrow; IPSM, international prognostic scoring system for mastocytosis; CRS, clinical risk score for advanced systemic mastocytosis; MARS, mutation adjusted risk score for advanced systemic mastocytosis; MAPS, mutation adjusted prognostic score; NonAdvSM, non-advanced systemic mastocytosis; OS, overall survival; PFS, progression free survival, REMA, Red Española de Mastocytosis scores for indolent systemic mastocytosis; SAP, serum alkaline phosphatase; sBT, serum baseline tryptase; sβ2M, serum beta-2-microglobulin; *SAR*, *SRSF2/ASXL1/RUNX1*; WBC, white blood cell counts; +, variable included in the specified prognostic score; ¹, Pardanani A, et al. Blood Adv 2018; ², Muñoz-Gonzalez JI, et al. Blood 2019; ³, Jawhar M, et al. J Clin Oncol 2019 ; ⁴, Sperr W, et al. Lancet Haematol 2019.

Supplementary Table S3.- AdvSM patients: cytoreductive treatment received during clinical follow-up.

ID#	Diagnosis at last follow-up	Cladribine	Midostaurin	Other
Discovery cohort				
#5	ASM	Yes	No	-
#7	ASM	No	No	-
#8	ASM	No	No	-
#9	ASM	Yes	No	-
#10	ASM	Yes	No	-
#11	ASM	Yes	No	-
#12	ASM	Yes	No	-
#13	ASM	No	No	-
#14	ASM	Yes	No	-
#15	ASM	No	No	-
#16	SM-AHN (CMML)	No	No	Hydroxyurea
#17	SM-AHN (AML)	No	No	Idarubicin + Cytarabine
#18	SM-AHN (MDS)	No	No	Hydroxyurea
#19	SM-AHN (AML)	No	No	-
#20	SM-AHN (MDS)	No	No	IFN-2 α + Hydroxyurea
#25	ASM	No	No	-
#26	ASM	No	No	Hydroxyurea
#28	SM-AHN (MM)	-	-	-
#51	SM-AHN (AML)	Yes	No	Idarubicin + Cytarabine
#97	SM-AHN (LPD)	Yes	No	-
#99	SM-AHN (MM)	No	No	-
#114	SM-AHN (AML)	No	No	-
#121	SM-AHN (AML)	No	No	-
#152	ASM	No	No	Hydroxyurea
#157	SM-AHN (AML)	No	No	Idarubicin + Cytarabine + Mitoxantrone
#160	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#161	SM-AHN (MDS)	No	No	Antithymocyte Globulin + Ciclosporin
#259	MCL	Yes	Yes	-
#261	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#262	ASM	No	Yes	-
#263	SM-AHN (CLL)	No	No	-
#265	MCL	No	No	-
#266	SM-AHN (MPN)	No	No	-
#267	SM-AHN (AML)	No	No	-
#268	SM-AHN (MDS)	Yes	No	-
#269	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#270	MCL	-	-	-
#271	SM-AHN (AML)	No	No	-
#272	SM-AHN (PLB)	No	No	-
#275	ASM	No	No	-
#278	SM-AHN (MDS)	No	No	-

#282	ASM	Yes	No	-
#286	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#300	SM-AHN	No	No	-
#304	ASM	No	No	-
#305	SM-AHN (AML)	Yes	Yes	-
#306	ASM	Yes	No	-
#311	ASM	Yes	No	-
#312	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#315	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#323	SM-AHN	No	No	-
#329	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#336	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#337	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#338	SM-AHN (AML)	No	No	-
#343	ASM	No	No	-
#350	ASM	Yes	No	-
#353	ASM	No	Yes	-
#448	ISM-AHN (PV)	No	No	-
#449	ISM-AHN (NHL-B-MZL)	-	-	-
#450	ISM-AHN (MDS)	-	-	-
#451	SM-AHN (MDS)	-	-	-
#452	SM-AHN (MDS)	-	-	-
#453	SM-AHN (MDS)	-	-	-
#456	SM-AHN (NHL-B)	-	-	-
#460	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#461	SM-AHN (MDS)	-	-	-
Validation cohort				
#454	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#467	SM-AHN (CEL)	No	Yes	-
#469	SM-AHN (MPN)	No	Yes	-
#470	MCL	No	Yes	-
#471	ASM	No	Yes	-
#472	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#475	MCL	Yes	Yes	-
#481	ASM	No	Yes	-
#483	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#486	SM-AHN (CEL)	Yes	No	-
#487	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#488	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#489	ASM	Yes	Yes	-
#490	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#491	ASM	Yes	Yes	-
#492	MCL	Yes	Yes	-
#493	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#494	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#495	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#496	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-

#497	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#502	ASM	No	No	-
#511	ASM	No	No	-
#512	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#514	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#515	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#516	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#518	ASM	No	No	-
#519	ASM	No	No	-
#521	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#522	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#523	SM-AHN (MPN)	No	No	-
#524	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#529	ASM	No	No	-
#531	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#533	ASM	Yes	Yes	-
#534	MCL	Yes	No	-
#537	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#545	ASM	No	Yes	-
#546	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#547	SM-AHN (MM)	No	No	-
#550	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#554	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#555	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#556	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#559	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#560	SM-AHN (MPN)	No	Yes	-
#561	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#563	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#564	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#567	ASM	No	No	-
#569	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#572	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#574	ASM	No	No	-
#584	ASM	No	No	-
#586	MCL	Yes	No	-
#590	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#595	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#596	SM-AHN (MM)	No	No	-
#597	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#600	SM-AHN (lymphoma)	No	No	-
#606	SM-AHN (ET)	No	Yes	-
#607	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#610	SM-AHN (PV)	No	No	-
#611	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#613	SM-AHN (ET)	No	Yes	-
#615	SM-AHN (CEL)	No	Yes	-

#618	MCL	No	Yes	-
#619	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#622	SM-AHN (PV)	No	No	-
#623	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#624	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#627	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#631	SM-AHN (CML)	No	No	-
#636	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#640	ASM	No	No	-
#641	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#642	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#643	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#644	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#645	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#646	SM-AHN (CEL)	Yes	Yes	-
#647	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#648	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#650	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#653	ASM	No	Yes	-
#654	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#655	ASM	No	Yes	-
#656	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#657	SM-AHN (MDS)	Yes	No	-
#658	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#659	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#660	MCL	Yes	Yes	-
#661	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#662	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#663	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#664	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#665	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#666	MCL	No	Yes	-
#667	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#668	ASM	No	No	-
#669	MCL	No	Yes	-
#670	SM-AHN (CEL)	No	Yes	-
#671	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#672	ASM	No	Yes	-
#673	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#674	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#675	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#676	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#677	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#678	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#679	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#680	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#681	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-

#682	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#683	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#684	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#685	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#686	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#687	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#688	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#689	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#690	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#691	ASM	No	No	-
#692	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#693	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#694	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#695	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#696	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#697	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#698	MCL	No	Yes	-
#699	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#700	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#701	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#702	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#703	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#704	MCL	No	Yes	-
#705	ASM	No	Yes	-
#706	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#708	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#709	SM-AHN (MDS)	Yes	No	-
#710	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#711	MCL	No	No	-
#712	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#714	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#715	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#716	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#717	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#718	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#719	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#720	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#721	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#722	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#723	ASM	No	Yes	-
#724	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#725	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#727	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#728	SM-AHN (MDS)	No	Yes	-
#729	SM-AHN (CEL)	No	No	-
#730	SM-AHN (CEL)	No	Yes	-
#731	SM-AHN (MDS)	No	No	-

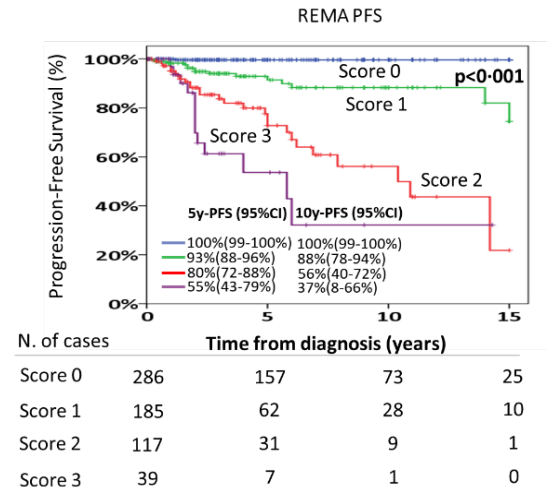
#733	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#734	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#736	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#737	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#738	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#756	SM-AHN (NHL)	No	No	-
#763	MCL	No	Yes	-
#769	SM-AHN (CML)	No	No	Imatinib
#777	SM-AHN (RARS-T)	No	No	-
#799	SM-AHN (RARS-T)	No	No	Hydroxyurea
#812	SM-AHN (AML)	No	No	Hydroxyurea
#852	SM-AHN (MPN)	No	No	Polychemotherapy
#855	SM-AHN (PMF)	No	No	-
#868	SM-AHN (CMML)	Yes	No	Azacitidine
#870	SM-AHN (AML)	No	No	Polychemotherapy
#897	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#907	SM-AHN (RARS-T)	No	No	-
#917	ASM	No	Yes	-
#926	SM-AHN (MDS)	Yes	Yes	-
#951	SM-AHN (MDS)	No	No	Azacitidine
#957	ASM	No	No	-
#964	SM-AHN (MM)	No	No	Bortezomib
#970	ASM	No	No	-
#971	MCL	Yes	Yes	-
#1015	ASM	No	No	-
#1082	ASM	No	No	-
#1090	ASM	No	No	Hydroxyurea
#1100	SM-AHN (PMF)	No	No	-
#1114	SM-AHN (NHL)	No	No	-
#1136	SM-AHN (NHL)	No	No	-
#1141	SM-AHN (NHL)	No	No	Polychemotherapy
#1144	SM-AHN (ET)	No	No	-
#1146	SM-AHN (MPN)	No	No	-
#1147	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#1148	MCL	No	No	Dasatinib + Hydroxyurea
#1150	SM-AHN (ET)	No	No	-
#1151	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#1155	SM-AHN (MDS)	No	No	-
#1156	ASM	No	Yes	-
#1158	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#1159	SM-AHN (NHL)	No	No	-
#1160	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#1161	SM-AHN (CML)	No	Yes	-
#1163	SM-AHN (PV)	No	No	-
#1164	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#1178	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#1180	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-

#1185	SM-AHN (Myelofibrosis)	No	No	-
#1186	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#1193	SM-AHN (Smouldering Plasmocytoma)	No	No	-
#1194	ASM	No	No	-
#1195	ASM	Yes	No	-
#1196	SM-AHN (AML)	No	No	-
#1202	ASM	No	No	-
#1204	ASM	No	No	-
#1205	SM-AHN (Primary Myelofibrosis)	Yes	Yes	-
#1215	SM-AHN (MDS/MPN)	No	No	-
#1232	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#1240	SM-AHN (ET)	No	No	-
#1243	ASM	No	Yes	-
#1248	MCL	No	No	-
#1255	SM-AHN (NHL)	No	No	-
#1266	MCL	Yes	No	-
#1267	ASM	No	No	-
#1273	MCL	Yes	Yes	-
#1274	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#1278	SM-AHN (-)	No	No	-
#1279	SM-AHN (IMF)	No	No	-
#1284	SM-AHN (AML)	No	No	-
#1294	ASM	Yes	Yes	-
#1308	SM-AHN (CMML)	Yes	No	-
#1313	SM-AHN (CMML)	Yes	Yes	-
#1314	ASM	Yes	No	-
#1317	ASM	Yes	No	-
#1321	ASM	No	No	-
#1325	SM-AHN (CMML)	No	No	-
#1327	MCL	No	No	-
#1337	SM-AHN (MPN)	No	No	Hydroxyurea
#1338	SM-AHN (MDS)	No	Yes	Hydroxyurea
#1340	SM-AHN (CMML)	No	Yes	-
#1341	SM-AHN (MPN)	No	No	Hydroxyurea
#1345	SM-AHN (LLC)	No	No	Ipartasertib

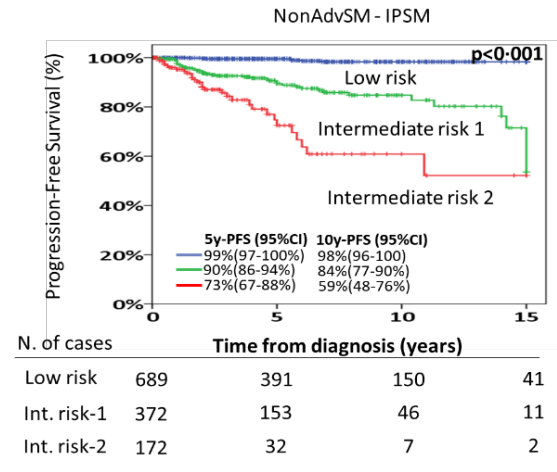
Abbreviations: AML, acute myeloid leukaemia; ASM, aggressive systemic mastocytosis; CEL, chronic eosinophilic leukaemia; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CML, chronic myeloid leukaemia; CMML, chronic myelomonocytic leukaemia; ET, essential thrombocytopenia; ID, patient code number used to identify patients analysed in this study; LPD, lymphoproliferative disorders; MCL, mast cell leukaemia; MDS, myelodysplastic syndrome; MM, multiple myeloma; MPN, myeloproliferative neoplasms; -, data on specific therapy not available; NHL, non-Hodgkin lymphoma; NHL-B-MZL, marginal zone B cell non-Hodgkin lymphoma; PLB, primary lymphoma of bone; PMF, Primary myelofibrosis; PV, polycythemia vera; RARS-T, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis; SM-AHN, systemic mastocytosis with an associated haematological neoplasm.

Supplementary Figure 1. Kaplan Meier estimates for progression-free survival* (panel A) and overall survival (panel B) of SM patients (n=1275) grouped according to the WHO¹⁰⁻¹² classification, the REMA-PFS,¹³ the REMA-OS,¹³ IPSM for NonAdvSM,¹⁴ IPSM for AdvSM,¹⁴ MAPS,¹⁵ CRS¹⁶ and MARS¹⁶ prognostic scores and progression-free survival of NonAdvSM (panel C) and overall survival of AdvSM (panel D).

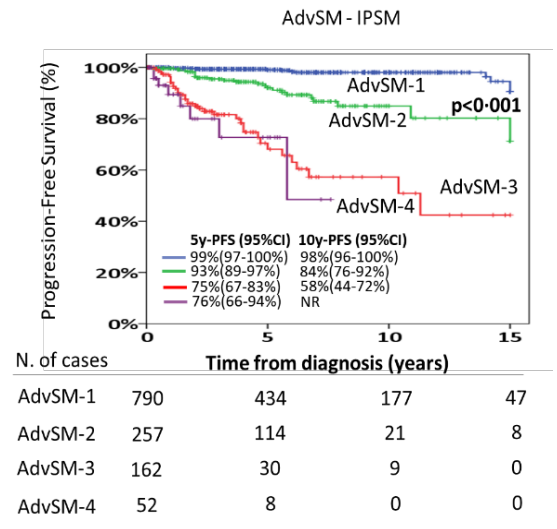
A Progression-Free Survival



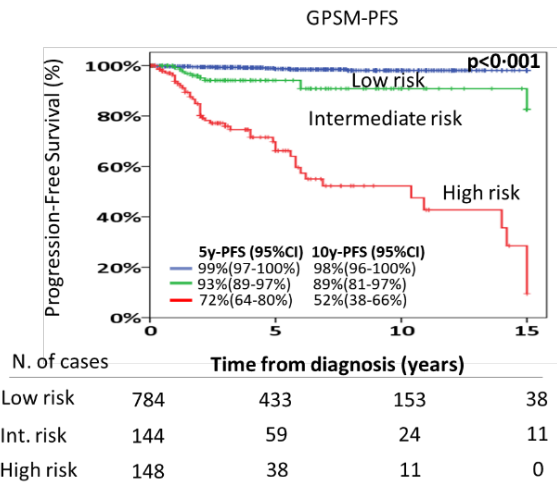
N. of cases	Time from diagnosis (years)
Score 0	286 157 73 25
Score 1	185 62 28 10
Score 2	117 31 9 1
Score 3	39 7 1 0



N. of cases	Time from diagnosis (years)
Low risk	689 391 150 41
Int. risk-1	372 153 46 11
Int. risk-2	172 32 7 2



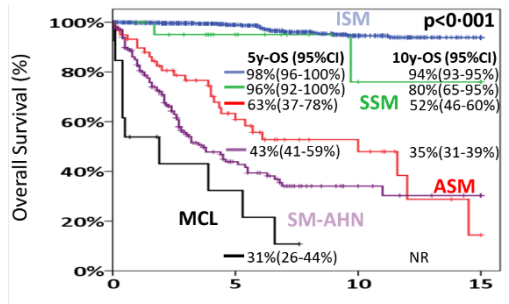
N. of cases	Time from diagnosis (years)
AdvSM-1	790 434 177 47
AdvSM-2	257 114 21 8
AdvSM-3	162 30 9 0
AdvSM-4	52 8 0 0



