



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Modulación de la respuesta del sistema inmune en mastocitosis
sistémica: papel del micromedioambiente celular y potencial
asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad**

Alba Pérez Pons

Directores:

Prof. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale

Dra. Andrea Mayado Colino

Tesis doctoral

Salamanca, 2024

La presente tesis doctoral incluye dos trabajos originales publicados en revistas científicas indexadas en el Science Citation Reports (Web of Science), y un trabajo original también sometido a revisión en una revista científica indexada en el Science Citation Reports, según se detalla a continuación:

1. Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients.

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4}, María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5}, Ana Henriques^{4,6}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4}, Iván Álvarez-Twose^{2,4,6}, Carlos E. Pedreira⁷, Laura Sánchez-Muñoz^{4,6}, Daniela Damasceno^{1,2,3}, Carolina Caldas^{1,2,3,4}, Javier I. Muñoz-González^{2,4,6}, Almudena Matito^{4,6}, Juan Flores-Montero^{1,2,3}, Oscar González-López^{1,2,3,4}, Ignacio Criado^{1,2,3}, Andrea Mayado^{*1,2,3,4}, Alberto Orfao^{*1,2,3,4}

* AM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor.

Clin Transl Allergy, 14 de junio de 2022; 12(6): e12167. doi:10.1002/clin.12167
Factor de impacto: 4,4 (Q2)

2. T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: Association with disease features.

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4}, Cristina Teodosio^{1,2,3}, María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5}, Ana Henriques^{4,6}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4}, Iván Álvarez-Twose^{2,4,6}, Quentin Lecrevisse^{1,2,3}, Rafael Fluxa⁸, Laura Sánchez-Muñoz^{4,6}, Carolina Caldas^{1,2,3,4}, Julio Pozo^{1,2,3}, Silvia Martín^{1,2,3}, Teresa Contreras-Sanfeliciano⁹, Carlos E. Pedreira⁷, Vitor Botofago¹⁰, Oscar González-López^{1,3,4}, Andrea Mayado^{*1,2,3,4}, Alberto Orfao^{*1,2,3,4}

* AM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y todos ellos deben considerarse como último autor.

Allergy. 1 de febrero de 2024; publicado online. doi: 10.1111/all.16043.
Factor de impacto: 12,6 (Q1)

3. Altered B-cell, plasma cell and antibody immune profiles in blood of systemic mastocytosis.

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4}, Ana Henriques^{4,6}, Teresa Contreras-Sanfeliciano⁹, María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4}, Iván Álvarez-Twose^{2,4,5}, Quentin Lecrevisse^{1,2,3}, Rafael Fluxa⁸, Laura Sánchez-Muñoz^{4,6}, Carolina Caldas^{1,2,3,4}, Julio Pozo^{1,2,3}, Óscar González-López^{1,3,4}, Martín Pérez-Andrés^{1,2,3}, Andrea Mayado^{*1,2,3}, Alberto Orfao^{*1,2,3}

Journal of allergy and clinical immunology. Manuscrito enviado.
Factor de impacto: 11,4 (Q1)

¹Centro de Investigación del Cáncer Cancer (IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC); Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

³Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España

⁴Red Española de MAstocitosis (REMA), Toledo y Salamanca, España.

⁵Servicio de Secuenciación (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, España.

⁷Departamento de Sistemas y Computación (PESC), COPPE, Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), Río de Janeiro, Brazil.

⁸Cytognos SL, Salamanca, España.

⁹Departamento de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

¹⁰Departamento de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, España.

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

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Alba Pérez Pons y titulado “MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE EN MASTOCITOSIS SISTÉMICA: PAPEL DEL MICROMEDIOAMBIENTE CELULAR Y POTENCIAL ASOCIACIÓN CON LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 25 de junio de 2024.

Fdo. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale

D. Andrea Mayado Colino, Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

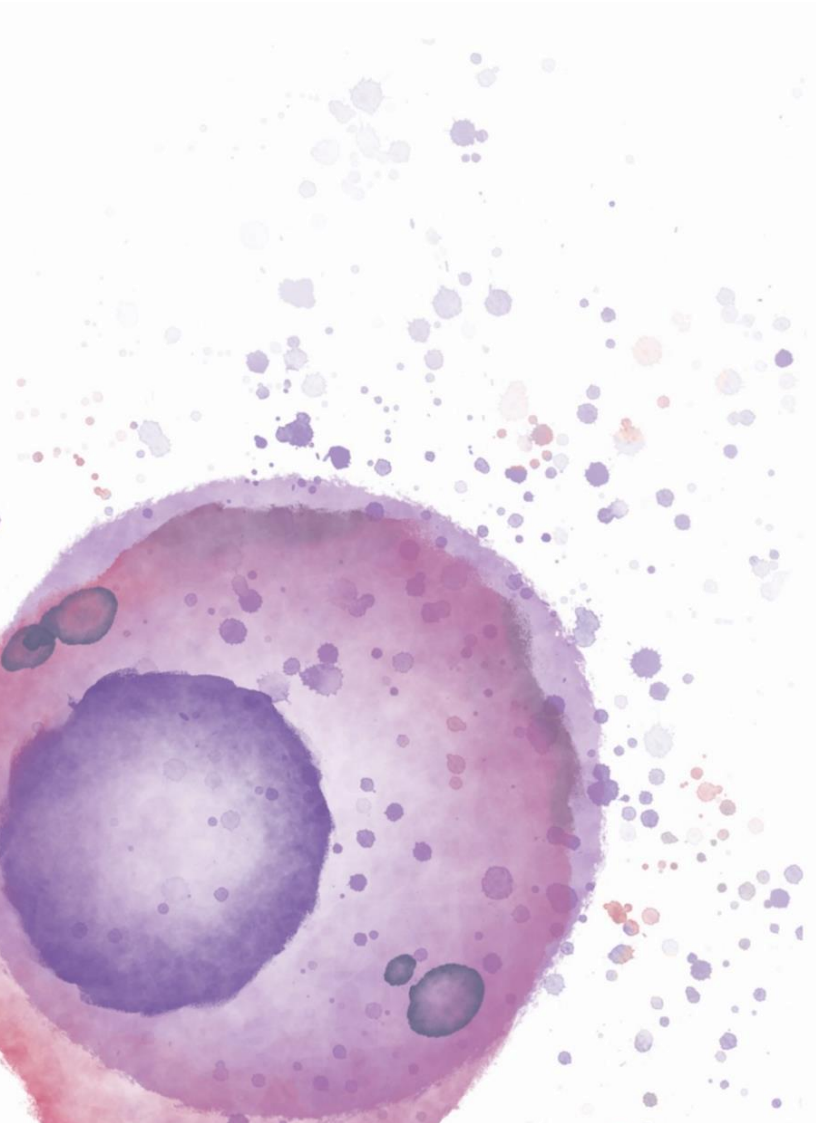
Que el trabajo de tesis doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Alba Pérez Pons y titulado “MODULACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE EN MASTOCITOSIS SISTÉMICA: PAPEL DEL MICROMEDIOAMBIENTE CELULAR Y POTENCIAL ASOCIACIÓN CON LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por el programa “Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional” de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste firmo la presente certificación en Salamanca a 25 de junio de 2024.

Fdo. Andrea Mayado Colino

A mis padres.
A mis hermanos.
A Miguel.

Glosario de abreviaturas



A

Ag: antígeno.

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

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ASM: mastocitosis sistémica agresiva (del inglés, “aggressive systemic mastocytosis”).

ATP: adenosina trifosfato.

B

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

C

CBA: del inglés, “Cytometric Bead Array”.

CCL: quimioquina de tipo C-C ligando.

CM: memoria central (del inglés, “central memory”).

cMo: monocito clásico (del inglés, “classical monocyte”).

CRH: hormona liberadora de la corticotropina (del inglés, “corticotropin-releasing hormone”).

CXCL: quimiocina tipo C-X-C ligando.

D

DC: célula dendrítica (del inglés, “dendritic cell”).

DMO: densidad mineral ósea.

E

EE: efectores tempranos (del inglés, “early effector”).

EM: memoria efectora (del inglés, “effector memory”).

EMR₂: factor proteico similar al factor de crecimiento epidérmico que contiene un módulo tipo receptor hormonal rico en mucina 2 (del inglés, “epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2”).

F

FABP: proteína intestinal fijadora de ácidos grasos (del inglés, “intestinal fatty acid binding protein”).

Fc: fracción constante.

FcεRI: receptor de alta afinidad para la IgE.

FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (del inglés, “fibroblast growth factor 2”).

G

GI: gastrointestinal.

H

HaT: α-triptasemia hereditaria.

HLA: antígeno leucocitario humano (del inglés, “human leucocyte antigen”).

HVA: alergia a veneno de himenópteros (del inglés, “hymenoptera venom allergy”).

I

ICAM: molécula de adhesión intercelular (del inglés, “intercellular adhesion molecule”).

ICC: Clasificación de Consenso Internacional (del inglés, “International Consensus Classification”).

Ig: inmunoglobulina.

IFN: interferón.

IHQ: inmunohistoquímica.

IL: interleuquina.

ILC2: célula linfóide innata de tipo 2 (del inglés, “type 2 innate lymphoid cell”).

iMo: monocito intermedio (del inglés, “intermediate monocyte”).

ISM: mastocitosis sistémica indolente (del inglés, “indolent systemic mastocytosis”).

L

LLC: leucemia linfática crónica.

LMA: leucemia mieloblástica aguda.

LMC: leucemia mielomonocítica crónica.

LNH: linfoma no Hodgkin.

LPS: lipopolisacárido.