N. of cases	Time from diagnosis (years)
Low risk	784 433 153 38
Int. risk	144 59 24 11
High risk	148 38 11 0

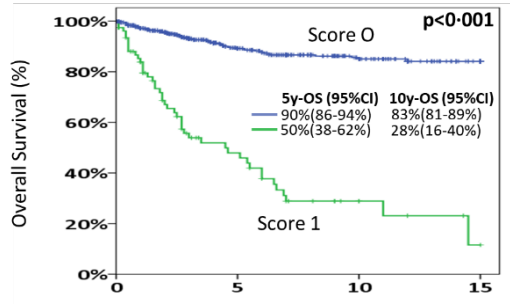
B Overall Survival

WHO



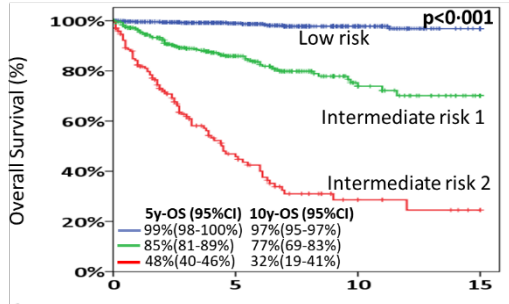
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
ISM	976	536	202	63
SSM	22	13	5	3
ASM	62	27	11	1
SM-AHN	202	39	11	5
MCL	13	3	0	0

REMA OS



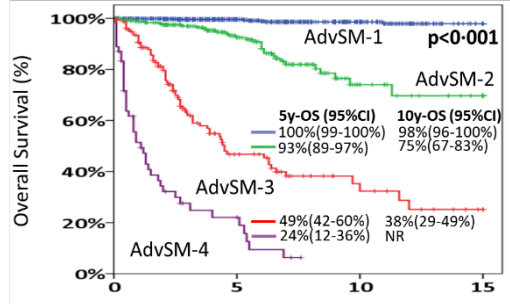
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
Score 0	657	305	146	59
Score 1	78	26	8	1

NonAdvSM - IPSM



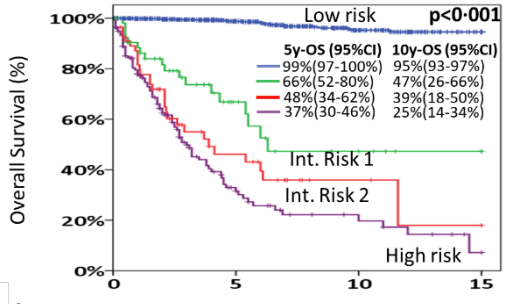
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
Low risk	689	391	157	52
Int. risk-1	372	164	54	15
Int. risk-2	172	43	10	2

AdvSM - IPSM



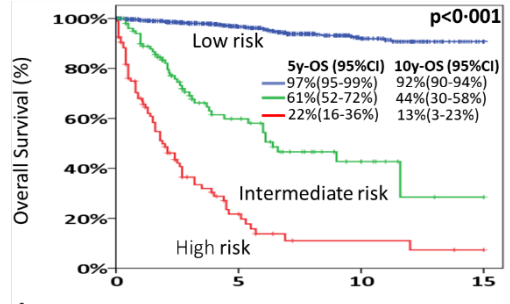
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
AdvSM-1	790	440	188	61
AdvSM-2	257	124	23	9
AdvSM-3	162	38	12	1
AdvSM-4	54	8	0	0

MAPS



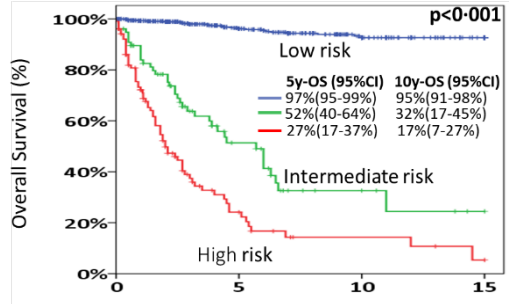
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
Low risk	992	537	201	66
Int. 1	54	15	7	2
Int. 2	56	15	3	1
High risk	139	24	8	0

CRS



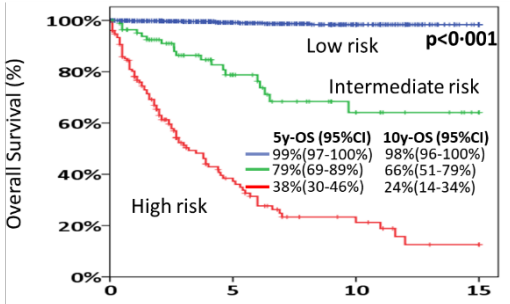
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
Low risk	1058	559	211	69
Int. risk	104	36	9	1
High risk	96	11	2	0

MARS



	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
Low risk	585	300	146	61
Int. risk	77	22	6	1
High risk	104	14	3	0

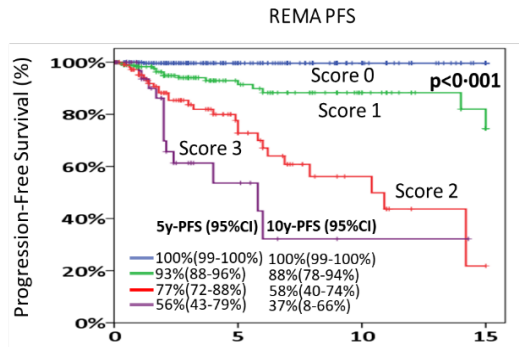
GPSM-OS



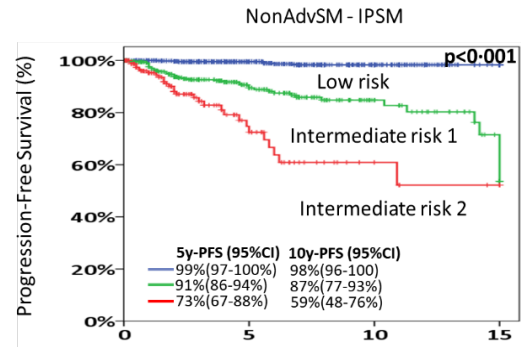
	Time from diagnosis (years)			
N. of cases	0	5	10	15
Low risk	942	496	169	59
Int. risk	84	36	15	4
High risk	153	32	10	3

C

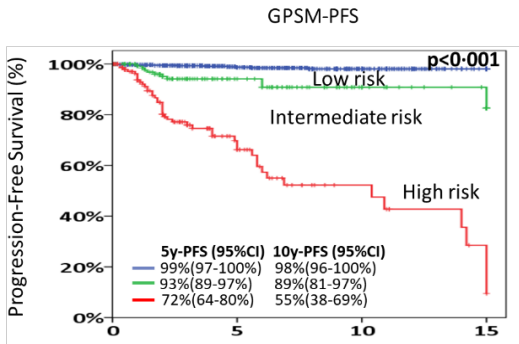
Progression-Free Survival (NonAdvSM)



N. of cases	Time from diagnosis (years)			
Score 0	286	157	73	25
Score 1	185	62	28	10
Score 2	117	31	9	1
Score 3	39	7	1	0



N. of cases	Time from diagnosis (years)			
Low risk	689	391	150	41
Int. risk-1	372	153	46	11
Int. risk-2	172	32	7	2

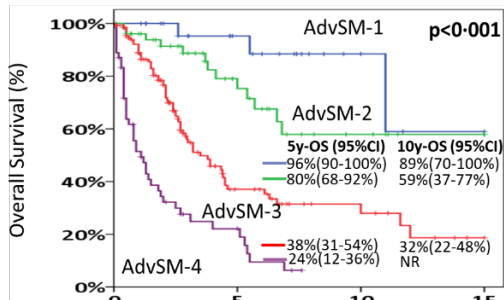


N. of cases	Time from diagnosis (years)			
Low risk	784	433	153	38
Int. risk	144	59	24	11
High risk	148	38	11	0

D

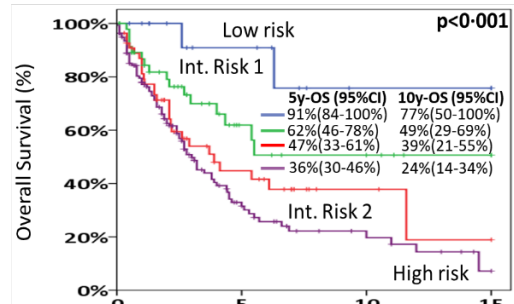
Overall Survival (AdvSM)

AdvSM - IPSM



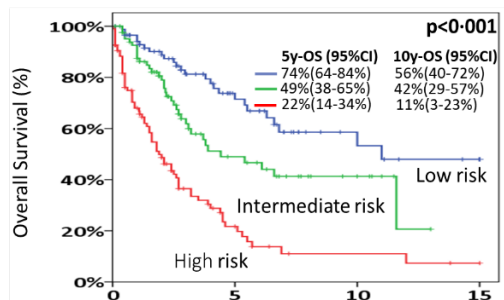
N. of cases	Time from diagnosis (years)			
	0	5	10	15
AdvSM-1	26	14	4	1
AdvSM-2	52	21	8	4
AdvSM-3	135	23	9	1
AdvSM-4	54	8	0	0

MAPS



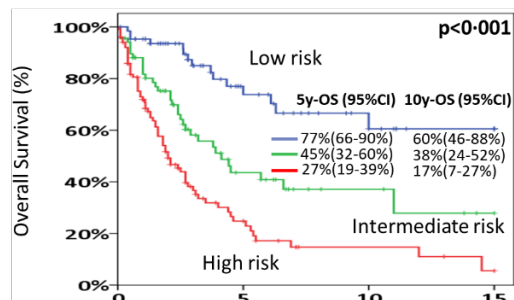
N. of cases	Time from diagnosis (years)			
	0	5	10	15
Low risk	16	8	2	2
Int. 1	48	11	7	2
Int. 2	55	14	3	1
High risk	139	24	8	1

CRS



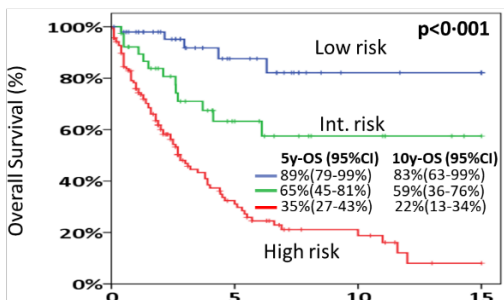
N. of cases	Time from diagnosis (years)			
	0	5	10	15
Low risk	87	32	11	5
Int. risk	84	21	7	0
High risk	96	12	3	1

MARS



N. of cases	Time from diagnosis (years)			
	0	5	10	15
Low risk	65	24	11	4
Int. risk	68	16	5	1
High risk	103	14	4	1

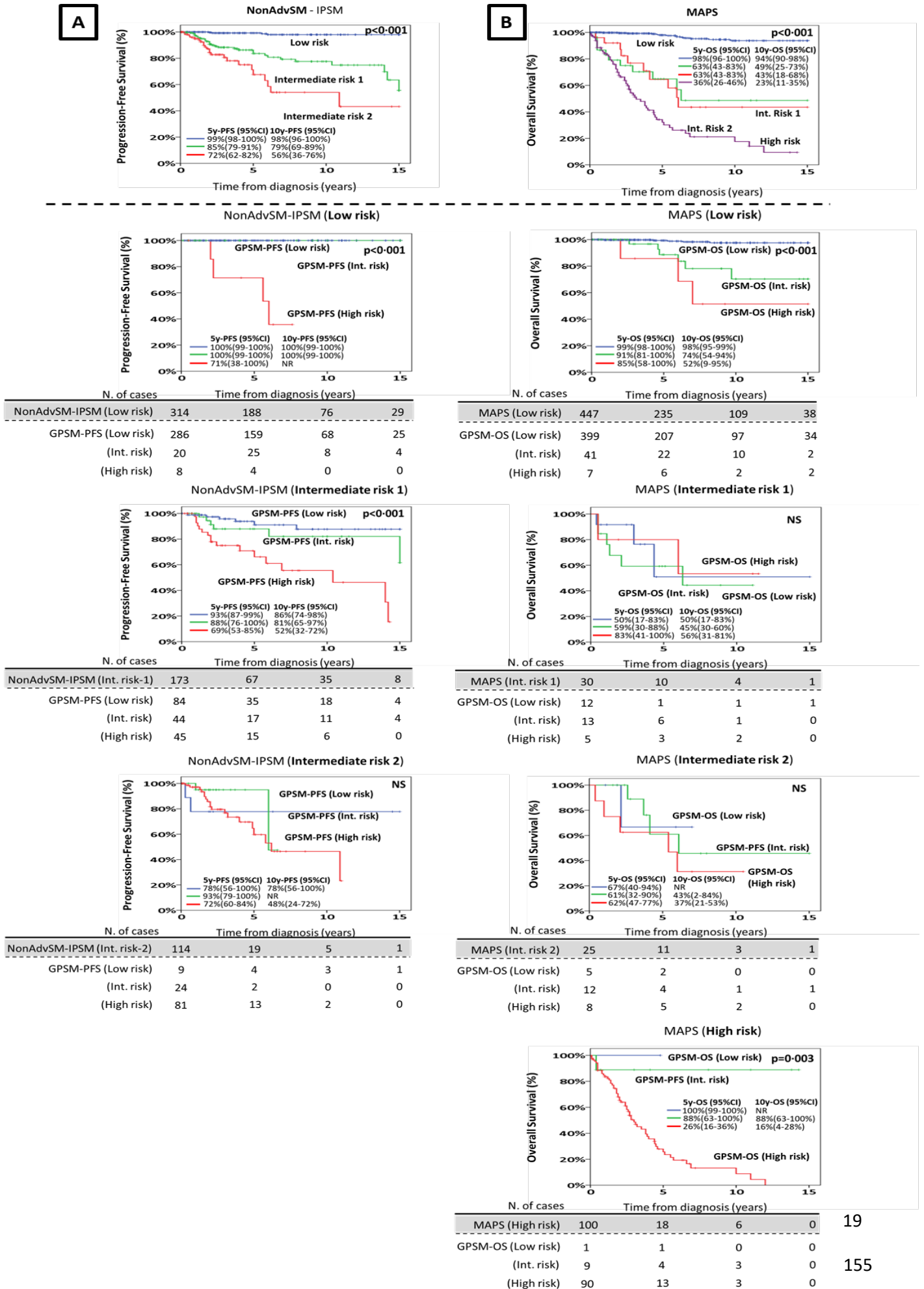
GPSM-OS



N. of cases	Time from diagnosis (years)			
	0	5	10	15
Low risk	50	22	6	4
Int. risk	39	18	6	1
High risk	140	26	10	1

In panels A and B, PFS and OS curves are shown for all risk classification models in the whole patient cohort, while in panels C and D PFS and OS are specifically shown for the patient group and outcome measure each score was specifically designed and validated for (REMA-PFS,¹³ NonAdvSM-IPSM¹⁴ and GPSM-PFS for PFS of NonAdvSM; and CRS,¹⁶ MARS,¹⁶ AdvSM-IPSM¹⁴, and GPSM-OS for OS of AdvSM). Abbreviations: AdvSM, advanced systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; IPSM, international prognostic score for mastocytosis; CRS, clinical risk score; ISM, indolent systemic mastocytosis; MCL, mast cell leukaemia; MAPS, mutation adjusted prognostic score; MARS, mutation adjusted risk score for advanced systemic mastocytosis; NonAdvSM, non-advanced systemic mastocytosis; NR, not reached; REMA, Spanish Network on Mastocytosis score for indolent systemic mastocytosis; SM-AHN, systemic mastocytosis with associated haematological neoplasm; SSM, smouldering systemic mastocytosis.¹⁵, Pardanani A, et al. *Blood Adv* 2018; ¹³, Muñoz-Gonzalez JI, et al. *Blood* 2019; ¹⁶, Jawhar M, et al. *J Clin Oncol* 2019 ; ¹⁴, Sperr W, et al. *Lancet Haematol* 2019; ¹⁰⁻¹², Valent P, et al. *Blood* 2017; *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.

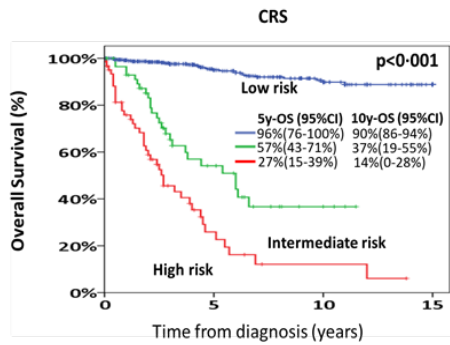
Supplementary Figure 2. Kaplan Meier estimates of the impact of the GPSM-PFS and GPSM-OS scores on progression-free survival (PFS*) and overall survival (OS) of SM patients classified into distinct risk groups by the NonAdvSM-IPSM¹⁴ (panel A), MAPS¹⁵ (panel B), CRS¹⁶ (panel C), MARS¹⁶ (panel D), and REMA-OS¹³ (panel E) risk stratification models



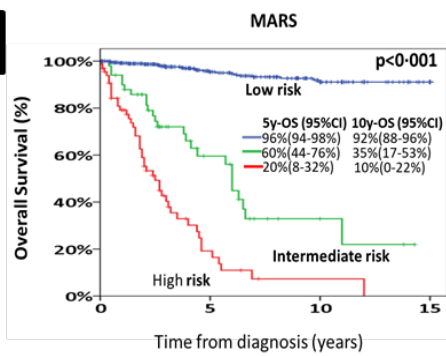
19

155

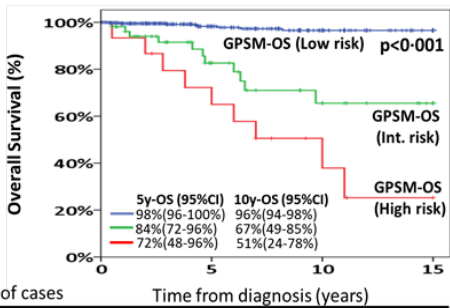
C



D

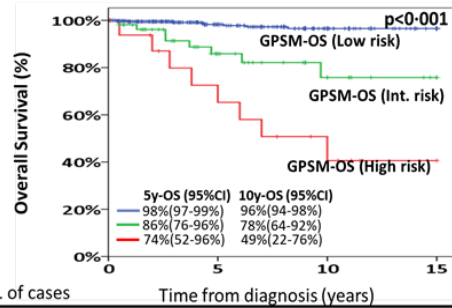


CRS (Low risk)



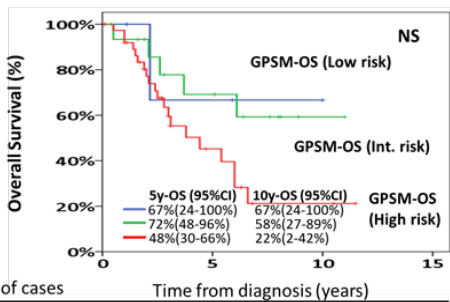
N. of cases	Time from diagnosis (years)	0	5	10	15
CRS (Low risk)	481	246	115	40	
GPSM-OS (Low risk)	413	208	97	35	
(Int. risk)	53	27	13	3	
(High risk)	15	11	5	2	

MARS (Low risk)



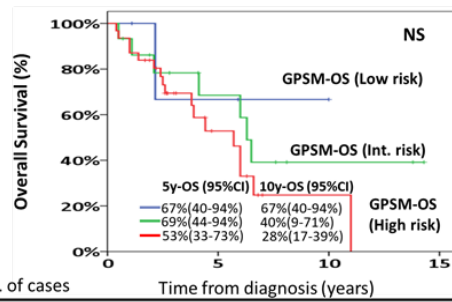
N. of cases	Time from diagnosis (years)	0	5	10	15
MARS (Low risk)	485	248	116	40	
GPSM-OS (Low risk)	413	208	97	35	
(Int. risk)	55	29	13	3	
(High risk)	17	11	6	2	

CRS (Intermediate risk)



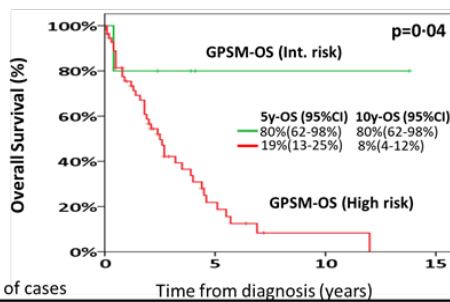
N. of cases	Time from diagnosis (years)	0	5	10	15
CRS (Int. risk)	59	19	5	0	
GPSM-OS (Low risk)	4	2	1	0	
(Int. risk)	17	8	1	0	
(High risk)	38	9	3	0	

MARS (Intermediate risk)



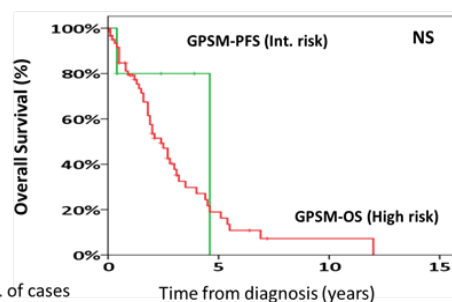
N. of cases	Time from diagnosis (years)	0	5	10	15
MARS (Int. risk)	50	18	4	0	
GPSM-OS (Low risk)	4	2	0	0	
(Int. risk)	15	7	2	0	
(High risk)	31	9	2	0	

CRS (High risk)



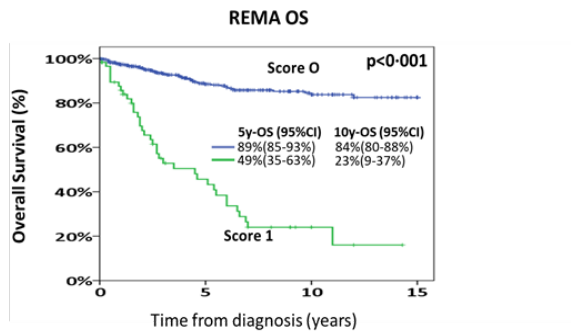
N. of cases	Time from diagnosis (years)	0	5	10	15
CRS (High risk)	62	8	2	0	
GPSM-OS (Low risk)	0	0	0	0	
(Int. risk)	5	1	1	0	
(High risk)	57	7	1	0	

MARS (High risk)

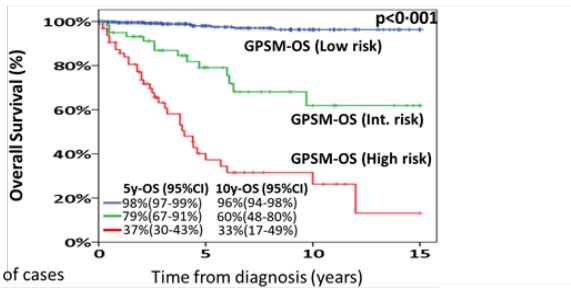


N. of cases	Time from diagnosis (years)	0	5	10	15
MARS (High risk)	67	7	1	0	
GPSM-OS (Low risk)	0	0	0	0	
(Int. risk)	5	0	0	0	
(High risk)	62	7	1	0	

E

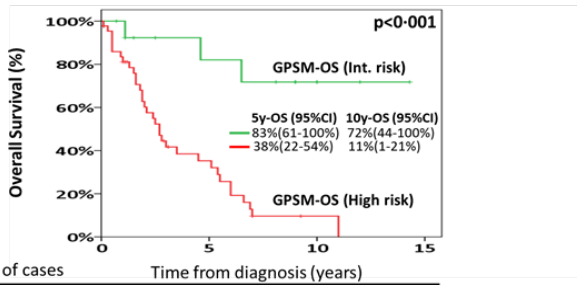


REMA-OS (Score 0)



	REMA-OS (Score 0)			
N. of cases	552	250	114	39
REMA-OS (Score 0)	552	250	114	39
GPSM-OS (Low risk)	417	210	98	35
(Int. risk)	61	26	10	3
(High risk)	65	14	6	1

REMA-OS (Score 1)



	REMA-OS (Score 1)			
N. of cases	59	23	8	1
REMA-OS (Score 1)	59	23	8	1
GPSM-OS (Low risk)	0	0	0	0
(Int. risk)	14	10	5	0
(High risk)	45	13	3	1

In panel A the impact of the GPSM-PFS score on PFS is shown, while in panels B to E, the prognostic value of the GPSM-OS score on OS is displayed. ¹⁵, Pardanani A, et al. Blood Adv 2018; ¹³, Muñoz-Gonzalez JI, et al. Blood 2019; ¹⁶, Jawhar M, et al. J Clin Oncol 2019 ; ¹⁴, Sperr W, et al. Lancet Haematol 2019. *, PFS analyses were defined considering progression only as transformation to a more advanced form of SM.

References

1. Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 1981; **147**: 195-7.
2. Munoz-Gonzalez JI, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv* 2018; **2**: 2814-28.
3. Fu W, O'Connor TD, Jun G, et al. Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature* 2013; **493**.
4. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; **526**: 68-74.
5. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; **536**: 285-91.
6. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 3812-14.
7. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 2010; **7**: 248-9.
8. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; **19**: 4-23.
9. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; **17**: 405-24.
10. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood* 2017; **129**: 1420-27.
11. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; **25**: 603-25.
12. Horny H.P Metcalfe D.D BJM BBJ, Akin C, Escribano L et al. Mastocytosis, in WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. In: Swerdlow SH CE HN, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 2008. 54-63 p.
13. Munoz-Gonzalez JI, Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, et al. Frequency and prognostic impact of KIT and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis. *Blood* 2019; **134**: 456-68.
14. Sperr WR, Kundi M, Alvarez-Twose I, et al. International prognostic scoring system for mastocytosis (IPSM): a retrospective cohort study. *Lancet Haematol* 2019; **6**: e638-e49.
15. Pardanani A, Shah S, Mannelli F, et al. Mayo alliance prognostic system for mastocytosis: clinical and hybrid clinical-molecular models. *Blood Adv* 2018; **2**: 2964-72.
16. Jawhar M, Schwaab J, Alvarez-Twose I, et al. MARS: Mutation-Adjusted Risk Score for Advanced Systemic Mastocytosis. *J Clin Oncol* 2019; **37**: 2846-56.

Discusión

La SM está constituida por un grupo de enfermedades hematológicas con un comportamiento clínico heterogéneo, agrupadas según la clasificación OMS del año 2016⁶ en un total de cinco subgrupos diagnósticos diferentes. Desde el punto de vista pronóstico estos 5 subtipos de SM pueden reagruparse a su vez en función de su comportamiento y agresividad clínica, en NonAdvSM (ISM y SSM) con una esperanza de vida similar a la de la población sana de la misma edad, y AdvSM (ASM, SM-AHN y MCL) con un pronóstico adverso y una esperanza de vida significativamente acortada¹². No obstante, tanto entre las formas indolentes como entre las avanzadas de SM, se observa un comportamiento clínico y pronóstico heterogéneo¹⁵⁷. Así, entre los pacientes con ISM, la mayoría presentan una enfermedad relativamente estable durante décadas, mientras que en algunos la enfermedad progresa hacia formas clínicamente más graves²⁸. En la actualidad, se estima que entre 5% y 10% de los pacientes diagnosticados de ISM a lo largo de su vida terminan por progresar a SSM y distintas formas de AdvSM, con el consiguiente acortamiento en su esperanza de vida²⁸. A su vez, aunque la mayoría de los pacientes con AdvSM muestra un comportamiento clínico agresivo requiriendo tratamiento citorreductor, una pequeña proporción de estos pacientes muestra un curso clínico estable durante años e incluso décadas^{5,157}.

Actualmente se desconocen los mecanismos etiopatogénicos implicados en la transformación maligna de la SM. No obstante, desde el punto de vista ontogénico se sabe que, con independencia del subtipo diagnóstico y su comportamiento clínico más (AdvSM) o menos grave (NonAdvSM), las células tumorales de estos pacientes se caracterizan por presentar en su gran mayoría la mutación D816V de *KIT*^{12,28}. Aunque esta mutación parece tener un papel relevante en la ontogenia de la enfermedad, y se le reconoce como un marcador genético típico de la SM al constituir uno de los cuatro criterios menores para el diagnóstico de SM, la mutación D816V de *KIT* por sí misma no puede explicar el comportamiento estable vs agresivo de la enfermedad, ni la progresión observada en algunos pacientes con ISM^{28,29}. Aun así, desde hace más de una década sabemos que la mutación D816V de *KIT* afecta de forma sistemática, además de a los MC tumorales, a células HSC¹⁵⁵. Dependiendo del número de células precursoras hematopoyéticas afectadas por la mutación, en paralelo con la susceptibilidad

individual a adquirir lesiones genéticas secundarias, variaría la probabilidad de progresar a formas AdvSM, tal como se ha observado en modelos murinos³²¹ y en pacientes con AdvSM^{43,213,321,323}. De acuerdo con esta hipótesis, estudios más recientes han demostrado que la adquisición de la mutación D816V de *KIT* en MSC y HSC¹⁵⁵ y la consiguiente afectación multilineal de la MO por la mutación, se asocian por un lado, a AdvSM^{28,29} y por otra parte, en pacientes con ISM, a mayor probabilidad de progresión a formas AdvSM y menor supervivencia²⁸. Asimismo, en los últimos años se ha confirmado la existencia de mutaciones en genes diferentes de *KIT* que afectan a una proporción significativa de pacientes con AdvSM y en menor medida, a las formas indolentes de la enfermedad, quedando por establecer de forma precisa su frecuencia en la ISM^{43,46}. Además, hoy se sabe que la mayoría de estas mutaciones afectan a genes que están alterados también de forma recurrente en otras hemopatías malignas, habiéndose asociado el número y tipo de mutaciones de los genes *ASXL1*, *SRSF2* y *RUNX1*, a un pronóstico más adverso de los pacientes con AdvSM^{43,46}.

A lo largo de las dos últimas décadas se han identificado, además de las alteraciones genéticas antes mencionadas, numerosos parámetros clínicos y biológicos con impacto pronóstico en la SM^{28,156,157}. Algunos de estos parámetros se han incorporado de forma progresiva en las distintas revisiones de la clasificación OMS de la mastocitosis como criterios útiles para el diagnóstico de nuevos subtipos de SM; tal es el caso de los niveles (muy) elevados de triptasa, propuestos como criterio diagnóstico diferencial, dentro de las ISM, para SSM^{12,22}. Pese a estas modificaciones y los esfuerzos realizados por conferir un valor pronóstico más preciso a la clasificación OMS de la SM, en la actualidad sigue existiendo una gran heterogeneidad pronóstica dentro de cada uno de los distintos subgrupos diagnósticos OMS de SM¹⁵⁷. Por ello, durante los últimos dos años se han multiplicado los estudios en los que se han diseñado, validado y propuesto diferentes algoritmos pronósticos, con el objetivo de lograr una mejor estratificación de los pacientes con distintos subtipos diagnósticos de SM y así, predecir mejor la probabilidad de progresar a formas más avanzadas de la enfermedad, y la supervivencia global de estos pacientes^{156,157,159}. Sin embargo, cada uno de estos trabajos ha partido del análisis de diferentes combinaciones de parámetros clínicos, hematológicos, séricos y/o genéticos,

a veces agrupados en base a distintos puntos de corte, sin que hasta la fecha se haya comparado de forma directa y en una serie amplia de pacientes, el valor predictivo de los distintos modelos de estratificación de riesgo propuestos^{156,157,159}. En este trabajo nos planteamos determinar el tipo, frecuencia e impacto pronóstico de las mutaciones que afectan a genes distintos de *KIT* en pacientes con SM (y de forma especial con NonAdvSM), con el fin de diseñar nuevos algoritmos para la estratificación pronóstica de estos pacientes que mejoren la capacidad predictiva de los modelos disponibles. En este apartado de la Tesis Doctoral discutiremos de forma resumida los resultados del trabajo realizado de forma separada para cada uno de los tres objetivos específicos planteados al inicio de la misma.

1. Impacto pronóstico de mutaciones somáticas y germinales presentes en mastocitosis sistémica

A pesar de la aparición relativamente temprana de la mutación D816V de *KIT* a lo largo de la vida de al menos una fracción significativa de los pacientes con SM³²³, en la mayoría de los casos, la sintomatología típica de la enfermedad aparece a partir de la tercera o cuarta década de vida^{24,29,323}. Estos hallazgos estarían de acuerdo con la hipótesis planteada por varios autores, según la cual, desde la activación constitutiva de *KIT* en HSC y la aparición de la SM, hasta la transformación hacia formas sintomáticas y avanzadas de la enfermedad, se requiere de una expansión y acumulación progresiva de células mutadas, probablemente asociada a la adquisición de lesiones genéticas secundarias, una mayor capacidad para mantenerlas (e.g. activación/represión de mecanismos anti/pro-apoptóticos)²⁰⁹ y/o la cooperación con un fondo genético particular (susceptibilidad) características de cada paciente. Así, estudios realizados en modelos murinos y en pacientes con SM han demostrado que sería necesaria la coexistencia de diferentes mutaciones, además de la mutación D816V de *KIT*, para la transformación desde formas indolentes de la enfermedad a formas avanzadas de la misma^{43,213,321,323}. De acuerdo con estos hallazgos, estudios recientes han descrito la presencia de mayor número de mutaciones somáticas que involucran genes diferentes de *KIT* en pacientes con AdvSM respecto a las

NonAdvSM⁴³. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna mutación concreta, ni un entorno genético determinado, común a los pacientes que presentan AdvSM^{42-47,124,213,242}. Aun así, en las AdvSM se ven afectados de forma recurrente un número variable de genes, que en su mayoría habían sido descritos previamente como genes alterados también en otras hemopatías malignas mieloides^{43,214,322}.

Un análisis más detallado de los estudios realizados hasta la fecha en los que se investiga la presencia de alteraciones en genes diferentes de *KIT* en pacientes con SM muestra sin embargo, que en ellos habitualmente se ha analizado un número relativamente reducido de genes que incluyen de forma prácticamente exclusiva genes que se habían identificado previamente como alterados en otras neoplasias mieloides^{43,214}. Con el fin de explorar la posible existencia de alteraciones recurrentes en otros genes, en nuestro trabajo analizamos las secuencias completas de las regiones codificantes de un total de 410 genes distintos que habían sido previamente descritos como asociados a cáncer y que por lo tanto, constituían genes candidatos a estar involucrados en la transformación maligna de la SM; además, realizamos la secuenciación del genoma completo de 4 pacientes diagnosticados de ASM. Para poder obtener la información genética que permitiera establecer la cronología de la aparición de distintos alteraciones genéticas y definir las correspondientes vías de evolución clonal, analizamos en paralelo ADN genómico obtenido a partir de MC y otras poblaciones mieloides y linfoides purificadas de MO y del propio pelo de cada paciente, centrándonos en pacientes que presentaban afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT*, asociada a niveles elevados de triptasa en suero, y así incluir en este estudio únicamente variantes de NonAdvSM con elevada probabilidad de progresar, además de pacientes con AdvSM.