LST: tubo de screening de linfocitos (del inglés, "Lymphocyte Screening Tube").

LTC: leucotrieno.

M

MALT: tejido linfoide asociado a mucosa (del inglés, "mucosa-associated lymphoid tissue").

MC: mastocitosis cutánea.

MCA: activación mastocitaria (del inglés, "mast cell activation").

MC_c: mastocitos ricos en quimasas y carboxipeptidasas.

MCD: mastocitosis cutánea difusa.

MCL: leucemia de mastocitos (del inglés, "mast cell leukemia").

MCMP: mastocitosis cutánea maculopapular.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1 (del inglés, "monocyte chemoattractant protein-1").

MC_T: mastocito rico en triptasa.

MC_{TC}: mastocito que tiene quimasa y triptasa.

mDC: célula dendrítica mieloide.

MO: médula ósea.

N

NK: asesina natural (del inglés, "natural killer").

ncMo: monocito no clásico (del inglés, "non-classical monocyte").

NMP: neoplasia mieloproliferativa.

O

OMS: Organización Mundial de la Salud.

P

PAF: factor activador de plaquetas (del inglés, “platelet activating factor”).

PAR₂: receptor activado por proteasa de tipo 2 (del inglés, “protease-activated receptor-2”).

PC: célula plasmática (del inglés, “plasma cell”).

pDC: célula dendrítica plasmocitoide.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, “Platelet-Derived Growth Factor”).

PGE₂: prostaglandina E2.

PG: prostaglandina.

PGD₂: prostaglandina D2.

PRR: receptor de reconocimiento de patrones moleculares (del inglés, “pattern recognition receptor”).

R

REMA: Red Española de MAstocitosis.

RANKL: ligando del receptor activador κ B (del inglés, “receptor activator of nuclear factor- κ B ligand”).

S

sBT: niveles basales de triptasa sérica (del inglés, “serum baseline tryptase”).

SCF: factor estimulador de células madre (del inglés, “stem cell factor”).

SM: mastocitosis sistémica (del inglés, “systemic mastocytosis”).

SMD: síndrome mielodisplásico.

SP: sangre periférica.

SSM: mastocitosis sistémica quiescente (del inglés, “smoldering systemic mastocytosis”).

T

TCR: receptor de linfocitos T (del inglés, “T cell receptor”).

TE: efector terminal (del inglés, “terminal effector”).

TGFβ1: factor de crecimiento transformante β (del inglés, “transforming growth factor 1”).

TFH: célula T colaboradora folicular (del inglés, “T follicular helper”).

TGFβ: factor de crecimiento transformante β (del inglés “transforming growth factor”).

Th: célula T colaboradora (del inglés, “T helper”).

Tk: tirosina quinasa (del inglés, “tyrosine kinase”).

TLR: receptor tipo *Toll* (del inglés, “*toll*-like receptor”).

TM: memoria transicional (del inglés, “transitional memory”).

TNFα: factor de necrosis tumoral α (del inglés, “tumor necrosis factor α”).

Tregs: células T reguladoras.

U

UP: urticaria pigmentosa.

V

VAF: frecuencia de variante alélica (del inglés, “variant allele frequency”).

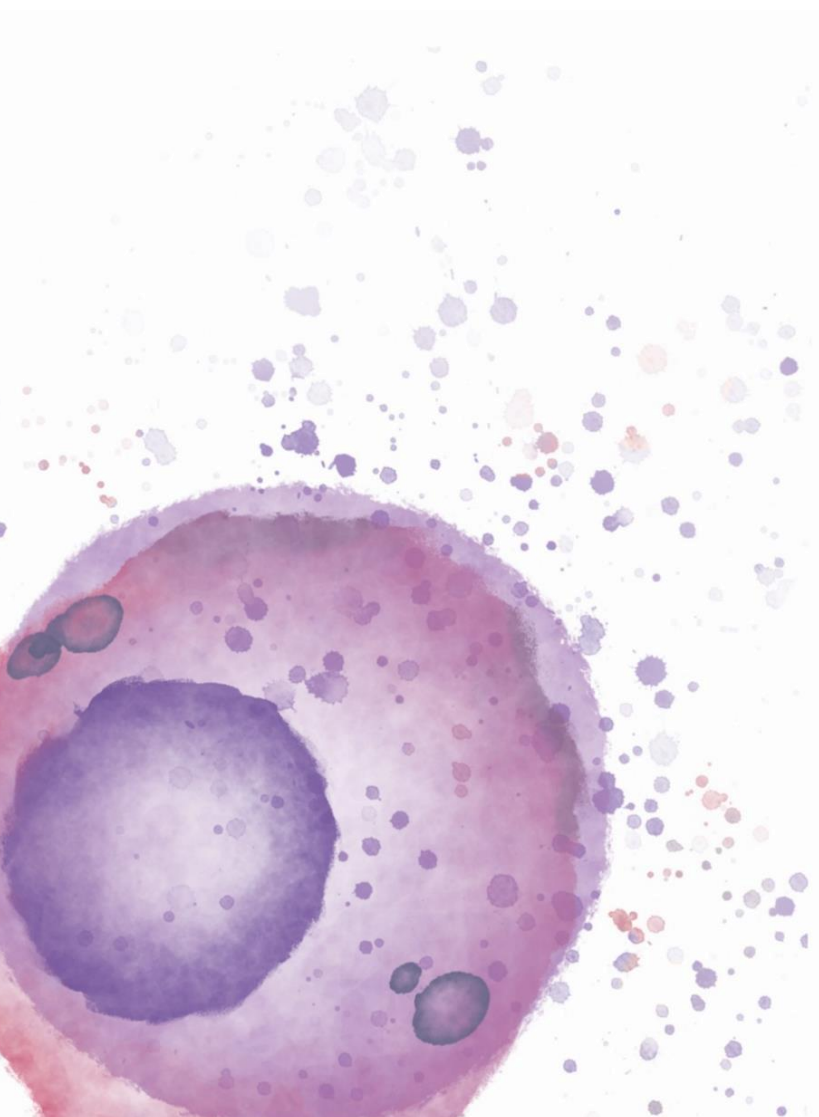
VCAM: molécula de adhesión endotelial tipo 1 (del inglés, “vascular cell adhesion molecule-1”).

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, “vascular endothelial growth factor”).

W

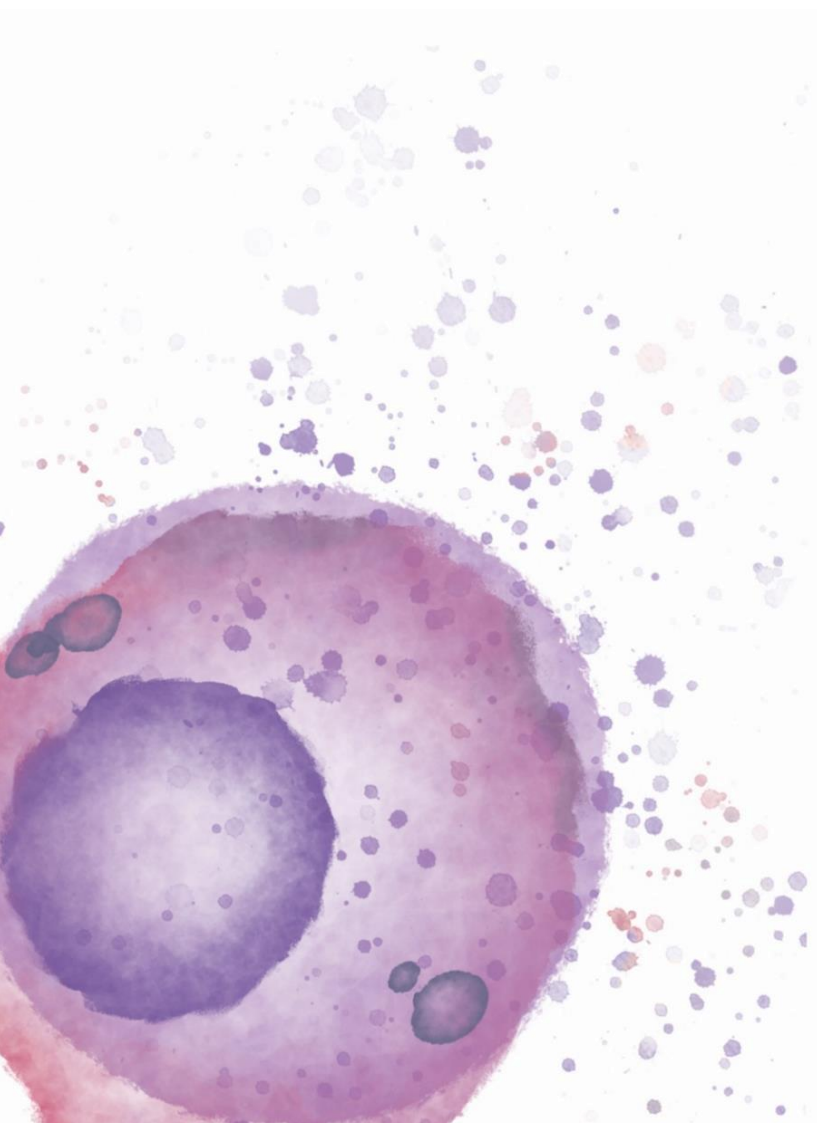
WDSM: mastocitosis sistémica bien diferenciada (del inglés, “well-differentiated systemic mastocytosis”).

Índice



Introducción	1
1. Mastocito.....	1
1.1 Mediadores mastocitarios	3
1.1.1 Mediadores preformados	3
1.1.2 Mediadores formados de <i>novo</i>	3
1.1.3 Mediadores sintetizados de <i>novo</i> tras activación transcripcional	6
1.2 Moléculas y receptores de membrana	6
1.2.1 Receptor Kit (CD117).....	7
1.2.2 Receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI)	9
1.3 El mastocito como célula del sistema inmune	9
1.3.1 Papel del mastocito en la respuesta inmune innata	10
1.3.2 Papel del mastocito en la respuesta inmune adaptativa	14
2. Mastocitosis	18
2.1 Criterios diagnósticos de mastocitosis sistémica	21
2.2 Subtipos diagnósticos de mastocitosis	24
2.2.1 Mastocitosis cutánea.....	24
2.2.2 Mastocitosis sistémica	26
2.2.2.1 Mastocitosis de médula ósea (BMM)	31
2.2.2.2 Mastocitosis sistémica indolente (ISM)	33
2.2.2.3 Mastocitosis sistémica quiescente (SSM).....	34
2.2.2.4 Mastocitosis sistémica avanzada: ASM, SM-AHN y LMC	34
2.2.2.5 Mastocitosis sistémica bien diferenciada	37
3. El sistema inmune en la mastocitosis sistémica	37
Hipótesis y objetivos	43
Material, métodos y resultados	49
Artículo 1: “Perfil inmune innato alterado en sangre de pacientes con mastocitosis sistémica”	53
Artículo 2: “Perfil inmune de células T en sangre de mastocitosis sistémica: asociación con las características de la enfermedad”	73
Artículo 3: “Alteración de los perfiles inmunitarios de células B, células plasmáticas y anticuerpos en la sangre de mastocitosis sistémica”.....	97
Discusión	137
Conclusiones	163
Referencias bibliográficas	169
ANEXO I	191

Introducción



1. Mastocito

El mastocito es una célula del sistema inmune que fue descrita por primera vez en 1878 por Paul Ehrlich en su tesis doctoral¹. En su primera descripción, el mastocito se caracterizó como una célula singular y distinta de todas las células conocidas hasta ese momento, que estaba presente en el tejido conectivo y mucoso, mostrando características morfológicas distintivas y una gran afinidad por algunos colorantes básicos, como la anilina². Estas células, que Paul Ehrlich denominó posteriormente "mastzellen" (células cebadas), llamaron su atención debido a su apariencia granular característica y a su presencia en diferentes tejidos del organismo. Un siglo después, Kitamura *et al.*³ demostraron el origen hematopoyético del mastocito, que en la actualidad se considera una célula hematopoyética madura, derivada de un precursor CD34⁺ de médula ósea (MO), que expresa en su membrana el receptor Kit (CD117)⁴. Al contrario de lo que ocurre con otras células de origen hematopoyético, en los mastocitos, la expresión de CD117 en la membrana citoplasmática se mantiene a lo largo de todas sus etapas madurativas, mientras que la expresión de CD34 se pierde de forma precoz⁵.

Aunque el origen del mastocito está en la MO, los precursores de mastocitos salen del entorno medular a través de la circulación sanguínea, y se dirigen desde la sangre a diferentes tejidos del organismo, donde terminan su maduración⁶. Es en esos tejidos de destino de los precursores de mastocitos, donde éstos adquieren características únicas en función de los distintos factores de crecimiento y señales que reciben del micromedioambiente, y donde entran en contacto con antígenos y otros estímulos provenientes del exterior^{4,7}. En términos generales, la distribución de los mastocitos en el cuerpo humano es extensa, si bien colonizan principalmente las mucosas (e.g., el tracto gastrointestinal, respiratorio y la superficie ocular) y tejidos epiteliales como la piel, estando presentes también en el tejido conectivo (rodeando células de músculo liso o de los folículos pilosos), la MO, y en zonas vascularizadas (exceptuando la retina y el tejido

parenquimatoso del sistema nervioso central) donde adoptan una distribución perivascular^{8,9}. Esta distribución perivascular estratégica de los mastocitos les permite implicarse en la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos claves en la respuesta inmunitaria, como son la vasodilatación, la angiogénesis, el reclutamiento de leucocitos, la activación endotelial y la eliminación de microorganismos (e.g., bacterias y parásitos)^{7,10}. De hecho, en la actualidad se reconoce que desde el punto de vista funcional, el mastocito desempeña un importante papel en la iniciación y potenciación de la respuesta inmunitaria innata, contribuyendo además, a la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, por lo que desarrolla un papel clave en la interacción del sistema inmune con nuestro entorno ambiental⁸. Además, como parte de sus funciones efectoras, el mastocito juega un papel central en enfermedades alérgicas, particularmente en aquellas que se asocian con una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos de tipo inmunoglobulina (Ig) E, y en menor medida también IgG, susceptibles de unirse a sus receptores de alta afinidad (FcεRI y FcγRI, respectivamente) expresados de forma abundante en la superficie de los mastocitos de cualquier tejido en situación basal o tras activación, respectivamente¹¹.

Según su localización y su contenido en proteasas de serina, los mastocitos tisulares maduros se clasifican habitualmente en tres subtipos principales: i) mastocitos ricos en triptasa, (MC_T), que prácticamente sólo contienen triptasa y se localizan principalmente en la mucosa gástrica y alveolar; ii) mastocitos que, además de triptasa, contienen quimasa, carboxipeptidasa y otras proteasas (MC_{TC}), y se localizan preferentemente en el parénquima mamario, la piel, los ganglios linfáticos axilares y la submucosa gástrica; y, iii) mastocitos que contienen quimasa y carboxipeptidasa (MC_C), localizados en los alvéolos y la submucosa gástrica^{4,7,12}.

1.1 Mediadores mastocitarios

El mastocito en general, y el mastocito activado en particular, tiene la capacidad de liberar una amplia variedad de compuestos biológicamente activos que pueden clasificarse en 3 categorías distintas de acuerdo a su origen y posible almacenamiento: i) mediadores preformados, almacenados en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos; ii) mediadores formados de *novo*, y constituidos principalmente por mediadores derivados de la degradación de lípidos (e.g., fosfolípidos) de las membranas del mastocito; y, iii) mediadores sintetizados tras activación transcripcional, cuya regulación está condicionada por el tipo de estímulo y el receptor implicado en el reconocimiento y transmisión de la señal activadora (Figura 1)^{13,14}. A continuación, describimos de forma más detallada cada uno de estos tres grupos de mediadores mastocitarios.

1.1.1 Mediadores preformados

Entre los mediadores preformados presentes en los gránulos de secreción de los mastocitos, se incluyen las aminas vasoactivas. Entre otros compuestos, éstas incluyen principalmente moléculas como la histamina, y en menor medida, la serotonina¹³. La histamina, ejerce sus efectos biológicos a través de cuatro receptores (H_{1-4})⁴. Los receptores H_1 se encuentran en células endoteliales, el músculo liso bronquial y algunas neuronas, mientras que los receptores H_2 están presentes en el músculo liso vascular y en las células parietales del estómago⁴. La activación de estos receptores de la histamina está asociada con distintas reacciones, como el enrojecimiento en la piel, la broncoconstricción, el descenso de la presión arterial, el control de la permeabilidad vascular y el aumento de la actividad y del peristaltismo gastrointestinal^{15,16}. A su vez, los receptores H_3 se expresan principalmente en el sistema nervioso central, mientras que los receptores H_4 están presentes en la superficie de los granulocitos, incluidos los

granulocitos basófilos, los propios mastocitos, y los granulocitos eosinófilos, participando en el proceso de quimiotaxis de estas células durante la respuesta inmunitaria^{4,17,18}

Otro grupo importante de mediadores preformados está constituido por las proteasas, que integran el componente proteico mayoritario de los gránulos del mastocito^{19,20}. Estas proteasas varían dependiendo del grado de diferenciación celular y subtipo del mastocito, siendo las más relevantes la triptasa, la quimasa y la carboxipeptidasa A²¹. En el ser humano, la familia de genes de la triptasa consta de varios miembros (n=5) ubicados en diferentes regiones del cromosoma 16, dando lugar a 4 isoformas diferentes: (α , β , γ y δ) con una importante, aunque variable, actividad biológica²²⁻²⁶. La triptasa- β es la isoforma más abundante en el mastocito, en el que puede estar presente como monómero inactivo o tetrámero unido a heparina en su forma activa²⁷. A su vez, la triptasa- α , que puede encontrarse también en forma monomérica o tetramérica, presenta una mayor actividad biológica, aunque proporcionalmente sus niveles de expresión son muy inferiores a los de la triptasa- β ²⁸⁻³⁰. Por otra parte, la triptasa- δ es indetectable en sangre, mientras que hasta la fecha, la triptasa- γ no se ha podido detectar en forma soluble³⁰. En condiciones basales los mastocitos liberan pequeñas cantidades de triptasa- α , detectables en plasma²⁹. Desde un punto de vista funcional, tras la desgranulación del mastocito, éste libera importantes cantidades de triptasa acumulada en los gránulos citoplasmáticos (e.g., triptasa- β) y que puede actuar como molécula vasoactiva y proinflamatoria, con capacidad de promover la producción y liberación de citoquinas, además de intervenir en el reclutamiento de células inmunes y participar en la reparación del daño tisular³¹⁻³⁵. Otra proteasa almacenada de forma activa en los gránulos de los mastocitos es la quimasa, codificada por el gen *CMA1* localizado en el cromosoma 14¹³. Esta enzima desempeña un papel crucial en la conversión de angiotensina I a angiotensina II, un péptido con propiedades vasoconstrictoras^{36,37}. Además de la triptasa y la quimasa, merece destacar entre las principales proteasas del mastocito, la

carboxipeptidasa A³⁸. Se trata de una metaloexopeptidasa cuyo gen está localizado en el cromosoma 3 humano, y cuya función está asociada tanto a la conversión de angiotensina I, como a la escisión de mediadores inflamatorios inductores de vasodilatación y de neurotransmisores como la bradicinina y la sustancia P, respectivamente³⁸⁻⁴¹.