Como resultado de los criterios de selección empleados, en nuestra serie encontramos un porcentaje relativamente elevado de pacientes con afectación de MSC de MO por la mutación D816V de *KIT*, asociado a una elevada tasa de progresión desde ISM y SSM a otras formas más avanzadas de la enfermedad. En términos globales, no encontramos mutaciones compartidas entre pacientes diagnosticados de ASM e ISM que progresaran a formas más avanzadas de la enfermedad, con

excepción de las mutaciones de los genes *IKZF1* p.N159S, *RUNX1* p.R162K y *SRSF2* p.P95R, presentes cada una en dos pacientes distintos. Más aun, un análisis detallado de las variantes genéticas encontradas en nuestra serie mostró que solo 2 (*SF3B1* p.K666T y *SRSF2* p.P95R) de las 67 variantes encontradas en nuestros pacientes se habían descrito previamente en otras series de pacientes con SM¹²⁴. Estos resultados pudieron ser confirmados mediante el análisis del genoma completo de 4 pacientes con ASM, lo cual demostró la ausencia de una mutación somática común entre ellos, a parte de la D816V de *KIT*. Curiosamente, la frecuencia de mutaciones observada en los MC clonales purificados de MO de estos 4 pacientes fue significativamente más bajo (0,12/Mb) que el descrito anteriormente en otras neoplasias de origen mielóide y otros tipos de cáncer^{324,325}, lo cual sugiere la existencia de menor inestabilidad genética en la ASM respecto a otras hemopatías mieloides. Sin embargo, a pesar de que el recuento de MC de MO está aumentado en la ASM respecto a la ISM, podría suceder que desde el punto de vista pronóstico, la célula “tumoral” más relevante en estos pacientes no sea el MC de MO, sino las HSC^{29,326}, ya que todos los casos tenían mutación multilineal de *KIT* con afectación de precursores CD34⁺. En tal caso, tanto los granulocitos neutrófilos como, en menor medida, los linfocitos T, probablemente compartan la mayoría de las variantes encontradas en los MC patológicos. Nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis dado que la mayoría (77%) de las mutaciones somáticas encontradas en los MC de MO estaban presentes también en células de otras líneas mieloides y linfoides. En este sentido, cabe señalar además, que la mitad de las variantes genéticas encontradas en los MC de MO de los pacientes con SM estudiados estaban presentes también en ADN proveniente del pelo de los pacientes, con una carga alélica de ~50%. En conjunto estos hallazgos sugieren que estas variantes corresponden, o bien a variantes germinales, o a mutaciones adquiridas en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. Además, más de dos terceras partes de los pacientes presentaban al menos una mutación germinal (potencialmente deletérea) en alguno de los 410 genes analizados, lo que suponía una frecuencia muy elevada en comparación con el 4%-30% de casos con mutaciones germinales encontrados en pacientes pediátricos y adultos con otros tipos de tumores³²⁷⁻³²⁹. A pesar de esta elevada frecuencia, la presencia de

mutaciones germinales solo demostró tener impacto pronóstico cuando coexistían al menos tres mutaciones germinales de forma simultánea en el mismo paciente. Aun así, un análisis más detallado de los pacientes que mostraban ≥ 3 variantes germinales reveló que éstos, a su vez, presentaban también un número más elevado de mutaciones somáticas con afectación multilineal. En conjunto estas observaciones podrían reflejar la existencia de una mayor inestabilidad genómica entre estos pacientes, asociadas a un impacto pronóstico adverso, reflejada tanto en un mayor número de mutaciones germinales como de mutaciones somáticas. A pesar de todo lo anterior, el pequeño número de casos analizados, junto con la ausencia de consenso a la hora de clasificar una mutación germinal como variante deletérea³³⁰, complican de forma notable la interpretación del verdadero significado fisiopatogénico de nuestros hallazgos. Aun así, cabe señalar que en los últimos años se ha incrementado la frecuencia con la que se detectan mutaciones germinales en genes relacionados con cáncer como *ANKRD26*³³¹, *CEBPA*³³², *DDX41*³³³, *ETV6*³³⁴, *GATA2*³³⁵, *SAMD9*³³⁶ y *SAMD9L*³³⁷, y que hoy sabemos afectan al menos a 5-15%³³⁸ de los adultos y 4-13%³³⁹ de los niños con hemopatías de origen mielóide (MPN y AML), erigiéndose como uno de los elementos claves a la hora de clasificar estas enfermedades^{31,340}.

De forma paralela, se han identificado también un número creciente de mutaciones somáticas en células hematopoyéticas de sujetos (adultos) aparentemente sanos, asociándose una mayor proliferación de estas alteraciones a una edad más avanzada¹⁴². Esta situación (i.e. abreviada ARCH, del inglés "*age-related clonal hematopoiesis*") se caracteriza por la presencia de mutaciones somáticas en genes frecuentemente mutados en otras neoplasias de origen mielóide, como los MDS y, en menor medida, la AML y las MPN, como los genes *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2* y *TET2*, alteradas en alrededor del 10% de los adultos (a priori sanos) ≥ 70 años^{341,342}; desde el punto de vista pronóstico, los individuos con ARCH un riesgo hasta 12 veces superior de desarrollar una hemopatía mielóide¹⁴². Por todo ello, hoy se considera que la ARCH constituye una condición pre-leucémica relacionada con la edad^{135,136}. En conjunto, nuestros resultados apoyarían esta hipótesis ya que más de la mitad de los pacientes con SM estudiados que presentaban ≥ 1 mutación en algún gen

característico de ARCH (n=10/18 casos; 56%) mostraban ya al diagnóstico, y/o terminaron por desarrollar, una hemopatía asociada a la SM, afectando en menor medida a pacientes con SSM (11%) y ASM (33%), respecto a otras formas de AdvSM. Esto sugiere que la adquisición de mutaciones relacionadas con ARCH en pacientes con ISM constituiría un cofactor especialmente relevante, para progresión de SM a formas más avanzadas de la enfermedad, y dentro de estas de modo especial a SM-AHN.

La identificación del posible orden cronológico en el que se adquirieron las distintas mutaciones somáticas presentes en pacientes que mostraban ≥ 2 mutaciones, reveló que en prácticamente un tercio de los casos la carga alélica de *KIT* era superior a la de las otras mutaciones. Estos hallazgos sugieren que la mutación D816V de *KIT* podría constituir la primera mutación adquirida. En otro tercio de los casos, la mutación D816V de *KIT* estaba presente en un clon distinto o mostraba menor carga alélica, que la detectada para las mutaciones que afectaban a otros genes con afectación multilínea como *TET2*, *RUNX1* y *EZH2*, mostrando la mayoría de los pacientes de este grupo una hemopatía asociada a la SM. Los hallazgos en este último grupo de pacientes apoyan observaciones previas basadas en cultivos *in vitro* de unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas provenientes de MO de pacientes con SM, que mostraron la existencia de un predominio de unidades formadoras de colonias con mutaciones en genes diferentes de *KIT* en la mayoría de pacientes con SM-AHN¹²⁴. Además, en el único caso de nuestra serie en el que se confirmó que la mutación de *KIT* era un evento secundario, el paciente desarrolló una neoplasia mieloide justo antes de morir. La discrepancia entre nuestros resultados y algunos trabajos previos de otros autores que sugieren que la adquisición de la mutación de *KIT* podría ocurrir más frecuentemente y de forma casi exclusiva como un evento tardío (alteración secundaria) en la AdvSM, podría ser debida a que todos los pacientes con ≥ 2 mutaciones analizados¹²⁴ correspondían a SM-AHN, y en el modelo de cultivo *in vitro* realizado podría existir un crecimiento preferente de unidades formadoras de colonias con *KIT* silvestre vs células precursoras tumorales con *KIT* mutado; por el contrario, nuestra serie estaba enriquecida en pacientes con ISM y ASM con afectación multilínea de *KIT*, en los que analizamos células primarias purificadas

de MO, sin dar pie a que pudieran existir sesgos asociados a un crecimiento (potencialmente) distinto de unas colonias frente a otras. Sin embargo, en nuestro estudio tampoco llevamos a cabo análisis sobre células individuales ni estudios clonogénicos, por lo que nuestras conclusiones han de ser consideradas con cautela.

La mayor parte de los genes en los que encontramos mutaciones somáticas en nuestra serie, excluyendo *KIT*, (e.g. *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IKZF1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2* y *TET2*) ya habían sido descritos previamente por otros autores como mutados en pacientes con AdvSM^{42-46,124} y/o con otras neoplasias mieloides^{122,214,224,225,240,242,341}; sin embargo, nuestros resultados muestran por primera vez que la mayoría de estas mutaciones presentan también afectación multilineal de la hematopoyesis en MO. Además, en nuestra serie corroboramos observaciones previas de otros autores que sugerían que el número de genes mutados (aparte de *KIT*), aumentaba de forma significativa desde la ISM a la ASM, lo que está de acuerdo con observaciones previas¹²⁰. Asimismo, en conjunto nuestros hallazgos apoyan el papel de la mutación D816V de *KIT* como un desencadenante de AdvSM bajo un entorno genético alterado, definido no solo por la adquisición temprana de mutaciones en otros genes diferentes a *KIT* sino también, por el número de variantes germinales preexistentes. De hecho, la presencia de ≥ 1 mutación somática con afectación multilineal además de la de mutación *KIT*, y/o la presencia de ≥ 3 variantes germinales en regiones codificantes de los genes asociados a cáncer investigados, se asociaron de forma significativa a mayor probabilidad de progresión y una supervivencia global acortada entre pacientes con SM.

Con el fin de dilucidar si alguno de los genes y mutaciones concretos encontrados confería un pronóstico adverso en pacientes con SM, investigamos el impacto pronóstico de cada gen individual y qué mutaciones concretas se asociaban con una mayor tasa de progresión y menor supervivencia (impacto pronóstico). En este sentido, nuestros resultados confirmaron que los casos que presentaban ≥ 1 mutación en cualquiera de los genes del panel *S/A/R* (*SRSF2*, *ASXL1* y *RUNX1*)⁴⁶ mostraban una PFS y OS significativamente reducidas. Sin embargo, a diferencia de lo descrito por

Jawhar *et al*⁴⁶, en nuestra serie la inclusión del gen *EZH2* junto con los genes *S/A/R*, en un panel *S/A/R/E*, constituía la combinación de genes con mayor capacidad predictiva tanto para la PFS como para la OS, siendo su valor pronóstico superior a la del panel *S/A/R*. Estos hallazgos se traducen en que la nueva combinación de genes mutados tenía mayor impacto pronóstico (independiente), sobre la PFS y la OS, en nuestra serie. En este sentido, merece destacar que el gen *EZH2* fue el gen de esta familia que más frecuentemente se encontraba mutado en nuestra serie de acuerdo con lo observado también por otros autores en SM^{43,124}, y en cohortes de pacientes con otras hemopatías mieloides^{224,322,343}, en las que las mutaciones en *EZH2* y *SRSF2* constituían mutaciones mutuamente excluyentes²²¹. Esto podría explicar por qué la inclusión de *EZH2* en el panel de genes *S/A/R/E* mejora la capacidad predictiva observada para la combinación de genes *S/A/R*. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los descritos en algunos trabajos^{46,214} con una mediana de seguimiento significativamente menor a la nuestra (3,6 y 2 años vs 6,5 años, respectivamente), un periodo de tiempo en el que menos de la mitad de nuestros pacientes con ISM que sufrieron progresión a SSM o a AdvSM, lo habían hecho. Ante estas diferencias, sería necesario confirmar nuestros hallazgos en series más amplias de pacientes con un seguimiento más prolongado.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que a pesar de que no haya ninguna alteración genética específica de SM asociada a la progresión y/o a formas avanzadas de SM, a parte de la mutación multilínea de *KIT*, para la transformación maligna de la SM probablemente se requiera de un entorno genético alterado con la presencia de distintas combinaciones de mutaciones germinales y mutaciones somáticas y un patrón de afectación multilínea de la hematopoyesis que involucren tanto a los MC tumorales, como a otras células de la MO. En este contexto, las mutaciones que afectan a los genes *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* y *EZH2*, emergen como la combinación de marcadores genéticos de mayor valor predictivo de progresión y supervivencia global de pacientes diagnosticados de ISM de alto riesgo.

2. Frecuencia e impacto pronóstico de la mutación de *KIT* y otras variantes genéticas en la mastocitosis sistémica indolente

La mutación D816V activante de *KIT* constituye el marcador molecular característico de SM^{29,76}, estando presente en la MO de $\geq 90\%$ de los pacientes, incluyendo tanto formas indolentes como avanzadas de la enfermedad^{9,76}. A pesar de la elevada frecuencia de esta mutación en pacientes con SM²⁹, y su utilidad diagnóstica, por si misma la mutación D816V de *KIT* no permite explicar la progresión a SSM o AdvSM observada en 5-10% de los pacientes con ISM. Aun así, hoy sabemos que la afectación multilineal de la hematopoyesis por esta mutación de *KIT*, se asocia con un pronóstico adverso entre pacientes diagnosticados de ISM²⁸, especialmente cuando se detecta en MSC además de los HSC y distintos compartimentos de células mieloides y/o linfoides maduras de MO¹⁵⁵. Asimismo, la mutación D816V de *KIT* representa un marcador patognómico de ASM y ASM-AHN, enfermedades en las que suele coexistir con mutaciones (adicionales) en otros genes^{43,46}, algunas de las cuales se han asociado de manera recurrente a una supervivencia significativamente acortada de pacientes^{42,43,46,120,257,344}. Estos hallazgos sugieren que la mutación multilineal de *KIT*, junto con mutaciones en otros genes distintos de *KIT*, podrían constituir el entorno genético requerido para la progresión de la enfermedad, condicionando así un comportamiento más agresivo de la misma con mayor riesgo de muerte. Sin embargo, en el momento inicial de este trabajo la información disponible, en pacientes con ISM, acerca de la frecuencia y el potencial impacto pronóstico de las mutaciones que afectan a genes diferentes de *KIT*, y su relación con la mutación multilineal de *KIT*, era muy limitada. Así, de los 18 genes descritos como mutados de forma recurrente en pacientes con AdvSM (*ASXL1*, *CBL*, *CDH11*, *DNMT3A*, *EPHA7*, *EZH2*, *ICK*, *IKZF1*, *ITGA10*, *JAK2*, *KAT6B*, *KRAS*, *PIK3CD*, *ROS1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*)^{42,43,46,214,344}, solamente 11 (*ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *EZH2*, *IKZF1*, *JAK2*, *KRAS*, *SF3B1*, *SRSF2*, *RUNX1*, *TET2*) habían sido investigados en cohortes con >5 pacientes con ISM, hasta un máximo de 81 pacientes incluidos en cuatro estudios diferentes^{42,43,257,344}.

En este trabajo, describimos la presencia de ≥ 1 mutación en genes distintos de *KIT* en un 17% de las ISM, siendo esta frecuencia concordante con la observada en los trabajos antes referidos (frecuencia media del 16%; rango: 11%-40%)^{42,43,214,344}. En términos globales, este porcentaje es significativamente inferior al descrito en trabajos previos en los que se analiza un número muy variables de genes (rango: 7-410 genes)^{42,43,46,120,214,344}, entre pacientes diagnosticados de formas más avanzadas de la enfermedad como SSM (3/6 casos; 50%), ASM (22/39 casos; 56%), SM-AHN (131/184 casos; 71%) y MCL (23/36 casos; 64%). Desde el punto de vista pronóstico, los pacientes con ISM y mutaciones adicionales a *KIT* D816V y aquellos que mostraban una carga alélica para la mutación de *KIT* en MO $\geq 1\%$, mostraron un acortamiento significativo de la supervivencia (PFS y OS) respecto a aquellos que carecían de mutaciones adicionales a *KIT*, y/o a una carga alélica de *KIT* D816V en MO $< 1\%$. Cabe señalar además que, aquellos pacientes que presentaban una de carga alélica para la mutación D816V de *KIT* en MO $\geq 1\%$ mostraban también mayor frecuencia de mutaciones adicionales en otros genes (ISM multmutadas), cuando los comparábamos con ISM que tenían una carga alélica de *KIT* en MO $< 1\%$. En conjunto, estos resultados confirman observaciones previas tanto de nuestro grupo²⁸ como de otros autores²⁰⁷, en relación al impacto pronóstico adverso de i) la presencia en MO de mutación multilineal de *KIT* sobre la PFS de pacientes con ISM, y ii) de las variantes genéticas que afectan a otros genes diferentes de *KIT* que en pacientes con AdvSM se habían relacionado previamente con una OS significativamente más corta^{28,43,46,124,214,344}. La comparación directa de la carga alélica en MO para la mutación D816V de *KIT* y para las demás mutaciones identificadas en genes distintos de *KIT*, mostró cifras globales inferiores para la mutación de *KIT*, lo que apoyaría la hipótesis de que esta mutación podría constituir un evento secundario en la mayoría de los pacientes con ISM multmutados, de acuerdo con hallazgos previos de otros autores en series de pacientes con AdvSM enriquecidas en SM-AHN¹²⁴.