Además de los grupos de mediadores mencionados anteriormente, existe un tercer grupo de mediadores preformados constituido por los proteoglicanos, entre los que destaca la heparina, que tal como hemos descrito anteriormente, es liberada por el mastocito unida a proteasas como la triptasa⁴². La heparina es un compuesto que se une a la antitrombina III impidiendo la activación de la cascada de coagulación⁴³. Además de su función anticoagulante durante la respuesta inflamatoria, la heparina puede unirse a citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento como la interleuquina (IL)-1, la IL-8, el factor de necrosis tumoral α (TNF α ; abreviado del inglés, “tumor necrosis factor- α ”) y el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2; abreviado del inglés, “fibroblast growth factor-2”), que intervienen en procesos inflamatorios, la angiogénesis, la cicatrización de heridas, y regulando y estabilizando la función del mastocito en este contexto⁴⁴.

1.1.2 Mediadores formados de *novo*

Los mediadores mastocitarios formados de *novo*, también conocidos genéricamente como eicosanoides, son un grupo de compuestos lipídicos bioactivos derivados del ácido araquidónico, que son liberados rápidamente por el mastocito tras su activación⁴⁵. Los principales tipos de eicosanoides incluyen las prostaglandinas (PG), tromboxanos y leucotrienos (LTC)⁴⁶. De todos ellos, merece destacar por su papel: i) la PGD₂, que contribuye al aumento de la permeabilidad vascular, el reclutamiento leucocitario, la producción de moco y la activación de células del sistema nervioso; y ii) el LTC₄, asociado al reclutamiento de otros leucocitos, como los granulocitos neutrófilos y eosinófilos, además de linfocitos T⁴⁷⁻⁵⁰.

1.1.3 Mediadores sintetizados de novo tras activación transcripcional

Los mastocitos, además de liberar mediadores ya preformados o de producción rápida, producen también mediadores que son sintetizados tras activación transcripcional. La regulación de la síntesis de estos mediadores está condicionada por la naturaleza específica del estímulo que la desencadena y por la interacción selectiva con los receptores involucrados en la transmisión de la señal de activación. Dentro de esta categoría de moléculas se encuentran las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, cuya actividad puede manifestarse tanto en la promoción como en la atenuación de procesos inflamatorios⁷. Entre las citoquinas proinflamatorias destacan por un lado, la IL-1 β , la IL-5 y la IL-6 asociadas a respuestas inmunitarias de tipo 2, y por otra parte, el TNF α , interferón γ (IFN γ), IL-2, IL-3, IL-12 e IL-18, asociadas a respuestas de tipo 1. En contraposición, el mastocito secreta también citoquinas antiinflamatorias, de las que cabe destacar el factor de crecimiento transformante β (TGF β ; abreviado del inglés, “transforming growth factor β ”) y la IL-10. Respecto a las quimiocinas secretadas por el mastocito cabe mencionar las quimiocinas CCL5 (abreviado del inglés, “C-C motif chemokine ligand 5”), y CXCL8 (abreviado del inglés, “C-X-C motif chemokine ligand 8”), que reclutan leucocitos al foco inflamatorio, epicentro de la respuesta inmunitaria^{51,52}.

1.2 Moléculas y receptores de membrana

Hasta la fecha se ha documentado la expresión de una amplia variedad de tipos de receptores en la membrana del mastocito (Figura 1) incluyendo receptores hormonales, receptores de tipo *Toll* (TLR; abreviado del inglés, “*Toll*-like receptor”), moléculas coestimuladoras, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA; abreviado del inglés, “human leucocyte antigen”) tipo I y tipo II, receptores del complemento, receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR; abreviado del inglés, “pattern recognition receptor”), receptores de histamina y de citoquinas/quimiocinas, entre otros⁵³. Sin embargo, de todos estos receptores se

consideran especialmente relevantes por su implicación en la activación y posterior liberación de mediadores por parte de los mastocitos, el receptor del factor de crecimiento de células madre (Kit) y el receptor de alta afinidad para la IgE (FcεRI), que comentaremos a continuación en más detalle.

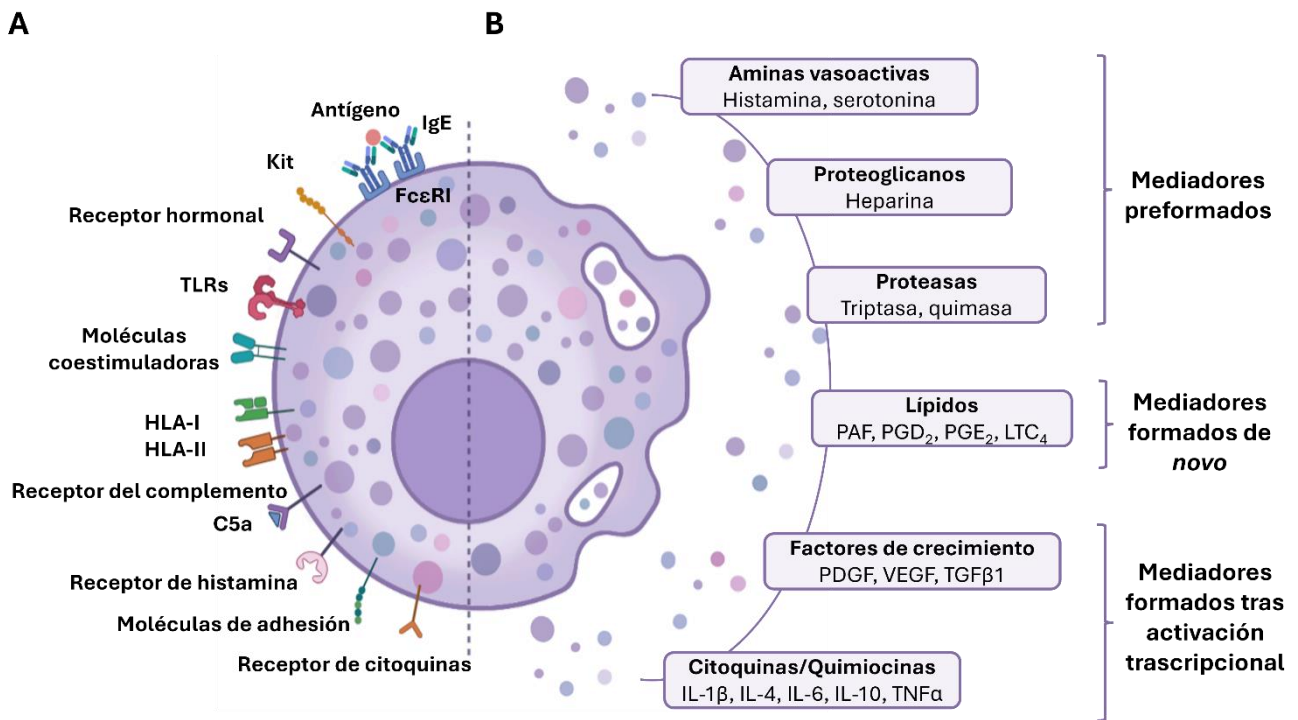


Figura 1: Principales moléculas y familias de receptores presentes en la membrana citoplasmática del mastocito (A) y tipos de mediadores liberados tras su activación (B).

HLA, antígeno leucocitario humano; IgE, inmunoglobulina E; IL, interleuquina; LTC₄, leucotrieno 4; PAF, factor activador de plaquetas; PGD₂, prostaglandina D2; PGE₂, prostaglandina E2; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; TGFβ1, factor de crecimiento transformante β tipo 1; TLR, receptor tipo *Toll*; TNFα, factor de necrosis tumoral α; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

1.2.1 Receptor Kit (CD117)

Desde el punto de vista bioquímico, Kit (CD117) es un receptor con actividad tirosina quinasa tipo III compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y una porción intracelular con actividad tirosina quinasa (Tk) que contiene dos dominios (Tk1 y Tk2) separados entre ellos mediante un inserto quinasa (Figura 2)⁵⁴. En el ser humano este

receptor está codificado por el protooncogén *KIT*, que consta de aproximadamente 83 kilobases que integran un total de 21 exones, localizados en el brazo largo del cromosoma 4⁵⁵⁻⁵⁸. En condiciones fisiológicas, la vía de señalización de Kit se inicia mediante la interacción del receptor con su ligando, el factor estimulador de células madre (SCF; abreviado del inglés, “stem cell factor”), provocando la dimerización del receptor Kit y su posterior activación mediante autofosforilación^{56,59,60}. Este evento activador desencadena una compleja cascada de señalización intracelular que otorga a Kit un papel crucial en la regulación de procesos como la proliferación celular, la diferenciación, la supresión de la apoptosis, la desgranulación y la migración celular^{55,56,61}. Estos efectos son mediados por cambios en las propiedades de adhesión y movilidad de los mastocitos activados^{56,62-65}.