Un análisis más detallado de los 18 genes mutados analizados mostró una afectación predominante en ISM de los genes *ASXL1* y *DNMT3A*. El gen *ASXL1* había sido ya descrito previamente y de forma repetida como mutado en pacientes con AdvSM, entre las que se ha asociado a una OS más

corta^{46,215}. Por el contrario, las mutaciones en el gen *DNMT3A*, a pesar de haber sido descritas previamente por varios autores tanto en SM^{42,214,344} como en otras hemopatías mieloides^{242,243}, no se habían asociado a un impacto pronóstico claro, ni entre pacientes con AdvSM, ni en otras neoplasias mieloides^{42,214,242,243,344}. En nuestra serie, la presencia de ≥ 1 variantes genéticas en cualquiera de estos dos genes y/o en el gen *RUNX1* (panel A/R/D), mostró un impacto pronóstico negativo, tanto sobre la PFS como sobre la OS de pacientes con ISM. Estos resultados confieren por primera vez un impacto pronóstico adverso a las mutaciones de los genes *ASXL1* y *RUNX1* en ISM, de forma similar a lo observado previamente en pacientes con AdvSM^{46,214,344}. Por el contrario, ninguno de los pacientes diagnosticados de ISM de nuestra serie exploratoria presentó variantes genéticas que afectaran a los genes *SRSF2* y *EZH2*, sugiriendo que estos dos marcadores genéticos adversos podrían aparecer en estadios más avanzados de la enfermedad, una vez se haya desarrollado ya una AdvSM (o justo antes de la progresión de ISM a AdvSM). En este sentido, cabe señalar que los dos únicos casos de la serie de validación en los que en este trabajo encontramos mutaciones en *SRSF2* progresaron de ASM a SM-AHN; en ambos pacientes las mutaciones de *SRSF2* detectadas parecían ser secundarias a otras variantes presentes en los genes *TET2* y *DNMT3A*, mostrar una menor carga alélica (34% vs 48% y 20% vs 53%, respectivamente). Junto con las observaciones previas de otros autores que describen una asociación estrecha entre las mutaciones de *SRSF2* y *EZH2*, y SM-AHN^{43,46,214,344}, estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que las mutaciones que afectan a ambos genes emergen de forma tardía en pacientes con AdvSM, estando prácticamente ausentes en pacientes con ISM. De acuerdo con esta hipótesis, los datos descritos en la bibliografía muestran que la frecuencia de mutaciones en *SRSF2* y *EZH2* desciende de forma progresiva desde la SM-AHN (63% y 11%)⁴³ a la MCL (36% y 4%, respectivamente)^{43,120} y ASM (0% y 4%)¹²⁰ estando ausentes en 81/81 pacientes con ISM estudiados previamente. Al analizar la carga alélica en MO para las mutaciones de los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A*, observamos que todos los pacientes que progresaron y fallecieron tenían variantes patogénicas en estos genes con carga alélica $\geq 30\%$. Como consecuencia de ello, al establecer un punto de corte ($\geq 30\%$) para la carga alélica en MO de las variantes patogénicas de estos genes, observamos

un ligero (pero significativo) aumento en la capacidad predictiva de la PFS y la OS de pacientes con ISM, para estas tres mutaciones genéticas.

Mediante un análisis multivariante confirmamos el valor pronóstico independiente (adverso) a la hora de predecir la PFS de pacientes con ISM de la presencia de i) mutaciones patogénicas con carga alélica $\geq 30\%$ en los genes *A/R/D*, ii) una carga alélica para la mutación D816V de *KIT* en MO $\geq 1\%$ y iii) niveles séricos elevados de $\beta 2M$. Por el contrario, la presencia de mutaciones patogénicas (con carga alélica $\geq 30\%$) en los genes *A/R/D* constituía el único factor pronóstico independiente para predecir la OS de pacientes con ISM. Basándonos en estos parámetros construimos dos algoritmos pronósticos que estratificaban a los pacientes con ISM en dos grupos con distinto riesgo de progresión y muerte, respectivamente. En conjunto estos hallazgos confirman y amplían resultados previos de nuestro grupo en una serie independiente de 145 pacientes diagnosticados de ISM en los que por entonces no se investigó la presencia/ausencia de mutaciones adicionales a la mutación de *KIT*, y que mostraba ya el valor pronóstico independiente para PFS de los niveles séricos de $\beta 2M$ y de la presencia de mutación multilínea de *KIT*²⁸. Además, nuestros resultados también demuestran por primera vez que la detección de la mutación multilínea de *KIT* basada en el estudio de diferentes poblaciones celulares purificadas de MO, podría sustituirse por el análisis mediante ASO-qPCR de la carga alélica de la mutación D816V de *KIT* en muestras de ADN obtenidas de MO total, lo que representa un tipo de análisis mucho más sencillo, rápido y fácil de estandarizar²⁰⁶. El mayor poder predictivo de la evaluación de la carga alélica de *KIT* en MO, respecto a la determinación de la afectación multilínea de la hematopoyesis basada en el estudio de poblaciones celulares purificadas, probablemente se deba a que la primera aproximación da información simultánea acerca de la afectación multilínea de la hematopoyesis por la mutación de *KIT* y de la carga tumoral de MC en MO. Esto podría contribuir también a explicar los niveles de correlación relativamente bajos observados, tanto en nuestro trabajo como en estudios previos²⁰⁷, entre la carga alélica en MO para la mutación D816V de *KIT* y los niveles de sBT o la carga tumoral de MC en MO evaluada por citometría de flujo o histopatología²⁰⁷.

Más difícil de explicar es la asociación observada en nuestra serie de pacientes con ISM entre niveles elevados de s β 2M y una mayor fase de progresión a SSM y AdvSM²⁸. En este sentido cabe señalar que, la asociación entre niveles elevados de s β 2M y un pronóstico adverso se ha referido también previamente en otras neoplasias hematológicas, como el mieloma múltiple y distintos subtipos de linfomas-Hodgkin como el linfoma de manto y el linfoma B difuso de célula grande²⁰⁰⁻²⁰³, sin que se conozca con precisión el mecanismo o los mecanismos patogénicos implicados. En este sentido, desde hace tiempo se conoce que la s β 2M se produce de manera constitutiva y está presente en la superficie celular de la práctica totalidad de células nucleadas del organismo, asociándose entre otras proteínas, la cadena α del complejo mayor de histocompatibilidad (*human leukocyte antigen* – HLA-) de tipo 1, expresado en la membrana citoplasmática, desde donde se libera en forma soluble al espacio extracelular¹⁹⁸. Esta liberación de β 2M en forma soluble podría incrementarse en diferentes circunstancias y situaciones, como una mayor proliferación celular²⁰¹ y/o la respuesta inmune²⁰⁴, sugiriendo que ambos procesos podrían contribuir al incremento de los niveles de s β 2M en pacientes con ISM y mayor riesgo de progresar.

A diferencia de lo descrito por otros autores, en nuestro trabajo no hemos podido validar el impacto pronóstico independiente sobre la OS de pacientes con ISM, de los niveles elevados de SAP^{28,46}. Así, en nuestra serie, este parámetro se ha visto reemplazado por la presencia de variantes patogénicas (con carga alélica $\geq 30\%$) en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A*. Esto podría ser debido a que estas mutaciones ocurren de forma previa a la progresión y la afectación funcional de distintos órganos y tejidos como el hígado y/o el hueso, y al aumento paralelo de los niveles de SAP derivado de los mismos. Asimismo, cabe señalar que solo un pequeño número de pacientes con ISM mostró al diagnóstico, niveles elevados de s β 2M, variantes patogénicas (con una carga alélica $\geq 30\%$) en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A* y mutación multilíneal de *KIT* con carga alélica $>1\%$ en MO, de los que tras haber progresado a AdvSM, fallecieron todos menos uno, a lo largo de los primeros 6 años de seguimiento. Esta asociación entre distintos factores pronósticos explicaría por qué solo las

mutaciones en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A* mostraron valor pronóstico independiente para OS.

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que la carga alélica de *KIT* en MO, junto con los niveles de s β 2M, deberían ser evaluados en todos los pacientes recién diagnosticados de ISM para una estimación más precisa del riesgo de progresión, al permitir identificar aquellos pacientes con elevada probabilidad de progresar hacia AdvSM que podrían beneficiarse de un seguimiento más exhaustivo y eventualmente, de recibir de forma temprana tratamiento citorreductor. Además, la identificación de mutaciones patogénicas en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y *DNMT3A* y la determinación de su carga alélica debería realizarse también al diagnóstico (o al menos inmediatamente tras la progresión a SSM o AdvSM) en pacientes con ISM y elevado riesgo de progresión, lo cual permitiría identificar aquellos pacientes con elevado riesgo de muerte asociada a SM. Sin embargo, debido al bajo número de fallecimientos observados entre los pacientes incluidos en nuestra serie, las conclusiones relacionadas con los factores pronósticos para la OS deben confirmarse en estudios independientes sobre series amplias de pacientes con ISM y tiempos de seguimiento, si cabe, más prolongados.

3. Propuesta de un algoritmo pronóstico universal para mastocitosis sistémica

En los últimos dos años, además de los sistemas de estratificación de riesgo para ISM descritos en el capítulo anterior (REMA-PFS y REMA-OS) se han diseñado, validado y propuesto otros 5 algoritmos pronósticos distintos^{156,157,159}. Tal aluvión de nuevos modelos de estratificación de riesgo ha generado dudas sobre cuál o cuáles serían los más idóneos para emplear en la rutina diagnóstica y la práctica asistencial. Esto es debido a que en la elaboración y validación de cada uno de estos modelos, se han considerado diferentes combinaciones de variables, sin que exista hasta la fecha ningún estudio en el que se comparen de forma directa dos o más de estos sistemas de clasificación pronóstica. En este trabajo hemos querido, por un lado, elaborar y validar un sistema global de estratificación

pronóstica partiendo de todos los parámetros clínicos, biológicos y genéticos que habían sido identificados como factores pronósticos independientes en los distintos modelos propuestos previamente; y por otra parte, nuestro interés se centró en comparar los nuevos modelos con todas las clasificaciones de riesgo disponibles previamente. Para ello, analizamos una cohorte amplia de 1275 pacientes representativos de los distintos subtipos diagnósticos de SM, dividida en dos series, una serie exploratoria con 422 pacientes de la REMA y otra de validación con 853 pacientes procedentes de varios centros de Europa y de EE.UU.

El análisis multivariante realizado sobre la serie exploratoria permitió identificar dos combinaciones de parámetros con valor pronóstico independiente para PFS y OS y que han constituido la base sobre la que se asientan los dos *Global Prognostication Scores for Mastocytosis* propuestos en este trabajo (GPSM-PFS y GPSM-OS, respectivamente). El modelo GPSM-PFS incluía una combinación de parámetros de fácil acceso, disponibles en todo el mundo en prácticamente cualquier laboratorio de diagnóstico clínico (i.e. recuento de plaquetas, sBT y s β 2M), mientras que el GPSM-OS requería de una combinación más compleja de parámetros entre los que se incluían la detección de mutaciones en los genes *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* y/o *DNMT3A* junto a los niveles de hemoglobina y de SAP. Ambos modelos GPSM permitieron estratificar a los pacientes con SM en grupos de bajo y alto riesgo, con un pequeño grupo de pacientes de riesgo intermedio, tanto cuando analizamos la serie exploratoria como en la cohorte de validación. Además, ambos algoritmos permitieron la estratificación pronóstica tanto de los pacientes incluidos en la serie global, como de los pacientes con NonAdvSM y AdvSM, cuando se consideraban de forma separada.

En general, nuestros resultados mostraron que los siete algoritmos pronósticos propuestos previamente para SM evaluados en este trabajo, permiten una estratificación pronóstica aceptable de los pacientes con SM. Sin embargo, un análisis más detallado de los resultados obtenidos mostró importantes diferencias entre ellos, según el grupo concreto de pacientes analizados (i.e. la serie global o los pacientes con NonAdvSM o AdvSM por separado) y el marcador de evolución (PFS y OS). Así, los modelos GPSM-PFS y REMA-PFS destacaron sobre los demás al mostrar mayor precisión y eficiencia a

la hora de predecir PFS en el conjunto de los pacientes. En contrapartida, para predecir la OS de toda la serie, todos los modelos, con la excepción del REMA-OS, mostraron una buena capacidad predictiva, siendo los sistemas GPSM-OS y AdvSM-IPSM, seguidos de los modelos MAPS y MARS, los que mostraron mayor capacidad predictiva.

Al repetir estos análisis de forma específica para los pacientes con NonAdvSM, nuestros resultados confirmaron que tanto el modelo REMA-PFS como el GPSM-PFS, seguían siendo los mejores algoritmos para predecir PFS. En este contexto cabe señalar, que estos dos modelos constituyen los únicos sistemas de clasificación que utilizan los niveles de $s\beta 2M$ como factor pronóstico, confirmando así que este parámetro proporcionaría información relevante a la hora de determinar la probabilidad de progresión entre pacientes con ISM. Esto podría ser debido a que, a diferencia de otros biomarcadores que reflejan la carga tumoral como la sBT, los niveles de $s\beta 2M$ podrían reflejar además la posible coexistencia de una respuesta inmune incrementada y/o alterada y la interacción del MC neoplásico con el micromedioambiente celular a nivel tisular^{345,346}. Por el contrario, ninguno de los algoritmos diseñados para PFS (ni siquiera el GPSM-PFS) permitió predecir la progresión en las AdvSM. Estos hallazgos podrían deberse a que la mayoría de pacientes con AdvSM muestran ya en el momento del diagnóstico, parámetros típicamente asociados a (mayor probabilidad de) progresión. Además, es bien conocido que con frecuencia resulta complejo, si no imposible, identificar la emergencia de una neoplasia hematológica adicional, diferente a la preexistente, en pacientes con AdvSM, debido a la gran heterogeneidad de las AHN asociadas a SM³⁸⁻⁴¹ y/o a la corta supervivencia de muchos de estos enfermos^{5,31,55}. Por el contrario, todos los algoritmos analizados mostraron una buena capacidad predictiva para la OS al considerar de forma separada los pacientes con NonAdvSM y AdvSM; aun así, los modelos GPSM-OS y AdvSM-IPSM mostraron ser los que se asociaban a una estratificación pronóstica más precisa, y por lo tanto, los que tenían mayor capacidad predictiva para OS.

En conjunto, estos resultados demuestran que el modelo GPSM-PFS propuesto en este trabajo constituye un sistema de clasificación robusto a la hora de estratificar los pacientes diagnosticados de NonAdvSM, en función del riesgo que presentan de progresar, mientras que el modelo GPSM-OS y el

AdvSM-IPSM, seguidos de los sistemas MAPS y MARS, destacan como los mejores a la hora de predecir la OS, sobre todo en pacientes con AdvSM. Curiosamente, sorprende que algoritmos basados exclusivamente en parámetros clínicos y de laboratorio de fácil acceso, sin la necesidad de analizar marcadores moleculares más complejos (AdvSM-IPSM y GPSM-PFS), muestren una capacidad predictiva igual o incluso superior, a la de otros modelos en los que se incluyen las mutaciones genéticas asociadas a peor pronóstico. Esto podría ser debido a que las variables seleccionadas en el primer grupo de modelos pudiesen reflejar de forma fidedigna y/o temprana las consecuencias de la inestabilidad genética/molecular del tumor, sustituyendo así la capacidad predictiva de los marcadores moleculares. Cabe destacar también que, de todos los modelos evaluados, el sistema AdvSM-IPSM constituye el algoritmo desarrollado sobre la serie multicéntrica más amplia de pacientes con SM descrita hasta la fecha, pudiendo este hecho otorgarle una mayor robustez y reproducibilidad y en definitiva un mayor valor predictivo en la evaluación comparativa realizada aquí de los distintos algoritmos pronósticos disponibles^{156,157,159,347}.

En conjunto, estos hallazgos, podrían tener importantes consecuencias directas en el futuro manejo clínico de pacientes con SM, al demostrar que si no se dispone de información sobre la carga alélica de la mutación D816V de *KIT* o de las mutaciones de otros genes en MO, ésta no sería estrictamente necesaria para poder estratificar los pacientes con SM según su riesgo de progresión y/o muerte. Así, en aquellos pacientes con SM en los que la carga alélica de la mutación D816V de *KIT* en MO no esté disponible al diagnóstico, éstos podrían estratificarse según su riesgo de progresión aplicando el sistema GPSM-PFS propuesto en nuestro trabajo y que combina variables de bajo coste, disponibles en la mayor parte de laboratorios en todo el mundo, como son el recuento de plaquetas y los niveles de sBT y de sβM, en ausencia de parámetros derivados del estudio de la MO. De forma similar, la estratificación de pacientes con SM en función de la OS basada en el modelo AdvSM-IPSM tendría como ventaja sobre los algoritmos MAPS, MARS y GPSM-OS, el que se basa únicamente en parámetros de laboratorio de fácil acceso como los niveles de hemoglobina, el recuento de plaquetas y leucocitos y los niveles de sBT, sin necesidad de realizar análisis genéticos más complejos^{156,159,347}. En

contrapartida el análisis de las mutaciones *S/A/R* o *S/A/R/D* tiene como ventaja el que dichas mutaciones constituyen un marcador más fiable al ser un marcador más estable durante el transcurso de la enfermedad³⁴⁸, respecto a otros parámetros clínicos y/o de laboratorio, como la sBT o sβ2M, que pueden verse alterados por la medicación o por procesos (e.g. infecciosos y/o alérgicos) intercurrentes^{181,196,349}. A pesar de que estas circunstancias han podido ocurrir en nuestra serie, el modelo AdvSM-IPSM estratifica mejor el riesgo de muerte de los pacientes con SM respecto a los algoritmos pronósticos basados en combinaciones de factores pronósticos que incluyen marcadores moleculares, cuestionando así la necesidad de realizar estudios de secuenciación de otras mutaciones genéticas que afectan a genes distintos de *KIT* con fines pronósticos, en pacientes con SM. Una ventaja adicional de los algoritmos GPSM-PFS y AdvSM-IPSM, ya adelantada anteriormente en este apartado, es que requieren únicamente de parámetros séricos y hematológicos cuya obtención se basa en el estudio de una muestra de sangre con procedimientos mínimamente invasivos, lo que facilita la re-estratificación de cada paciente a lo largo del tiempo, durante la evaluación de la enfermedad, sin necesidad de someter al paciente a un procedimiento invasivo como es el aspirado medular, tanto en el contexto de ensayos clínicos como en la práctica asistencial habitual

Conclusiones

En relación con la frecuencia, tipo e impacto pronóstico de las mutaciones somáticas y germinales presentes en pacientes con mastocitosis sistémica:

1. No existe una alteración genética específica asociada a la progresión hacia formas avanzadas de SM, a parte de la afectación multilineal de la hematopoyesis por la mutación D816V de *KIT*.
2. La transformación maligna en la SM, probablemente requiera de un entorno genético alterado en el que coexisten diferentes combinaciones de mutaciones (somáticas y germinales) con un patrón de afectación multilineal de la hematopoyesis en el que se ven afectados tanto los MC tumorales como células de otras líneas mieloides y/o linfoides de MO.
3. La presencia de mutaciones en los genes *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* y/o *EZH2* constituye un marcador genético potencialmente útil a la hora de predecir la progresión y supervivencia de pacientes con ISM de alto riesgo.

En relación con la frecuencia e impacto pronóstico de la mutación de *KIT* y de otras variantes genéticas en pacientes con mastocitosis sistémica indolente:

4. Entre 15-20% de los pacientes con ISM muestran mutaciones somáticas que afectan además de *KIT*, otros genes de los que destacan por su frecuencia los genes *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *ITGA10* y *RUNX1*. A diferencia de lo observado en AdvSM, en la ISM son raras las alteraciones genéticas en las que se ven involucrados los genes *SRSF2* y *EZH2*.
5. Los niveles elevados de β 2M sérica junto con la presencia de la mutación D816V de *KIT* con carga alélica >1% en MO y la coexistencia al diagnóstico de mutaciones patogénicas en los genes *ASXL1*, *RUNX1* y *DNMT3A* con carga alélica en MO >30%, constituyen la combinación de parámetros con mayor poder predictivo de progresión desde ISM a SSM y AdvSM.

En relación con la estratificación de riesgo y la propuesta de un nuevo algoritmo pronóstico universal para mastocitosis sistémica:

6. De todos los factores pronósticos independientes identificados hasta la fecha, la combinación del recuento de plaquetas en sangre y los niveles séricos de $\beta 2M$ y sBT por un lado, y de las cifras de hemoglobina, SAP y las mutaciones *A/R/D* por otra parte, constituirían las combinaciones de variables con valor independiente para predecir la PFS y la OS de pacientes con SM, respectivamente. La inclusión de estas combinaciones de factores pronósticos en los modelos GPSM-PFS y GPMS-OS permite dividir los pacientes con SM en dos grandes grupos de bajo y alto riesgo, junto a un pequeño grupo de riesgo intermedio.
7. De todos los sistemas de estratificación de riesgo propuestos para pacientes con SM, los modelos REMA-PFS y GPSM-PFS son los que muestran una mayor capacidad predictiva para PFS, especialmente entre pacientes con NonAdvSM. En contrapartida, los modelos AdvSM-IPSM y GPSM-OS constituyen los más precisos a la hora de predecir la OS, tanto en el conjunto de pacientes con SM como en las formas avanzadas de la enfermedad.
8. La utilización de los modelos GPSM-PFS y AdvSM-IPSM permite una estratificación pronóstica adecuada de los pacientes con NonAdvSM y AdvSM, basada de forma exclusiva en parámetros de fácil acceso y disponibles en laboratorios de diagnóstico clínico de todo el mundo, obviando la necesidad de someter al paciente a procedimientos invasivos como el aspirado medular.

Bibliografía

1. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Diagnosis and treatment of systemic mastocytosis: state of the art. *Br J Haematol*. 2003;122(5):695-717.
2. Horny HP, Sotlar K, Valent P. Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology*. 2007;74(2):121-132.
3. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood*. 2008;112(4):946-956.
4. Arock M, Valent P. Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):497-516.
5. Valent P, Akin C, Hartmann K, et al. Advances in the Classification and Treatment of Mastocytosis: Current Status and Outlook toward the Future. *Cancer Res*. 2017;77(6):1261-1270.
6. Horny HP, Akin C, Arber D, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2016.
7. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):283-295.
8. Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *Br J Haematol*. 2014;166(4):521-528.
9. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Munoz L, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015;28(8):1138-1149.
10. Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Moller MB, Broesby-Olsen S. Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol*. 2014;89(5):493-498.
11. Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Álvarez-Twose I, et al. Diagnosis and classification of mastocytosis in non-specialized versus reference centres: a Spanish Network on Mastocytosis (REMA) study on 122 patients. *British Journal of Haematology*. 2016;172(1):56-63.
12. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017;129(11):1420-1427.
13. Horny HP, Metcalfe DD, Bennet JM, et al. Mastocytosis. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008.
14. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2013;88(7):612-624.
15. Alvarez-Twose I, Vano-Galvan S, Sanchez-Munoz L, et al. Increased serum baseline tryptase levels and extensive skin involvement are predictors for the severity of mast cell activation episodes in children with mastocytosis. *Allergy*. 2012;67(6):813-821.
16. Sangster A. An anomalous mottled rash, accompanied by pruritus, factitious urticaria and pigmentation, "urticaria pigmentosa". *Trans Med Soc Lond*. 1878(11):161-163.
17. Castells M, Metcalfe DD, Escribano L. Diagnosis and treatment of cutaneous mastocytosis in children: practical recommendations. *Am J Clin Dermatol*. 2011;12(4):259-270.
18. Hartmann K, Escribano L, Grattan C, et al. Cutaneous manifestations in patients with mastocytosis: Consensus report of the European Competence Network on Mastocytosis; the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology; and the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):35-45.
19. Wolff K, Komar M, Petzelbauer P. Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25(7):519-528.
20. Lange M, Niedoszytko M, Niedoszytko B, Lata J, Trzeciak M, Biernat W. Diffuse cutaneous mastocytosis: analysis of 10 cases and a brief review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1565-1571.
21. Matito A, Azaña JM, Torrelo A, Alvarez-Twose I. Cutaneous Mastocytosis in Adults and Children: New Classification and Prognostic Factors. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018;38(3):351-363.
22. Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25(7):603-625.

23. Diagnosis of Adult Mastocytosis: Role for Bone Marrow Analysis. *Laboratory Hematology Practice*:388-398.
24. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009;113(23):5727-5736.
25. Sperr WR, Escribano L, Jordan J-H, et al. Morphologic properties of neoplastic mast cells: delineation of stages of maturation and implication for cytological grading of mastocytosis. *Leukemia Research*. 2001;25(7):529-536.
26. Orfao A, Escribano L, Villarrubia J, et al. Flow cytometric analysis of mast cells from normal and pathological human bone marrow samples: identification and enumeration. *Am J Pathol*. 1996;149(5):1493-1499.
27. Escribano L, Garcia Montero AC, Nunez R, Orfao A. Flow cytometric analysis of normal and neoplastic mast cells: role in diagnosis and follow-up of mast cell disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):535-547.
28. Escribano L, Alvarez-Twose I, Sanchez-Munoz L, et al. Prognosis in adult indolent systemic mastocytosis: a long-term study of the Spanish Network on Mastocytosis in a series of 145 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(3):514-521.
29. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006;108(7):2366-2372.
30. Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Garcia-Montero AC, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(9):1157-1168.
31. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
32. Akin C, Scott LM, Metcalfe DD. Slowly progressive systemic mastocytosis with high mast-cell burden and no evidence of a non-mast-cell hematologic disorder: an example of a smoldering case? *Leuk Res*. 2001;25(7):635-638.
33. Hauswirth AW, Sperr WR, Ghannadan M, et al. A case of smouldering mastocytosis with peripheral blood eosinophilia and lymphadenopathy. *Leuk Res*. 2002;26(6):601-606.
34. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Metcalfe DD. Smouldering mastocytosis: a novel subtype of systemic mastocytosis with slow progression. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):137-139.
35. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(3):719-726, 726.e711-726.e714.
36. Valent P, Sperr WR, Akin C. How I treat patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2010;116(26):5812-5817.
37. Sperr WR, Horny HP, Valent P. Spectrum of associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorders occurring in patients with systemic mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;127(2):140-142.
38. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. Systemic mastocytosis with associated clonal haematological non-mast cell lineage diseases: a histopathological challenge. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):604-608.
39. Sperr WR, Horny HP, Lechner K, Valent P. Clinical and biologic diversity of leukemias occurring in patients with mastocytosis. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(5-6):473-486.
40. Wang SA, Hutchinson L, Tang G, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast cell lineage disease: clinical significance and comparison of chromosomal abnormalities in SM and AHNMD components. *Am J Hematol*. 2013;88(3):219-224.
41. Sotlar K, Colak S, Bache A, et al. Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseases associated with systemic mastocytosis (SM-AHNMD). *J Pathol*. 2010;220(5):586-595.
42. Traina F, Visconte V, Jankowska AM, et al. Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43090.

43. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122(14):2460-2466.
44. Damaj G, Joris M, Chandesris O, et al. ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS One*. 2014;9(1):85362.
45. Hanssens K, Brenet F, Agopian J, et al. SRSF2-p95 hotspot mutation is highly associated with advanced forms of mastocytosis and mutations in epigenetic regulator genes. *Haematologica*. 2014;99(5):830-835.
46. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(1):136-143.
47. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900-904.
48. Wilson TM, Maric I, Simakova O, et al. Clonal analysis of NRAS activating mutations in KIT-D816V systemic mastocytosis. *Haematologica*. 2011;96(3):459-463.
49. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2019;94(3):363-377.
50. Pardanani A, Akin C, Valent P. Pathogenesis, clinical features, and treatment advances in mastocytosis. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2006;19(3):595-615.
51. Mital A, Piskorz A, Lewandowski K, Wasag B, Limon J, Hellmann A. A case of mast cell leukaemia with exon 9 KIT mutation and good response to imatinib. *Eur J Haematol*. 2011;86(6):531-535.
52. Akin C, Fumo G, Yavuz AS, Lipsky PE, Neckers L, Metcalfe DD. A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*. 2004;103(8):3222-3225.
53. Spector MS, Iossifov I, Kritharis A, et al. Mast-cell leukemia exome sequencing reveals a mutation in the IgE mast-cell receptor beta chain and KIT V654A. *Leukemia*. 2012;26(6):1422-1425.
54. Georgin-Lavialle S, Aguilar C, Guieze R, et al. Mast cell sarcoma: a rare and aggressive entity--report of two cases and review of the literature. *J Clin Oncol*. 2013;31(6):e90-97.
55. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Dubreuil P, Chandesris MO, Hermine O, Damaj G. Mast cell leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1285-1295.
56. Valent P, Sotlar K, Sperr WR, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1691-1700.
57. Escribano L, Garcia-Montero, A. , Sanchez-Muñoz, L. , Teodosio, C. , Alvarez-Twose, I. , Jara-Acevedo, M. , Morgado, J. M., Almeida, J. and Orfao, A. . Diagnosis of Adult Mastocytosis: Role for Bone Marrow Analysis. *Laboratory Hematology Practice*; (2012):388-398.
58. Alvarez-Twose I, Matito A, Morgado JM, et al. Imatinib in systemic mastocytosis: a phase IV clinical trial in patients lacking exon 17 KIT mutations and review of the literature. *Oncotarget*. 2017;8(40):68950-68963.
59. Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Morgado JM, et al. Clinical, immunophenotypic, and molecular characteristics of well-differentiated systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(1):168-178.e161.
60. Morgado JM, Perbellini O, Johnson RC, et al. CD30 expression by bone marrow mast cells from different diagnostic variants of systemic mastocytosis. *Histopathology*. 2013;63(6):780-787.
61. de Melo Campos P, Machado-Neto JA, Scopim-Ribeiro R, et al. Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412. *Leuk Res*. 2014;38(10):1245-1251.
62. Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, et al. Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509I mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(1):178-187.
63. Weiler CR, Butterfield J. Mast cell sarcoma: clinical management. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):423-432.

64. Falletti J, Borgia L, Lalinga AV, et al. Mast cell sarcoma of the scalp: the first sign of undisclosed systemic mastocytosis? *Pathol Res Pract*. 2012;208(11):683-686.
65. Horny HP, Parwaresch MR, Kaiserling E, et al. Mast cell sarcoma of the larynx. *J Clin Pathol*. 1986;39(6):596-602.
66. Kim YS, Wu H, Pawlowska AB, et al. Pediatric mast cell sarcoma of temporal bone with novel L799F (2395 C>T) KIT mutation, mimicking histiocytic neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(3):453-458.
67. Bugalia A, Abraham A, Balasubramanian P, Srivastava A, Nair S. Mast cell sarcoma of the small intestine: a case report. *J Clin Pathol*. 2011;64(11):1035-1037.
68. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo j*. 1987;6(11):3341-3351.
69. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*. 1990;63(1):235-243.
70. Lemmon MA, Pinchasi D, Zhou M, Lax I, Schlessinger J. Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem*. 1997;272(10):6311-6317.
71. Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood*. 1995;85(3):641-649.
72. Blechman JM, Lev S, Barg J, et al. The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell*. 1995;80(1):103-113.
73. Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood*. 1994;84(2):408-414.
74. Majumder S, Brown K, Qiu FH, Besmer P. c-kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol Cell Biol*. 1988;8(11):4896-4903.
75. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res*. 2006;34(2):97-115.
76. Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L, Escribano L, Rema. Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol*. 2007;138(1):12-30.
77. Kitamura Y, Hirotab S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(23):2924-2931.
78. Spritz RA. Molecular basis of human piebaldism. *J Invest Dermatol*. 1994;103(5 Suppl):137s-140s.
79. Kitayama H, Tsujimura T, Matsumura I, et al. Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. *Blood*. 1996;88(3):995-1004.
80. Akin C, Metcalfe DD. Systemic Mastocytosis. *Annual Review of Medicine*. 2004;55(1):419-432.
81. Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, et al. KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica*. 2004;89(8):920-925.
82. Fontalba A, Real PJ, Fernandez-Luna JL, Agirre X, Prosper F, Richard C. Identification of c-Kit gene mutations in patients with polycythemia vera. *Leuk Res*. 2006;30(10):1325-1326.
83. Laine E, Chauvot de Beauchêne I, Perahia D, Auclair C, Tchertanov L. Mutation D816V Alters the Internal Structure and Dynamics of c-KIT Receptor Cytoplasmic Region: Implications for Dimerization and Activation Mechanisms. *PLOS Computational Biology*. 2011;7(6):e1002068.
84. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al. The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood*. 2002;99(5):1741-1744.
85. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, et al. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*. 1993;92(4):1736-1744.
86. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, et al. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res*. 2006;30(4):373-378.

87. Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(12):1115-1124.
88. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol.* 2003;31(8):686-692.
89. Bodemer C, Hermine O, Palmerini F, et al. Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol.* 2010;130(3):804-815.
90. Lasho T, Finke C, Zblewski D, et al. Concurrent activating KIT mutations in systemic mastocytosis. *British journal of haematology.* 2015;173.
91. Bibi S, Langenfeld F, Jeanningros S, et al. Molecular defects in mastocytosis: KIT and beyond KIT. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014;34(2):239-262.
92. Wang HJ, Lin ZM, Zhang J, Yin JH, Yang Y. A new germline mutation in KIT associated with diffuse cutaneous mastocytosis in a Chinese family. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39(2):146-149.
93. Yang Y, Létard S, Borge L, et al. Pediatric mastocytosis-associated KIT extracellular domain mutations exhibit different functional and signaling properties compared with KIT-phosphotransferase domain mutations. *Blood.* 2010;116(7):1114-1123.
94. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Suarez F, et al. Mast cell leukemia: identification of a new c-Kit mutation, dup(501-502), and response to masitinib, a c-Kit tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Haematol.* 2012;89(1):47-52.
95. Féger F, Ribadeau Dumas A, Leriche L, Valent P, Arock M. Kit and c-kit mutations in mastocytosis: a short overview with special reference to novel molecular and diagnostic concepts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(2):110-114.
96. Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, et al. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer.* 2001;92(3):657-662.
97. Nakagomi N, Hirota S. Juxtamembrane-type c-kit gene mutation found in aggressive systemic mastocytosis induces imatinib-resistant constitutive KIT activation. *Laboratory Investigation.* 2007;87(4):365-371.
98. Büttner C, Henz BM, Welker P, Sepp NT, Grabbe J. Identification of Activating c-kit Mutations in Adult-, but not in Childhood-Onset Indolent Mastocytosis: A Possible Explanation for Divergent Clinical Behavior. *Journal of Investigative Dermatology.* 1998;111(6):1227-1231.
99. Pollard WL, Beachkofsky TM, Kobayashi TT. Novel R634W c-kit mutation identified in familial mastocytosis. *Pediatr Dermatol.* 2015;32(2):267-270.
100. Wohrl S, Moritz KB, Bracher A, Fischer G, Stingl G, Loewe R. A c-kit mutation in exon 18 in familial mastocytosis. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):839-841.
101. Longley BJ, Jr., Metcalfe DD, Tharp M, et al. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1609-1614.
102. Hoffmann KM, Moser A, Lohse P, et al. Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood.* 2008;112(5):1655-1657.
103. Sotlar K, Escribano L, Landt O, et al. One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol.* 2003;162(3):737-746.
104. Yabe M, Masukawa A, Kato S, Yabe H, Nakamura N, Matsushita H. Systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia in a child: Detection of the D816A mutation of KIT. *Pediatric Blood & Cancer.* 2012;59(7):1313-1316.
105. Frederiksen JK, Shao L, Bixby DL, Ross CW. Shared clonal cytogenetic abnormalities in aberrant mast cells and leukemic myeloid blasts detected by single nucleotide polymorphism microarray-based whole-genome scanning. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(4):389-396.