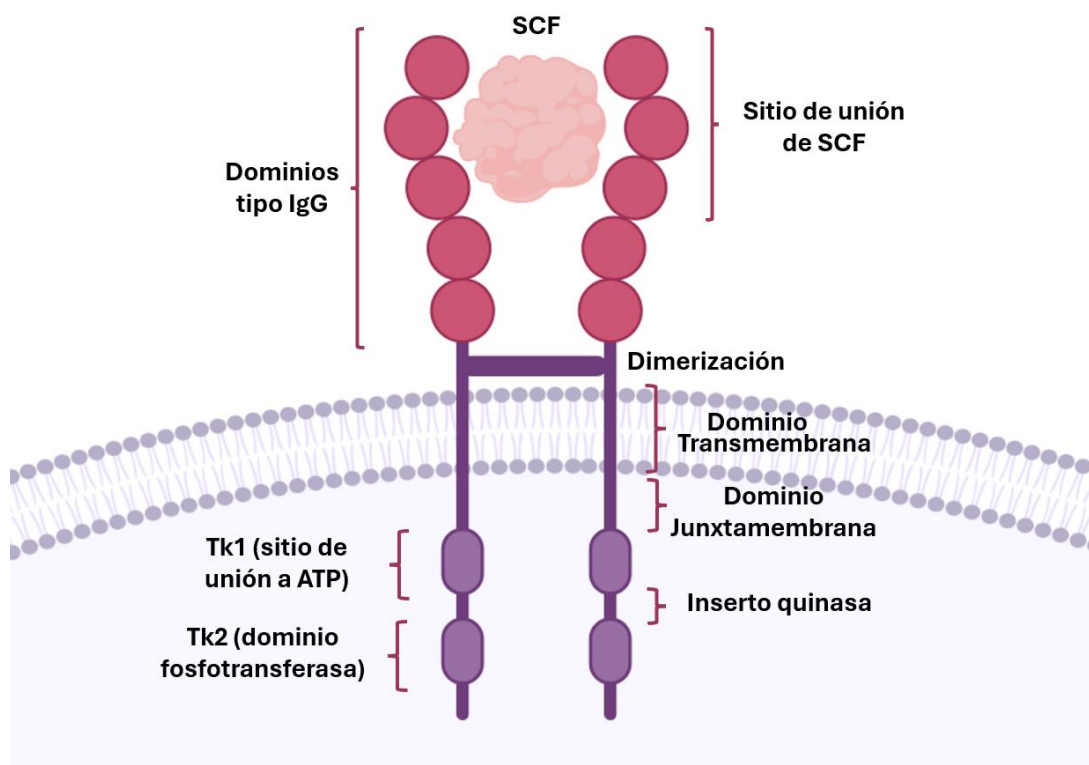


Figura 2: Representación esquemática de la estructura del receptor Kit

ATP, adenosina trifosfato; IgG, inmunoglobulina G; Tk, tirosina quinasa; SCF, factor estimulador de células madre.

1.2.2 Receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI)

El receptor FcεRI está integrado por un complejo proteico que adopta una estructura tetramérica consistente en una cadena α, una cadena β y dos cadenas γ unidas entre sí mediante enlaces disulfuro⁶⁶. Este receptor se expresa predominantemente en la membrana de los mastocitos, los granulocitos basófilos y de una subpoblación de monocitos clásicos con funciones inmunoregulatoras⁶⁶⁻⁶⁸. La fracción constante (Fc) de la IgE, que sirve como ligando para este receptor, se une con una alta afinidad a la cadena α del FcεRI sin inducir cambios conformacionales⁶⁹. Sin embargo, para activar esta vía, es necesario que dos moléculas de IgE, unidas previamente a un antígeno (Ag), se unan simultáneamente a un dímero del receptor FcεRI^{66,69}. Este proceso de unión desencadena la activación del receptor y la posterior activación y desgranulación de los mastocitos, lo que resulta en la liberación de mediadores inflamatorios y proinflamatorios. Este mecanismo de activación asegura una respuesta inmunitaria efectiva y específica frente a aquellos antígenos que son reconocidos por anticuerpos de tipo IgE^{66,67,70}.

1.3 El mastocito como célula del sistema inmune

Los mastocitos desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria debido a su distribución estratégica en múltiples tejidos y su capacidad para responder a una amplia variedad de estímulos gracias al gran número de receptores expresados en su membrana y de mediadores que pueden liberar al medio extracelular⁷¹. Su particular ubicación en la interfaz entre el organismo y el ambiente externo, en tejidos como la piel y las mucosas, les permite actuar no sólo como primera línea de defensa frente a microorganismos en procesos infecciosos, sino también en la respuesta innata e inflamatoria asociada a otros procesos patológicos, interviniendo también en la modulación de la presentación de antígenos y el desarrollo de respuestas adaptativas⁷². Así mismo, cabe mencionar que los mastocitos ejercen estos efectos pleiotrópicos, tanto mediante la secreción de

mediadores solubles, como a través del establecimiento de interacciones directas célula-célula, teniendo todos estos mecanismos efectos bidireccionales^{12,72}.

1.3.1 Papel del mastocito en la respuesta inmune innata

La inmunidad innata, también conocida como inmunidad natural o inespecífica, suele definirse como la primera línea de defensa del organismo contra patógenos externos frente a los que previamente no existía (ni se generará) sensibilización, constituyendo un mecanismo rápido e inespecífico que está presente ya desde el nacimiento⁷³. Esta inmunidad se desencadena previamente a la respuesta específica atribuida a la inmunidad adaptativa, que tarda en desarrollarse entre 4-7 días⁷⁴. Entre las funciones que desempeña el mastocito en la respuesta innata merece destacar: la detección y reconocimiento de patógenos y sus componentes, la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas y quimiocinas, la eliminación directa de los elementos reconocidos como ajenos, la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa y la inducción de respuestas antivirales⁷⁵. Las células del sistema inmune implicadas en la respuesta innata, además del mastocito, incluyen (diferentes subtipos de) las células dendríticas (DC; abreviado del inglés, “dendritic cell”), los granulocitos neutrófilo, eosinófilo y basófilo, las células del sistema monocito/macrófago y las células “natural killer” (NK), además de algunas subpoblaciones minoritarias de linfocitos T y las células innatas linfoides (ILC; abreviado del inglés, “innate lymphoid cells”) ^{76,77}.

En este tipo de respuesta, los mastocitos destacan por su capacidad de desgranulación inmediata, lo que les permite actuar de forma rápida y eficiente, incluso antes de la participación de otras células inmunitarias residentes en los tejidos, motivo por el que con frecuencia se considera a los mastocitos como los iniciadores de la respuesta inmunitaria innata⁷⁸. En este sentido, el mastocito puede actuar como célula centinela, vigilando el entorno tisular en busca de cualquier señal de invasión por parte de agentes

patógenos⁷⁹. Para interactuar con antígenos, los mastocitos emplean una variedad de mecanismos, entre los que se incluye la fagocitosis y la eliminación de patógenos a través procesos oxidativos y no oxidativos⁸⁰⁻⁸². Esto implica la generación de especies reactivas de oxígeno y la activación de cascadas enzimáticas que conducen a la degradación de los patógenos⁸³. Además, los mastocitos exhiben actividad bactericida directa mediada por proteasas y catelicidinas (péptidos antimicrobianos con capacidad para destruir bacterias y otros microorganismos invasores)^{84,85}. Esta actividad bactericida contribuye de forma significativa a la eliminación de patógenos y a la protección del organismo frente a infecciones⁸⁶. Además, aunque tradicionalmente los mastocitos se han asociado con la defensa contra patógenos bacterianos, también desempeñan un papel crucial en la presentación de antígenos a través de las moléculas HLA^{87,88}. Este proceso implica la presentación de péptidos antigénicos en HLA de clase I y HLA-II, lo que permite su interacción directa con linfocitos T específicos del antígeno presentado^{80-82,89-91}. En este punto, cabe señalar que los mastocitos no sólo desempeñan una actividad bactericida, sino que también tienen capacidad de actuar frente a infecciones parasitarias (sobre todo en tejidos susceptibles como la piel o el tracto digestivo) en las que el mastocito ejerce un papel fundamental a través de su reconocimiento de estos agentes infecciosos mediante los receptores TLR1, TLR4 y TLR9, el reclutamiento de otras células inmunes, la regulación de la permeabilidad de la barrera tisular y la expulsión de los parásitos^{92,93}. Además de su reconocido papel en la respuesta antibacteriana y antiparasitaria, los mastocitos contribuyen de forma importante en las respuestas antivirales mediante la producción de IL-1 β , IL-6, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, IFN- α e IFN- β , citocinas que de una forma u otra interfieren con la replicación viral y reclutan células efectoras citotóxicas al foco infeccioso, como las células NK y los linfocitos T CD8⁺⁹⁴⁻⁹⁷. Así mismo, los mastocitos son conocidos por secretar mediadores inflamatorios como la histamina, proteasas y citoquinas, que contribuyen a la eliminación de virus, desempeñando por tanto un papel

crucial en la respuesta antiviral a través de su capacidad de detectar la presencia de virus mediante receptores específicos y su papel en la coordinación de la respuesta antiviral en colaboración con otras células del sistema inmune, como los linfocitos T y las DC⁹⁸. Tras la activación, el mastocito libera histamina, lo que desencadena una respuesta vascular vasodilatadora⁹⁹⁻¹⁰³. Este efecto se ve potenciado por la acción de las proteasas mastocitarias y de TNF α , así como por la rápida producción de mediadores lipídicos, como LTC y PG¹⁰⁴⁻¹⁰⁸. Además, los mastocitos participan en el reclutamiento de otras células inmunes, como los granulocitos neutrófilos y eosinófilos, mediante la liberación de, por ejemplo, CXCL-1, CXCL-2, eotaxinas e histamina¹⁰⁹⁻¹¹⁴. Este reclutamiento celular complementa la respuesta inmunitaria frente a infecciones virales, al aumentar la presencia de células efectoras en el lugar de la infección, lo que contribuye adicionalmente a la eliminación eficiente del virus.