106. Sotlar K, Saeger W, Stellmacher F, et al. "Occult" mastocytosis with activating c-kit point mutation evolving into systemic mastocytosis associated with plasma cell myeloma and secondary amyloidosis. *J Clin Pathol*. 2006;59(8):875-878.
107. Pullarkat VA, Bueso-Ramos C, Lai R, et al. Systemic mastocytosis with associated clonal hematological non-mast-cell lineage disease: analysis of clinicopathologic features and activating c-kit mutations. *Am J Hematol*. 2003;73(1):12-17.
108. Valent P, Blatt K, Eisenwort G, et al. FLAG-induced remission in a patient with acute mast cell leukemia (MCL) exhibiting t(7;10)(q22;q26) and KIT D816H. *Leukemia Research Reports*. 2014;3(1):8-13.
109. Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, Kaneko F. c-kit Mutations in patients with childhood-onset mastocytosis and genotype-phenotype correlation. *J Mol Diagn*. 2005;7(2):252-257.
110. Heinrich MC, Joensuu H, Demetri GD, et al. Phase II, open-label study evaluating the activity of imatinib in treating life-threatening malignancies known to be associated with imatinib-sensitive tyrosine kinases. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2717-2725.
111. Pignon JM, Giraudier S, Duquesnoy P, et al. A new c-kit mutation in a case of aggressive mast cell disease. *Br J Haematol*. 1997;96(2):374-376.
112. Arredondo AR, Gotlib J, Shier L, et al. Myelomastocytic leukemia versus mast cell leukemia versus systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukemia: a diagnostic challenge. *Am J Hematol*. 2010;85(8):600-606.
113. Baek JO, Kang HK, Na SY, et al. N822K c-kit mutation in CD30-positive cutaneous pleomorphic mastocytosis after germ cell tumour of the ovary. *Br J Dermatol*. 2012;166(6):1370-1373.
114. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*. 2005;129(3):1042-1046.
115. Ryan RJH, Akin C, Castells M, et al. Mast cell sarcoma: a rare and potentially under-recognized diagnostic entity with specific therapeutic implications. *Modern Pathology*. 2013;26(4):533-543.
116. Lanternier F, Cohen-Akenine A, Palmerini F, et al. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Mastocytosis According to the Age of Onset. *PLOS ONE*. 2008;3(4):e1906.
117. Tang X, Boxer M, Drummond A, Ogston P, Hodgins M, Burden AD. A germline mutation in *KIT* in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *Journal of Medical Genetics*. 2004;41(6):e88-e88.
118. Rocha J, Duarte M, Marques H, et al. Association of adult mastocytosis with M541L in the transmembrane domain of KIT. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2010;24:1118-1119.
119. Wasag B, Niedoszytko M, Piskorz A, et al. Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. *Exp Hematol*. 2011;39(8):859-865.e852.
120. Jawhar M, Schwaab J, Meggendorfer M, et al. The clinical and molecular diversity of mast cell leukemia with or without associated hematologic neoplasm. *Haematologica*. 2017;102(6):1035-1043.
121. Shah S, Pardananani A, Elala YC, et al. Cytogenetic abnormalities in systemic mastocytosis: WHO subcategory-specific incidence and prognostic impact among 348 informative cases. *American Journal of Hematology*. 2018;93(12):1461-1466.
122. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-3699.
123. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia*. 2017;31(9):1869-1871.
124. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, et al. Molecular profiling of myeloid progenitor cells in multi-mutated advanced systemic mastocytosis identifies KIT D816V as a distinct and late event. *Leukemia*. 2015;29(5):1115-1122.
125. Hamilton MJ. Nonclonal Mast Cell Activation Syndrome: A Growing Body of Evidence. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018;38(3):469-481.
126. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of Hpall and Hhal sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1229-1239.

127. Zink F, Stacey SN, Norddahl GL, et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood*. 2017;130(6):742-752.
128. Sima J, Gilbert DM. Complex correlations: replication timing and mutational landscapes during cancer and genome evolution. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;25:93-100.
129. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-1558.
130. Schroeder T. Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):203-207.
131. Forsberg LA, Rasi C, Malmqvist N, et al. Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer. *Nat Genet*. 2014;46(6):624-628.
132. Pierre RV, Hoagland HC. Age-associated aneuploidy: Loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. *Cancer*. 1972;30(4):889-894.
133. Klein AM, Simons BD. Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissues. *Development*. 2011;138(15):3103-3111.
134. Hall J, Al Hafidh J, Balmert E, et al. Somatic Mutations Indicative of Clonal Hematopoiesis Are Present in a Large Fraction of Cytopenic Patients Who Lack Diagnostic Evidence of MDS. *Blood*. 2014;124(21):3272-3272.
135. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498.
136. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(26):2477-2487.
137. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328-333.
138. Lichtman MA. Clonal hematopoiesis: a "CHIP" off the old block. *Blood*. 2015;126(1):1-2.
139. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126(1):9-16.
140. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet*. 2012;44(6):651-658.
141. Laurie CC, Laurie CA, Rice K, et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. *Nat Genet*. 2012;44(6):642-650.
142. Shlush LI. Age-related clonal hematopoiesis. *Blood*. 2018;131(5):496-504.
143. Valent P, Akin C, Arock M, et al. Proposed Terminology and Classification of Pre-Malignant Neoplastic Conditions: A Consensus Proposal. *EBioMedicine*. 2017;26:17-24.
144. Valent P, Kern W, Hoermann G, et al. Clonal Hematopoiesis with Oncogenic Potential (CHOP): Separation from CHIP and Roads to AML. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
145. Seita J, Ema H, Ooehara J, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2349-2354.
146. Chotinantakul K, Leeanansaksiri W. Hematopoietic stem cell development, niches, and signaling pathways. *Bone Marrow Res*. 2012;2012:270425.
147. Clements WK, Traver D. Signalling pathways that control vertebrate haematopoietic stem cell specification. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(5):336-348.
148. Valent P, Horny HP. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(7):548-553.
149. Valent P, Bain BJ, Bennett JM, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. *Leuk Res*. 2012;36(1):1-5.
150. Kwok B, Hall JM, Witte JS, et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. *Blood*. 2015;126(21):2355-2361.
151. Valent P, Jäger E, Mitterbauer-Hohendanner G, et al. Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):531-541.

152. Yavuz AS, Lipsky PE, Yavuz S, Metcalfe DD, Akin C. Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood*. 2002;100(2):661-665.
153. Akin C. Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta haematologica*. 2005;114(1):61-69.
154. Taylor ML, Sehgal D, Raffeld M, et al. Demonstration that mast cells, T cells, and B cells bearing the activating kit mutation D816V occur in clusters within the marrow of patients with mastocytosis. *J Mol Diagn*. 2004;6(4):335-342.
155. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. KIT D816V-mutated bone marrow mesenchymal stem cells in indolent systemic mastocytosis are associated with disease progression. *Blood*. 2016;127(6):761-768.
156. Jawhar M, Schwaab J, Alvarez-Twose I, et al. MARS: Mutation-Adjusted Risk Score for Advanced Systemic Mastocytosis. *J Clin Oncol*. 2019;37(31):2846-2856.
157. Sperr WR, Kundi M, Alvarez-Twose I, et al. International prognostic scoring system for mastocytosis (IPSM): a retrospective cohort study. *Lancet Haematol*. 2019;6(12):e638-e649.
158. Alvarez-Twose I, Zanotti R, Gonzalez-de-Olano D, et al. Nonaggressive systemic mastocytosis (SM) without skin lesions associated with insect-induced anaphylaxis shows unique features versus other indolent SM. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(2):520-528.
159. Pardanani A, Shah S, Mannelli F, et al. Mayo alliance prognostic system for mastocytosis: clinical and hybrid clinical-molecular models. *Blood Advances*. 2018;2(21):2964-2972.
160. Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy*. 2008;63(2):226-232.
161. Bonadonna P, Perbellini O, Passalacqua G, et al. Clonal mast cell disorders in patients with systemic reactions to Hymenoptera stings and increased serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(3):680-686.
162. Zanotti R, Bonadonna P, Bonifacio M, et al. Isolated bone marrow mastocytosis: an underestimated subvariant of indolent systemic mastocytosis. *Haematologica*. 2011;96(3):482-484.
163. Gonzalez de Olano D, de la Hoz Caballer B, Nunez Lopez R, et al. Prevalence of allergy and anaphylactic symptoms in 210 adult and pediatric patients with mastocytosis in Spain: a study of the Spanish network on mastocytosis (REMA). *Clin Exp Allergy*. 2007;37(10):1547-1555.
164. Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res*. 2003;27(7):635-641.
165. Metcalfe DD. The liver, spleen, and lymph nodes in mastocytosis. *J Invest Dermatol*. 1991;96(3 Suppl):45S-46S; discussion 46S, 60S-65S.
166. Mican JM, Di Bisceglie AM, Fong TL, et al. Hepatic involvement in mastocytosis: clinicopathologic correlations in 41 cases. *Hepatology*. 1995;22(4 Pt 1):1163-1170.
167. Jawhar M, Schwaab J, Hausmann D, et al. Splenomegaly, elevated alkaline phosphatase and mutations in the SRSF2/ASXL1/RUNX1 gene panel are strong adverse prognostic markers in patients with systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2016;30(12):2342-2350.
168. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-5032.
169. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med*. 2016;9:229-255.
170. Peters Jr T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications: Academic press; 1995.
171. Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 2005;57(12):787-796.
172. Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, et al. All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPbeta-LIP. *Biochem J*. 2006;397(2):345-353.

173. Muchtar E, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Elevation of serum lactate dehydrogenase in AL amyloidosis reflects tissue damage and is an adverse prognostic marker in patients not eligible for stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2017;178(6):888-895.
174. Eventoff W, Rossmann MG, Taylor SS, et al. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(7):2677-2681.
175. Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstöcker M, et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*. 2005;19(12):2223-2231.
176. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers*. 2015;2015:635670.
177. Lawrence JB, Friedman BS, Travis WD, Chinchilli VM, Metcalfe DD, Gralnick HR. Hematologic manifestations of systemic mast cell disease: a prospective study of laboratory and morphologic features and their relation to prognosis. *Am J Med*. 1991;91(6):612-624.
178. Kuo T-R, Chen C-H. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomarker Research*. 2017;5(1):18.
179. Fink HA, Litwack-Harrison S, Taylor BC, et al. Clinical utility of routine laboratory testing to identify possible secondary causes in older men with osteoporosis: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. *Osteoporos Int*. 2016;27(1):331-338.
180. Pardani A, Lasho TL, Reichard KK, Hanson CA, Tefferi A. World Health Organization class-independent risk categorization in mastocytosis. *Blood Cancer Journal*. 2019;9(3):29.
181. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*. 1987;316(26):1622-1626.
182. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol*. 2007;95:167-255.
183. Johnson PR, Ammit AJ, Carlin SM, Armour CL, Caughey GH, Black JL. Mast cell tryptase potentiates histamine-induced contraction in human sensitized bronchus. *Eur Respir J*. 1997;10(1):38-43.
184. Caughey GH, Leidig F, Viro NF, Nadel JA. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244(1):133-137.
185. Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3(1):27-32.
186. Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Kido H. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(12):1509-1517.
187. Akers IA, Parsons M, Hill MR, et al. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000;278(1):L193-L201.
188. Walls AF, He S, Teran LM, et al. Granulocyte recruitment by human mast cell tryptase. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107(1-3):372-373.
189. He S, Peng Q, Walls AF. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol*. 1997;159(12):6216-6225.
190. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol*. 2014;122:211-252.
191. Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2691-2700.
192. Piliponsky AM, Chen CC, Nishimura T, et al. Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat Med*. 2008;14(4):392-398.
193. Schwartz LB, Sakai K, Bradford TR, et al. The alpha form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2702-2710.

194. Sperr WR, Jordan JH, Fiegl M, et al. Serum tryptase levels in patients with mastocytosis: correlation with mast cell burden and implication for defining the category of disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;128(2):136-141.
195. Savini P, Rondoni M, Poletti G, et al. Serum total tryptase level confirms itself as a more reliable marker of mast cells burden in mast cell leukaemia (aleukaemic variant). *Case Rep Hematol*. 2015;2015:737302.
196. Schwartz LB. Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):451-463.
197. Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol*. 1987;138(7):2184-2189.
198. Güssow D, Rein R, Ginjaar I, et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. *The Journal of Immunology*. 1987;139(9):3132-3138.
199. Cunningham BA, Wang JL, Berggard I, Peterson PA. Complete amino acid sequence of β 2-microglobulin. *Biochemistry*. 1973;12(24):4811-4822.
200. Yoo C, Yoon DH, Suh C. Serum beta-2 microglobulin in malignant lymphomas: an old but powerful prognostic factor. *Blood Res*. 2014;49(3):148-153.
201. Wu L, Wang T, Gui W, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Oncology*. 2014;87(1):40-47.
202. Seo S, Hong JY, Yoon S, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Oncotarget*. 2016;7(47):76934-76943.
203. Yoo C, Yoon DH, Kim S, et al. Serum beta-2 microglobulin as a prognostic biomarker in patients with mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2016;34(1):22-27.
204. Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J*. 1997;321 (Pt 2)(Pt 2):265-279.
205. Pardanani AD, Lasho TL, Finke C, et al. ASXL1 and CBL mutations are independently predictive of inferior survival in advanced systemic mastocytosis. *British Journal of Haematology*. 2016;175(3):534-536.
206. Kristensen T, Vestergaard H, Moller MB. Improved detection of the KIT D816V mutation in patients with systemic mastocytosis using a quantitative and highly sensitive real-time qPCR assay. *J Mol Diagn*. 2011;13(2):180-188.
207. Hoermann G, Gleixner KV, Dinu GE, et al. The KIT D816V allele burden predicts survival in patients with mastocytosis and correlates with the WHO type of the disease. *Allergy*. 2014;69(6):810-813.
208. Lennartsson J, Ronnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1619-1649.
209. Teodosio C, Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, et al. Gene expression profile of highly purified bone marrow mast cells in systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(4):1213-1224, 1224.e1211-1214.
210. Haenisch B, Frohlich H, Herms S, Molderings GJ. Evidence for contribution of epigenetic mechanisms in the pathogenesis of systemic mast cell activation disease. *Immunogenetics*. 2014;66(5):287-297.
211. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28(3):497-506.
212. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(9):599-612.
213. Soucie E, Hanssens K, Mercher T, et al. In aggressive forms of mastocytosis, TET2 loss cooperates with c-KITD816V to transform mast cells. *Blood*. 2012;120(24):4846-4849.
214. Pardanani A, Lasho T, Elala Y, et al. Next-generation sequencing in systemic mastocytosis: Derivation of a mutation-augmented clinical prognostic model for survival. *Am J Hematol*. 2016;91(9):888-893.
215. Naumann N, Jawhar M, Schwaab J, et al. Incidence and prognostic impact of cytogenetic aberrations in patients with systemic mastocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(5):252-259.

216. Visconte V, Makishima H, Maciejewski JP, Tiu RV. Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia*. 2012;26(12):2447-2454.
217. Bejar R. Splicing Factor Mutations in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;907:215-228.
218. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(1):5-19.
219. Fu XD. Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature*. 1993;365(6441):82-85.
220. Edmond V, Moysan E, Khochbin S, et al. Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. *Embo j*. 2011;30(3):510-523.
221. Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012;120(15):3080-3088.
222. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.
223. Kar SA, Jankowska A, Makishima H, et al. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(1):107-113.
224. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3376-3382.
225. Thol F, Kade S, Schlarman C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578-3584.
226. Mian SA, Smith AE, Kulasekararaj AG, et al. Spliceosome mutations exhibit specific associations with epigenetic modifiers and proto-oncogenes mutated in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2013;98(7):1058-1066.
227. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
228. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):13-27.
229. Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(4):241-263.
230. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-1133.
231. Tan L, Shi YG. Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development*. 2012;139(11):1895-1902.
232. Holmfeldt L, Mullighan CG. The role of TET2 in hematologic neoplasms. *Cancer Cell*. 2011;20(1):1-2.
233. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
234. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood*. 2011;118(14):3932-3941.
235. Damaj G, Joris M, Chandesris O, et al. ASXL1 but not TET2 mutations adversely impact overall survival of patients suffering systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell diseases. *PLoS One*. 2014;9(1):e85362.
236. Katoh M. Functional and cancer genomics of ASXL family members. *Br J Cancer*. 2013;109(2):299-306.
237. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(6):788-800.
238. Carubbia N, Murati A, Trouplin V, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009;23(11):2183-2186.