El efecto vascular, producido por la activación de los mastocitos en los tejidos del organismo, tiene también implicaciones y consecuencias sobre otras células de la inmunidad innata como es el caso de las DC, interviniendo en la movilidad y migración de estas células al foco infeccioso o inflamatorio y su posterior desplazamiento a los órganos linfoides secundarios¹¹⁵. Tal como ocurre con los mastocitos, las DC también juegan un papel primordial en la detección, captación, fagocitosis/endocitosis y presentación de antígenos a las células T, y por ende, en la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa^{116,117}. Las DC se distribuyen ampliamente en los tejidos, pero a diferencia del mastocito, las DC y sus precursores pueden verse también normalmente en sangre periférica¹¹⁸. Actualmente las DC se clasifican en dos grandes grupos: i) DC plasmocitoides (pDC) y ii) DC convencionales o mieloides (cDC o mDC, respectivamente), que constituyen un grupo celular heterogéneo que, a su vez, incluye cDC1 que expresan CD141⁺ y están típicamente involucradas en la presentación de antígenos a células T CD8⁺, y cDC2 definidas por la expresión de CD1c⁺, implicadas en la respuesta frente a patógenos

bacterianos¹¹⁷⁻¹²¹. Recientemente se ha descrito una tercera subpoblación de DC circulantes en sangre con características fenotípicas parecidas a las de las pDC, pero que de forma exclusiva expresan la molécula Axl, funcionalmente caracterizadas por presentar una mayor capacidad estimuladora de células T respecto a las demás poblaciones de DC¹²². Los mastocitos, además de estar involucrados en la migración de DC, también son capaces de regular su maduración, y su capacidad de procesar antígenos y estimular las células T, no sólo a través de la liberación de mediadores solubles como citoquinas y quimiocinas, sino también mediante la secreción de gránulos citoplásmicos, exosomas y el contacto directo con la propia DC (Figura 3)¹²³. De esta forma, la histamina y el TNF α , así como los exosomas y los gránulos citoplásmicos intactos liberados por el mastocito, promueven la migración y maduración de las DC e incrementan su capacidad de presentar antígenos, reforzando así su interacción con las células T, la activación de estas últimas y su polarización a células T colaboradoras (Th; abreviado del inglés, “T helper”) de distintos subtipos funcionales^{124,125}. Tal, como hemos mencionado anteriormente, el MC también puede interaccionar de forma directa con las DC, permitiendo una comunicación bidireccional asociada a la transferencia a las DC por parte del mastocito, de complejos Ag-IgE-Fc ϵ RI, lo que facilita la activación de células T específicas de antígeno; las DC a su vez, transmiten complejos HLA-II-péptidos antigénicos, al mastocito permitiendo la inducción posterior de la activación de células T efectoras por los mastocitos que han capturado los antígenos procesados por DC en moléculas HLA-II¹²³. Estas interacciones moleculares y celulares entre el mastocito y las DC es esencial para la integración de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, y su regulación puede tener importantes implicaciones en la patogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias y autoinmunes⁷².

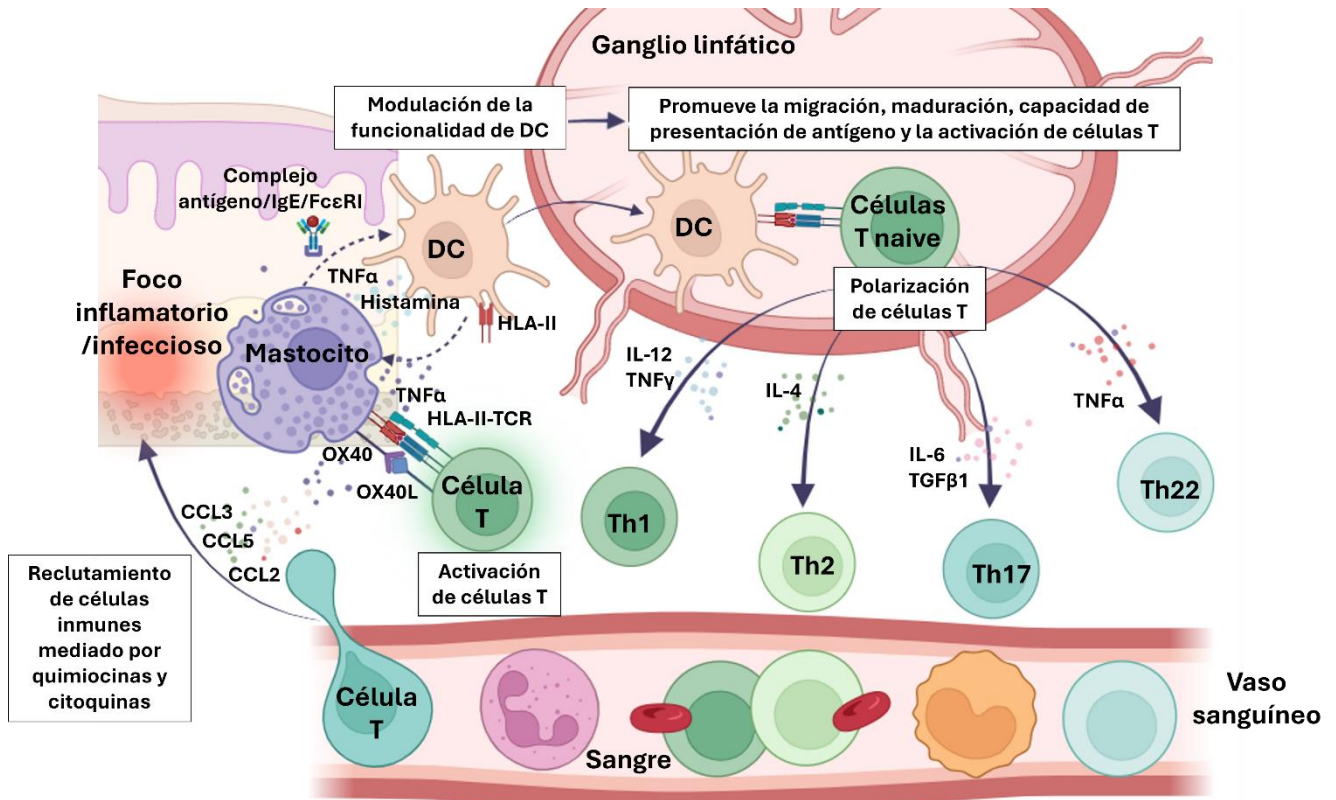


Figura 3: Papel del mastocito en la modulación de la función de las DC y su efecto sobre el reclutamiento, migración, maduración y activación de células T.

CCL, quimiocina de tipo C-C ligando; DC, célula dendrítica; FcεRI, receptor de alta afinidad para la IgE; HLA, antígeno leucocitario humano; IgE, inmunoglobulina E; IL, interleuquina; TCR, receptor de linfocito T; TGFβ1, factor de crecimiento transformante β 1; Th, linfocito T colaborador; TNF, factor de necrosis tumoral.

1.3.2 Papel del mastocito en la respuesta inmune adaptativa

En las últimas décadas se han publicado un número creciente de trabajos en los que se aportan evidencias sobre el papel del mastocito en la respuesta inmunitaria, más allá de la respuesta innata, y que sugirieron su implicación también, en la respuesta inmunitaria adaptativa^{8,126}. Esta implicación, no sólo es debida a sus efectos sobre células presentadoras de antígeno como las DC, sino también a la interacción directa con las células T y B de la inmunidad adaptativa⁷². En este sentido, diferentes autores han demostrado la existencia de una proximidad física entre el mastocito y las células T en el foco inflamatorio, asociada a un aumento de la densidad celular a nivel local^{103,127-130},

además de la activación del mastocito durante procesos inflamatorios mediados por células T, en situaciones patológicas como en la enfermedad de Crohn, la psoriasis o la artritis reumatoide, entre otras, y que junto a la expresión de un amplio abanico de mediadores y moléculas de membrana y citoplasmáticas por parte del mastocito, apoyarían la existencia de una interacción directa de estas células con los linfocitos T y B durante la respuesta inmunitaria adaptativa^{103,127-133}. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se ha descrito además que el mastocito podría influir en el reclutamiento, expansión, diferenciación y polarización de células T, mediante la liberación de mediadores solubles como la histamina, las PG, citoquinas y factores de crecimiento, y/o a través de una interacción directa mastocito-célula T (Figura 3)¹²³.

Concretamente, hoy consideramos que el mastocito puede influir en la migración de las células T hacia el foco inflamatorio mediante diversos mecanismos que incluyen: i) la liberación de moléculas quimiotácticas; ii) la regulación de la expresión de moléculas de adhesión; y iii) la activación de las células endoteliales de los capilares del tejido donde ocurre la respuesta inmunitaria¹³³. Ejemplo de ello serían el reclutamiento de células T CD8⁺ producido tras la liberación, por parte del mastocito, de CCL5 y LTB₄, la atracción y migración de células T CD4⁺ de tipo Th1 que sigue a la secreción de CCL3, CCL4, CXCL9 y CXCL10 por parte del mastocito, y de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th2 y Th17, por efecto del aumento de la secreción mastocitaria de CCL5 y CCL11 y CCL2 y CCL20, respectivamente^{52,134}.

Así mismo, actualmente está bien establecido que gran parte de las interacciones directas entre las células T y el mastocito se producen mediante uniones mediadas por HLA-I y HLA-II, lo cual resulta en una expansión (oligo) clonal (específica de antígeno) de células T¹³⁴. A modo de ejemplo, se ha observado que la exposición a lipopolisacárido (LPS) e IFN- γ , induce la expresión de HLA-II en el mastocito, lo que no sólo promueve la

activación de células T efectoras, sino que induce también, una expansión de células T reguladoras (Tregs)⁸⁷. Asimismo, la interacción mediada por las moléculas HLA I del mastocito y los linfocitos T CD8⁺, se ha demostrado produce un aumento, tanto de la proliferación como de las distintas funciones efectoras de esas células T CD8⁺¹³⁵. Además de las funciones comentadas anteriormente, el mastocito es capaz también de modular la polarización de células T CD4⁺ mediante la liberación de mediadores solubles que inducen diferenciación hacia fenotipos Th1 (IL-12 y TNF α), Th17 (IL-6 y TGF β 1), Th2 (IL-4) y Th22 (IL-6 y TNF α) (Figura 3)^{136,137}. Asimismo, el mastocito activado puede inducir la adhesión de células T a las células endoteliales y los fibroblastos mediante un incremento de la expresión de ICAM-1 (abreviado del inglés, “intercellular adhesion molecule 1”) y VCAM-1 (abreviado del inglés, “vascular cell adhesion molecule 1”). Por otro lado, el mastocito tiene la capacidad de liberar TNF α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-13, citocinas que poseen efecto activador y modulador sobre las células endoteliales, facilitando la adhesión de linfocitos T a las mismas^{138,139}.

Tal como hemos referido anteriormente, las interacciones entre el mastocito y otras células inmunes tienen efectos bidireccionales, por lo que estas células inmunes también modulan la función del mastocito. En este sentido, se ha descrito como la conexión directa entre mastocito y células T CD4⁺, a través de HLA-II y OX40L (CD40L), junto con la presencia de TNF α , intensifica la activación, proliferación y secreción de citoquinas por parte del mastocito¹³⁴. Por el contrario, se ha descrito que la interacción entre CD40L en el mastocito y CD40 en las células Tregs, genera un efecto supresor sobre la desgranulación mastocitaria mediada por IgE^{140,141}. Adicionalmente, las células Tregs pueden inhibir la expresión de Fc ϵ R1 en el mastocito, al secretar IL-10 y TGF β 1¹⁴².

Aunque la mayor parte de los trabajos publicados hasta la fecha sobre el papel del mastocito en la respuesta inmunitaria adaptativa se han centrado en los efectos

moduladores (bidireccionales) entre las células T y el mastocito, existen también algunas evidencias que apoyan la capacidad de los mastocitos de interactuar y modular la respuesta adaptativa mediada por los linfocitos B (Figura 4)¹⁴³. En este sentido, se ha descrito como los mastocitos en ausencia de linfocitos T, pueden inducir un aumento de la producción de IgE por parte de las células B, mediante la liberación de IL-13 e IL-4, y la expresión de CD40L¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Al expresar CD40L, junto con la secreción de IL-5, TGFβ1 y sobre todo IL-6, el mastocito puede estimular además, la supervivencia y la activación de células B naive, su proliferación y diferenciación a células plasmáticas (PC; abreviado del inglés, “plasma cell”) secretoras de IgA en un contexto no alérgico (independiente de IgE), considerándose que la IL-6 sería clave en el cambio de isotipo de la Ig expresada por los linfocitos B^{143,147}. Adicionalmente, el mastocito puede actuar sobre las células B mediante la liberación de histamina, capaz de inducir la producción autocrina de IL-6 y así, promover la producción de IgM, IgE e IgG4¹⁴⁸. Este papel del mastocito en la modulación de los linfocitos B se manifiesta igualmente a nivel del microbioma intestinal, donde el mastocito del tracto gastrointestinal desempeña un papel crucial en la homeostasis de bacterias comensales a través de la modulación de la generación y función de las PC secretoras de anticuerpos de tipo IgA⁸.

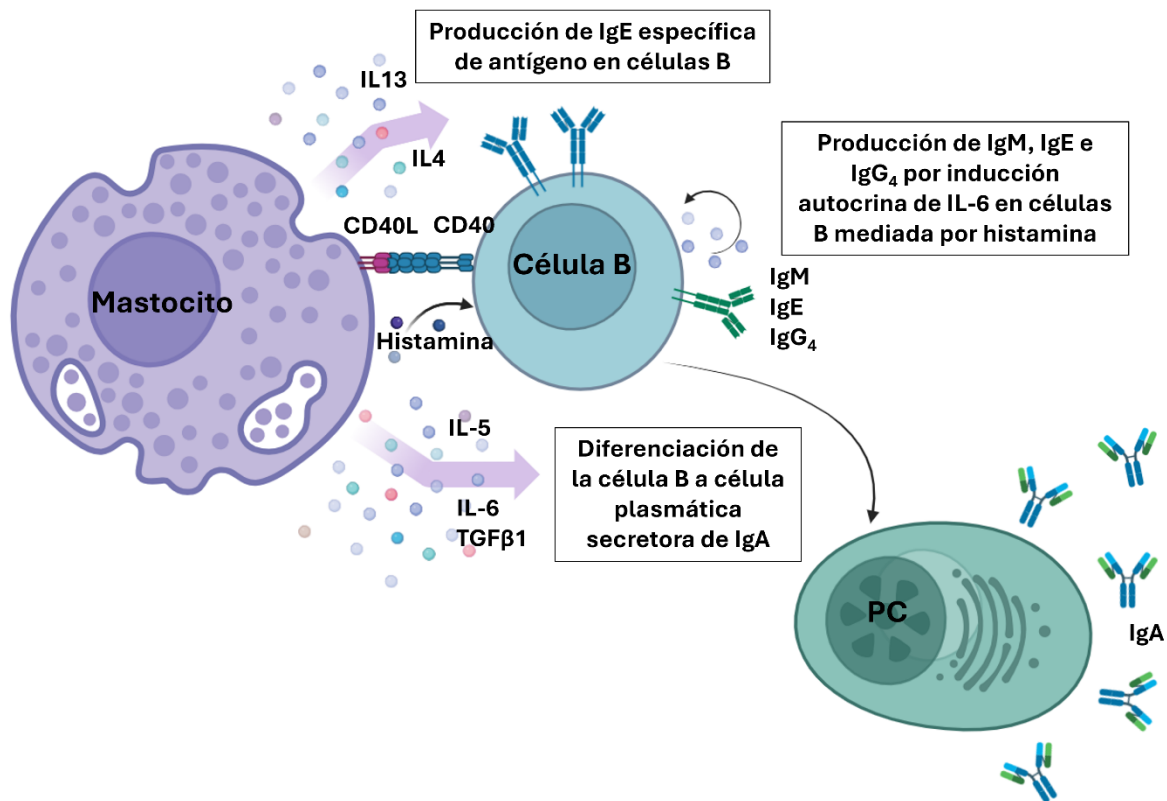


Figura 4: Efecto modulador del mastocito sobre la proliferación, supervivencia, diferenciación y el cambio de isotipo de Igs en linfocitos B.

Ig, inmunoglobulina; IL, interleuquina; PC, célula plasmática; TGFβ1, factor de crecimiento transformante β.

2. Mastocitosis

Bajo el término mastocitosis se incluyen un grupo heterogéneo de enfermedades que presentan como rasgo común, una expansión y acumulación de mastocitos morfológica e inmunofenotípicamente aberrantes, que en la gran mayoría de los casos (>95%) exhiben una mutación activante del gen *KIT*, y que típicamente se localizan en la piel, la médula ósea (MO), y (con menor frecuencia) en otros tejidos como los ganglios linfáticos y/o la mucosa del tracto gastrointestinal¹⁴⁹⁻¹⁵⁵. Esta expansión neoplásica de mastocitos se asocia a una activación mantenida del mastocito portador de la mutación (en el dominio tirosina quinasa o la porción yuxta-membrana del receptor Kit), activado de forma constitutiva e independiente de la unión a su ligando específico, el SCF^{156,157}. La mutación

de *KIT* más prevalente, presente en más del 90% de los pacientes, es una mutación somática en el codón 816 del gen *KIT*^{156,157}. Además de esta mutación *KIT*^{D816V}, se han descrito en aproximadamente el 1% de las mastocitosis de adulto otras variantes localizadas en el codón 816 como las mutaciones *KIT*^{D816Y} y *KIT*^{D816H}, u otras mutaciones en los codones cercanos (814 a 822)^{158,159}. Además, los pacientes con SM pueden mostrar mutaciones en otros genes, de las que destacan las mutaciones en los genes *SRSF2*, *ASXL1*, *RUNX1* y *DNMT3*, asociadas a peor pronóstico¹⁶⁰⁻¹⁶³. Un rasgo genético adicional, vinculado recientemente con la mastocitosis y otros síndromes de activación mastocitaria, es la α -triptasemia hereditaria (HaT)²⁶. Pese a que inicialmente la HaT se describió como una enfermedad familiar, hoy sabemos que se trata de un rasgo genético con herencia autosómica dominante de expresividad variable, asociado a un aumento en el número de copias del gen *TPSAB1* que codifica para la triptasa- α ^{164,165}. La sobreexpresión del número de copias de triptasa- α conlleva²⁶, a un aumento en los niveles basales de triptasa en suero en los individuos afectados por este rasgo genético^{164,165}. Actualmente se sabe que, mientras que la prevalencia de HaT en la población general es del 4-6%, esta cifra se eleva entre los pacientes con síndrome de activación mastocitaria y mastocitosis llegando en nuestro entorno a alcanzar un 29% y 18% de los casos, respectivamente^{165,166}.