239. Trivai I, Zeschke S, Rentel J, et al. ASXL1/EZH2 mutations promote clonal expansion of neoplastic HSC and impair erythropoiesis in PMF. *Leukemia*. 2019;33(1):99-109.
240. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010;24(6):1128-1138.
241. Jia Y, Li P, Fang L, et al. Negative regulation of DNMT3A de novo DNA methylation by frequently overexpressed UHRF family proteins as a mechanism for widespread DNA hypomethylation in cancer. *Cell Discovery*. 2016;2:16007.
242. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-1158.
243. Tie R, Zhang T, Fu H, et al. Association between DNMT3A mutations and prognosis of adults with de novo acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(6):e93353.
244. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(7):1723-1735.
245. Chase A, Cross NCP. Aberrations of *EZH2* in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(9):2613-2618.
246. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010;42(2):181-185.
247. Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42(8):665-667.
248. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-726.
249. Latchman DS. Transcription-Factor Mutations and Disease. *New England Journal of Medicine*. 1996;334(1):28-33.
250. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, et al. The Human Transcription Factors. *Cell*. 2018;172(4):650-665.
251. Stieglitz E, Loh M. Genetic predispositions to childhood leukemia. *Therapeutic advances in hematology*. 2013;4:270-290.
252. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, et al. AML1/Runx1 Negatively Regulates Quiescent Hematopoietic Stem Cells in Adult Hematopoiesis. *The Journal of Immunology*. 2008;180(7):4402-4408.
253. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1364-1372.
254. Ding Y, Harada Y, Imagawa J, Kimura A, Harada H. *AML1/RUNX1* point mutation possibly promotes leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114(25):5201-5205.
255. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2010;115(14):2891-2900.
256. Jawhar M, Schwaab J, Naumann N, et al. Response and progression on midostaurin in advanced systemic mastocytosis: KIT D816V and other molecular markers. *Blood*. 2017;130(2):137-145.
257. Pardanani A, Lasho T, Barraco D, Patnaik M, Elala Y, Tefferi A. Next generation sequencing of myeloid neoplasms with eosinophilia harboring the FIP1L1-PDGFR α mutation. *Am J Hematol*. 2016;91(3):10-11.
258. Kales SC, Ryan PE, Nau MM, Lipkowitz S. Cbl and human myeloid neoplasms: the Cbl oncogene comes of age. *Cancer Res*. 2010;70(12):4789-4794.
259. Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood*. 2007;110(3):1004-1012.
260. Caligiuri MA, Briesewitz R, Yu J, et al. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(3):1022-1024.

261. Reindl C, Quentmeier H, Petropoulos K, et al. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009;15(7):2238-2247.
262. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(24):6182-6192.
263. Makishima H, Cazzolli H, Szpurka H, et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6109-6116.
264. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2020.
265. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS rapidly and efficiently induces CMML- and AML-like diseases in mice. *Blood*. 2006;108(7):2349-2357.
266. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2457-2467.
267. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, et al. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2006;38(3):331-336.
268. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, et al. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet*. 2006;38(3):294-296.
269. Chiosea SI, Sherer CK, Jelic T, Dacic S. KRAS mutant allele-specific imbalance in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2011;24(12):1571-1577.
270. Krasinskas AM, Moser AJ, Saka B, Adsay NV, Chiosea SI. KRAS mutant allele-specific imbalance is associated with worse prognosis in pancreatic cancer and progression to undifferentiated carcinoma of the pancreas. *Mod Pathol*. 2013;26(10):1346-1354.
271. Chang YY, Lin JK, Lin TC, et al. Impact of KRAS mutation on outcome of patients with metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2014;61(135):1946-1953.
272. Alvarez-Twose I, Matito A, Sánchez-Muñoz L, Morgado JM, Escribano L. Management of adult mastocytosis. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2014;2(4):321-336.
273. Caballer B, González de Olano D, Alvarez Towse I, et al. Guías clínicas para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las mastocitosis. *Anales del sistema sanitario de Navarra, ISSN 1137-6627, Vol 31, Nº 1, 2008, pags 11-32*. 2008;31.
274. Matito A, Alvarez-Twose I, Morgado JM, Sanchez-Munoz L, Orfao A, Escribano L. Anaphylaxis as a clinical manifestation of clonal mast cell disorders. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014;14(8):450.
275. Dewachter P, Castells MC, Hepner DL, Mouton-Favre C. Perioperative management of patients with mastocytosis. *Anesthesiology*. 2014;120(3):753-759.
276. Roberts LJ, 2nd, Turk JW, Oates JA. Shock syndrome associated with mastocytosis: pharmacologic reversal of the acute episode and therapeutic prevention of recurrent attacks. *Adv Shock Res*. 1982;8:145-152.
277. Lorcerie B, Arveux I, Chauffert B, Dalac S, Lambert D, Martin F. Aspirin and systemic mastocytosis. *Lancet*. 1989;2(8672):1155.
278. Butterfield JH, Weiler CR. Prevention of mast cell activation disorder-associated clinical sequelae of excessive prostaglandin D(2) production. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147(4):338-343.
279. Moreno-Borque R, Matito A, Alvarez-Twose I, et al. Response to celecoxib in a patient with indolent systemic mastocytosis presenting with intractable diarrhea. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015;115(5):456-457.
280. Escribano L, Akin C, Castells M, Schwartz LB. Current options in the treatment of mast cell mediator-related symptoms in mastocytosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006;5(1):61-77.
281. Vieira Dos Santos R, Magerl M, Martus P, et al. Topical sodium cromoglicate relieves allergen- and histamine-induced dermal pruritus. *Br J Dermatol*. 2010;162(3):674-676.
282. Edwards AM, Capkova S. Oral and topical sodium cromoglicate in the treatment of diffuse cutaneous mastocytosis in an infant. *BMJ Case Rep*. 2011;2011.

283. Carter MC, Robyn JA, Bressler PB, Walker JC, Shapiro GG, Metcalfe DD. Omalizumab for the treatment of unprovoked anaphylaxis in patients with systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(6):1550-1551.
284. Siebenhaar F, Kuhn W, Zuberbier T, Maurer M. Successful treatment of cutaneous mastocytosis and Meniere disease with anti-IgE therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(1):213-215.
285. Douglass JA, Carroll K, Voskamp A, Bourke P, Wei A, O'Hehir RE. Omalizumab is effective in treating systemic mastocytosis in a nonatopic patient. *Allergy*. 2010;65(7):926-927.
286. Bell MC, Jackson DJ. Prevention of anaphylaxis related to mast cell activation syndrome with omalizumab. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;108(5):383-384.
287. Jagdis A, Vadas P. Omalizumab effectively prevents recurrent refractory anaphylaxis in a patient with monoclonal mast cell activation syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;113(1):115-116.
288. Smith ML, Orton PW, Chu H, Weston WL. Photochemotherapy of dominant, diffuse, cutaneous mastocytosis. *Pediatr Dermatol*. 1990;7(4):251-255.
289. Escribano L, García-Belmonte D, Hernández-González A, et al. Successful management of a case of diffuse cutaneous mastocytosis with recurrent anaphylactoid episodes and hypertension. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004;113(2):S335.
290. Gonzalez-de-Olano D, Alvarez-Twose I, Vega A, Orfao A, Escribano L. Venom immunotherapy in patients with mastocytosis and hymenoptera venom anaphylaxis. *Immunotherapy*. 2011;3(5):637-651.
291. Bonadonna P, Gonzalez-de-Olano D, Zanotti R, et al. Venom immunotherapy in patients with clonal mast cell disorders: efficacy, safety, and practical considerations. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2013;1(5):474-478.
292. Bonadonna P, Zanotti R, Muller U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):347-353.
293. Siebenhaar F, Akin C, Bindslev-Jensen C, Maurer M, Broesby-Olsen S. Treatment strategies in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):433-447.
294. Barete S, Lortholary O, Damaj G, et al. Long-term efficacy and safety of cladribine (2-CdA) in adult patients with mastocytosis. *Blood*. 2015;126(8):1009-1016; quiz 1050.
295. Van Den Neste E, Delannoy A, Feremans W, Ferrant A, Michaux L. Second primary tumors and immune phenomena after fludarabine or 2-chloro-2'-deoxyadenosine treatment. *Leuk Lymphoma*. 2001;40(5-6):541-550.
296. Ustun C, Corless CL, Savage N, et al. Chemotherapy and dasatinib induce long-term hematologic and molecular remission in systemic mastocytosis with acute myeloid leukemia with KIT D816V. *Leuk Res*. 2009;33(5):735-741.
297. Akin C, Sabato V, Gotlib J, et al. Pioneer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Study of Avapritinib in Patients with Indolent or Smoldering Systemic Mastocytosis with Symptoms Inadequately Controlled with Standard Therapy. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):2950-2950.
298. Gotlib JR, Radia D, DeAngelo DJ, et al. Avapritinib, a Potent and Selective Inhibitor of KIT D816V, Improves Symptoms of Advanced Systemic Mastocytosis (AdvSM): Analyses of Patient Reported Outcomes (PROs) from the Phase 1 (EXPLORER) Study Using the (AdvSM) Symptom Assessment Form (AdvSM-SAF), a New PRO Questionnaire for (AdvSM). *Blood*. 2018;132(Supplement 1):351-351.
299. Ma HB, Xu X, Liu WP, Chang H, Zeng F, Wang YC. Successful treatment of mast cell sarcoma of the uterus with imatinib. *Int J Hematol*. 2011;94(5):491-494.
300. Agarwala MK, George R, Mathews V, Balasubramanian P, Thomas M, Nair S. Role of imatinib in the treatment of pediatric onset indolent systemic mastocytosis: a case report. *J Dermatolog Treat*. 2013;24(6):481-483.
301. Hochhaus A, Baccarani M, Giles FJ, et al. Nilotinib in patients with systemic mastocytosis: analysis of the phase 2, open-label, single-arm nilotinib registration study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(11):2047-2060.

302. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, et al. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res*. 2008;14(12):3906-3915.
303. Paul C, Sans B, Suarez F, et al. Masitinib for the treatment of systemic and cutaneous mastocytosis with handicap: a phase 2a study. *Am J Hematol*. 2010;85(12):921-925.
304. Lortholary O, Chandesris MO, Bulai Livideanu C, et al. Masitinib for treatment of severely symptomatic indolent systemic mastocytosis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2017;389(10069):612-620.
305. Schneeweiss M, Peter B, Bibi S, et al. The KIT and PDGFRA switch-control inhibitor DCC-2618 blocks growth and survival of multiple neoplastic cell types in advanced mastocytosis. *Haematologica*. 2018;103(5):799-809.
306. Gotlib J, Kluijn-Nelemans HC, George TI, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(26):2530-2541.
307. Kluijn-Nelemans HC, George TI, Akin C, et al. Durable Responses and Improved Quality Of Life With Midostaurin (PKC412) In Advanced Systemic Mastocytosis (SM): Updated Stage 1 Results Of The Global D2201 Trial. *Blood*. 2013;122(21):106-106.
308. Chandesris MO, Damaj G, Canioni D, et al. Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016;374(26):2605-2607.
309. Lübke J, Naumann N, Kluger S, et al. Inhibitory effects of midostaurin and avapritinib on myeloid progenitors derived from patients with KIT D816V positive advanced systemic mastocytosis. *Leukemia*. 2019;33(5):1195-1205.
310. Jason Gotlib DHR, Tracy I. George, William A. Robinson, Albert T. Quiery, Jr., Mark W. Drummond, Prithviraj Bose, Elizabeth O. Hexner, Elliott Winton, Hans-Peter Horny, Meera Tugnait, Oleg Schmidt-Kittler, Erica K. Evans, Hui-Min Lin, Brenton G. Mar, Michael W. Deininger, Daniel J. DeAngelo Avapritinib induces responses in patients (pts) with advanced systemic mastocytosis (AdvSM), regardless of prior Midostaurin therapy. *European Hematology Association*. 2020.
311. Jabbour E, O'Brien S, Ravandi F, Kantarjian H. Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015;125(26):4010-4016.
312. Valent P, Cerny-Reiterer S, Herrmann H, et al. Phenotypic heterogeneity, novel diagnostic markers, and target expression profiles in normal and neoplastic human mast cells. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010;23(3):369-378.
313. van Anrooij B, Kluijn PM, Oude Elberink JN, Kluijn-Nelemans JC. CD30 in systemic mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):341-355.
314. Hoermann G, Blatt K, Greiner G, et al. CD52 is a molecular target in advanced systemic mastocytosis. *Faseb j*. 2014;28(8):3540-3551.
315. Krauth MT, Bohm A, Agis H, et al. Effects of the CD33-targeted drug gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) on growth and mediator secretion in human mast cells and blood basophils. *Exp Hematol*. 2007;35(1):108-116.
316. Teodosio C, Mayado A, Sánchez-Muñoz L, et al. The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *J Leukoc Biol*. 2015;97(1):49-59.
317. Blatt K, Cerny-Reiterer S, Schwaab J, et al. Identification of the Ki-1 antigen (CD30) as a novel therapeutic target in systemic mastocytosis. *Blood*. 2015;126(26):2832-2841.
318. Gotlib J, Baird JH, George TI, et al. A phase 2 study of brentuximab vedotin in patients with CD30-positive advanced systemic mastocytosis. *Blood Adv*. 2019;3(15):2264-2271.
319. Quintás-Cardama A, Amin HM, Kantarjian H, Verstovsek S. Treatment of aggressive systemic mastocytosis with daclizumab. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(3):540-542.
320. Alvarez-Twose I, Martínez-Barranco P, Gotlib J, et al. Complete response to gemtuzumab ozogamicin in a patient with refractory mast cell leukemia. *Leukemia*. 2016;30(8):1753-1756.
321. De Vita S, Schneider RK, Garcia M, et al. Loss of Function of TET2 Cooperates with Constitutively Active KIT in Murine and Human Models of Mastocytosis. *PLoS One*. 2014;9(5):96209.
322. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.

323. Broesby-Olsen S, Kristensen TK, Møller MB, Bindslev-Jensen C, Vestergaard H. Adult-onset systemic mastocytosis in monozygotic twins with KIT D816V and JAK2 V617F mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(3):806-808.
324. Ley TJ, Miller C, Ding L, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(22):2059-2074.
325. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214-218.
326. Akin C, Kirshenbaum AS, Semere T, Worobec AS, Scott LM, Metcalfe DD. Analysis of the surface expression of c-kit and occurrence of the c-kit Asp816Val activating mutation in T cells, B cells, and myelomonocytic cells in patients with mastocytosis. *Exp Hematol.* 2000;28(2):140-147.
327. Zhang J, Walsh MF, Wu G, et al. Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(24):2336-2346.
328. Walsh M, Wu G, Edmonson M, et al. Incidence of Germline Mutations in Cancer-Predisposition Genes in Children with Hematologic Malignancies: a Report from the Pediatric Cancer Genome Project. *Blood.* 2014;124(21):127-127.
329. Furutani E, Shimamura A. Germline Genetic Predisposition to Hematologic Malignancy. *J Clin Oncol.* 2017;35(9):1018-1028.
330. Kohlmann W, Schiffman JD. Discussing and managing hematologic germ line variants. *Blood.* 2016;128(21):2497-2503.
331. Marquez R, Hantel A, Lorenz R, et al. A new family with a germline ANKRD26 mutation and predisposition to myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(12):2945-2946.
332. Sellick GS, Spendlove HE, Catovsky D, Pritchard-Jones K, Houlston RS. Further evidence that germline CEBPA mutations cause dominant inheritance of acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2005;19(7):1276-1278.
333. Lewinsohn M, Brown AL, Weinell LM, et al. Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood.* 2016;127(8):1017-1023.
334. Poggi M, Canault M, Favier M, et al. Germline variants in ETV6 underlie reduced platelet formation, platelet dysfunction and increased levels of circulating CD34+ progenitors. *Haematologica.* 2017;102(2):282-294.
335. Al Seraihi AF, Rio-Machin A, Tawana K, et al. GATA2 monoallelic expression underlies reduced penetrance in inherited GATA2-mutated MDS/AML. *Leukemia.* 2018;32(11):2502-2507.
336. Jeffries L, Shima H, Ji W, et al. A novel SAMD9 mutation causing MIRAGE syndrome: An expansion and review of phenotype, dysmorphology, and natural history. *Am J Med Genet A.* 2018;176(2):415-420.
337. Tesi B, Davidsson J, Voss M, et al. Cytopenia, Predisposition to Myelodysplastic Syndrome, Immunodeficiency, and Neurological Disease Caused By Gain-of-Function SAMD9L Mutations Is Frequently Ameliorated By Hematopoietic Revertant Mosaicism. *Blood.* 2016;128(22):4299-4299.
338. Huang KL, Mashl RJ, Wu Y, et al. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell.* 2018;173(2):355-370.e314.
339. Baliakas P, Tesi B, Wartiovaara-Kautto U, et al. Nordic Guidelines for Germline Predisposition to Myeloid Neoplasms in Adults: Recommendations for Genetic Diagnosis, Clinical Management and Follow-up. *HemaSphere.* 2019;3(6):e321.
340. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-2390.
341. Mason CC, Khorashad JS, Tantravahi SK, et al. Age-related mutations and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* 2016;30(4):906-913.
342. Hirsch CM, Przychodzen BP, Radivoyevitch T, et al. Molecular features of early onset adult myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2017;102(6):1028-1034.
343. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2013;27(9):1861-1869.
344. Munoz-Gonzalez JI, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, et al. Impact of somatic and germline mutations on the outcome of systemic mastocytosis. *Blood Adv.* 2018;2(21):2814-2828.

345. Kanemasa Y, Shimoyama T, Sasaki Y, et al. Beta-2 microglobulin as a significant prognostic factor and a new risk model for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematological Oncology*. 2017;35(4):440-446.
346. Nomura T, Huang WC, Zhau HE, Josson S, Mimata H, Chung LW. β 2-Microglobulin-mediated signaling as a target for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014;14(3):343-352.
347. Munoz-Gonzalez JI, Alvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, et al. Frequency and prognostic impact of KIT and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis. *Blood*. 2019;134(5):456-468.
348. Zhang L, Vijg J. Somatic Mutagenesis in Mammals and Its Implications for Human Disease and Aging. *Annual Review of Genetics*. 2018;52(1):397-419.
349. Andersohn F, Konzen C, Garbe E. Systematic review: agranulocytosis induced by nonchemotherapy drugs. *Ann Intern Med*. 2007;146(9):657-665.

Ilustración de cubierta

Carolina Pontes Geraz Caldas

“Interpretación gráfica del mastocito y liberación de sus gránulos”

Salamanca, octubre 2020