La última clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las hemopatías malignas mieloides descrita en 2022¹⁴⁹, tal como la clasificación del grupo de Consorcio Internacional (ICC) del mismo año¹⁶⁷, abordan la heterogeneidad de la mastocitosis estableciendo tres subgrupos principales de mastocitosis: i) la mastocitosis cutánea (MC) caracterizada por la presencia de lesiones (acumulaciones de mastocitos) en la piel en ausencia de infiltración de otros tejidos; ii) la mastocitosis sistémica (SM; abreviado del inglés, “systemic mastocytosis”) caracterizada por la presencia de mastocitos patológicos en la piel, MO y/o en otros órganos y tejidos; y iii) el sarcoma de mastocitos^{149,167}.

A su vez, según la clasificación de la OMS de 2022¹⁴⁹, dos de estos tres subgrupos de mastocitosis incluyen diversas variantes que muestran un comportamiento clínico y biológico diferente. Así, la mastocitosis cutánea se subdivide en MC maculopapular tipo urticaria pigmentosa (MCMP), la MC difusa (MCD) y el mastocitoma cutáneo, dependiendo del número y tipo de lesiones observadas en la piel¹⁴⁹. De forma similar, en la clasificación de la OMS de 2022, las SM se dividen en formas más leves e indolentes de la enfermedad como la mastocitosis de médula ósea (BMM; abreviado del inglés, “bone marrow mastocytosis”) y la mastocitosis sistémica indolente (ISM; abreviado del inglés, “indolent systemic mastocytosis”), formas intermedias como la SM quiescente o “smoldering” (SSM; abreviado del inglés, “smoldering systemic mastocytosis”) y formas avanzadas de mastocitosis entre las que se incluyen la SM agresiva (ASM; abreviado del inglés, “aggressive systemic mastocytosis”), la SM asociada a otra hemopatía (SM-AHN; abreviado del inglés, “associated hematological neoplasm”) y la leucemia de mastocitos (MCL; abreviado del inglés, “mast cell leukemia”) hasta un total de 6 variantes distintas de SM (Tabla I)^{149,153}. Además, según la clasificación de la OMS 2022, cada uno de estos subtipos de SM podría incluir, junto a las variantes clásicas, una subvariante rara de mastocitosis sistémica bien diferenciada (WDSM; abreviado del inglés, “well-differentiated SM”), descrita previamente^{168,169}.

Al igual que la OMS, en su clasificación de 2022 la ICC identifica las 6 variantes antes referidas (Tabla I) de mastocitosis sistémica, si bien en esta clasificación la BMM queda incluida como una subvariante de ISM¹⁶⁷. Además, aunque en su clasificación la ICC hace referencia a la WDSM, no llega a reflejar esta entidad como una variante o subvariante específica de la enfermedad¹⁶⁷.

Si bien la prevalencia exacta de mastocitosis en la población general sigue siendo desconocida, se estima que se situaría en una tasa aproximada de 1:10.000 individuos

(www.orpha.net) por lo que según la OMS, se considera una enfermedad rara (<5:10.000)¹⁷⁰. Desde el punto de vista demográfico, puede afectar a individuos de cualquier edad, aunque determinados subtipos como la MC, son más frecuentes en niños, mientras que la SM suele presentarse a partir de la segunda década de la vida, con una distribución global similar en hombres y mujeres¹⁷¹.

Tabla I. Clasificación OMS 2022 de la mastocitosis

Mastocitosis cutánea (MC)

MC Urticaria pigmentosa/Maculopapular (MCMP)

MC difusa (MCD)

Mastocitoma cutáneo

Mastocitosis sistémica (SM) *

Mastocitosis de médula ósea (BMM)

Mastocitosis sistémica indolente (ISM)

Mastocitosis sistémica quiescente o smoldering (SSM)

Mastocitosis sistémica agresiva (ASM)

Mastocitosis sistémica asociada a otra neoplasia hematológica (SM-AHN)

Leucemia de mastocitos (MCL)

Sarcoma de mastocitos

Adaptado de Khoury et al.¹⁴⁹

* Esta clasificación incluye la subvariante de WDSM dentro de cada subtipo de mastocitosis sistémica.

2.1 Criterios diagnósticos de mastocitosis sistémica

Dada la gran heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y considerando que la mayoría de los pacientes presentan lesiones cutáneas, un paso crucial en el proceso diagnóstico consiste en determinar si el paciente con mastocitosis presenta una enfermedad restringida a la piel (mastocitosis cutánea) o si, por el contrario, existe afectación sistémica¹⁵³.

La MC se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas asociadas a eritema y edema provocado por contacto físico (“signo de Darier”)¹⁷². Esta manifestación clínica resulta del acúmulo a nivel intraepidérmico de melanocitos ricos en melanina junto con un infiltrado de mastocitos patológicos fácilmente detectables a nivel histológico en una biopsia de piel, y que tras un estímulo físico liberan mediadores (e.g. histamina, triptasa, quimasa y otros compuestos biológicamente activos derivados del ácido araquidónico) a nivel epidérmico¹⁷²⁻¹⁷⁴. Cabe resaltar que, la presencia de mastocitosis en la piel en niños se asocia principalmente con formas cutáneas puras de mastocitosis (MC), en las que no existe afectación de otros órganos y tejidos¹⁷⁵. En cambio, la gran mayoría de los adultos que presentan lesiones cutáneas muestran además, afectación de MO y/o de otros órganos y tejidos extracutáneos, tratándose de formas sistémicas de la enfermedad (SM)^{149,153}. Por ello, la SM constituye la forma más común de mastocitosis en adultos, presentando este subgrupo de pacientes una enfermedad compleja asociada a características clínicas heterogéneas y que abarcan un amplio espectro de manifestaciones y síntomas, incluyendo alteraciones funcionales de determinados órganos, con un grado variable de compromiso de la calidad de vida e incluso de la supervivencia de algunos pacientes¹⁶⁶.

Para una correcta identificación de pacientes portadores de SM, la OMS ha establecido en 2022 una serie de criterios diagnósticos actualizados (Tabla II)¹⁴⁹. Estos incluyen un criterio mayor o principal -presencia de infiltrados de mastocitos multifocales (<15 mastocitos en cada agregado) en MO y/o en otros tejidos diferentes de la piel- y cuatro criterios menores: i) la presencia en muestras de biopsias de MO o de otros tejidos de $\geq 25\%$ de mastocitos con una morfología atípica (mastocitos alargados, con núcleo excéntrico, evaginaciones citoplasmáticas y/o hipogranulados) que pueden formar o no agregados; ii) la expresión aberrante de los marcadores CD25 (cadena α del receptor de la IL-2) y/o CD2 (molécula de adhesión asociada a células activadas) y/o CD30 (receptor del factor de necrosis tumoral) en los mastocitos de MO u otro tejido extracutáneo; iii) niveles basales

de triptasa sérica (sBT; abreviado del inglés, “serum baseline tryptase”) elevados (≥ 20 ng/mL), siempre y cuando no exista una neoplasia mielóide no relacionada; y, iv) la presencia de cualquier mutación que cause activación independiente de ligando en *KIT*¹⁴⁹. En esta última revisión de la clasificación OMS se recomienda además, que en aquellos pacientes con α -triptasemia hereditaria (HaT) confirmada, se corrija al alza el punto de corte para definir niveles elevados de sBT, dividiendo los niveles de sBT del paciente de acuerdo al número de copias extra del gen de la triptasa- α ¹⁴⁹. Según la misma clasificación, para poder establecer el diagnóstico de SM son necesarios la presencia del criterio mayor y de al menos uno de los cuatro criterios menores o, en ausencia del criterio mayor, la presencia simultánea de como mínimo, tres criterios menores^{149,153,176}.

Si bien, en general, la clasificación ICC de 2022¹⁶⁷ parte de los mismos criterios mayor y menores para el diagnóstico de SM, existen algunas diferencias importantes respecto a lo propuesto por la OMS 2022¹⁴⁹. Así, para el criterio mayor, en la ICC se requiere de la demostración en los agregados mastocitarios de MO y/o de otros tejidos extracutáneos de la expresión de CD117 y/o de triptasa citoplasmática, siendo este criterio mayor suficiente para el diagnóstico de SM¹⁶⁷. Además, en la propuesta de la ICC 2022 se consideran también criterios menores la presencia de mastocitos fenotípicamente aberrantes (e.g., positivos para CD25 y/o CD2 y/o CD30) y de la mutación activante de *KIT* en sangre; finalmente, la ICC no recomienda la corrección de las cifras de sBT en sujetos con HaT¹⁶⁷.

Tabla II. Criterios diagnósticos OMS 2022 para SM**Criterio mayor**

1. **Presencia de infiltrados de mastocitos multifocales (≥ 15 mastocitos en cada foco) en MO y/o en otros tejidos extracutáneos**

Criterios menores

1. Presencia en MO u otros órganos de rasgos morfológicos atípicos en $\geq 25\%$ de los mastocitos del infiltrado (e.g., forma de huso u otra morfología atípica).
2. Expresión aberrante de los marcadores CD25 y/o CD2 y/o CD30 en los mastocitos de MO u otros tejidos extracutáneos.
3. Niveles basales de triptasa sérica elevados (≥ 20 ng/mL) (excepto cuando exista una neoplasia mieloide no relacionada) que deberán corregirse en el caso de la presencia de HaT.
4. Presencia de una mutación activante de *KIT* en MO u otro tejido extracutáneo.

El diagnóstico de SM se cumple si:

- **Criterio mayor + ≥ 1 criterio menor o,**
- **≥ 3 criterios menores**

Adaptado de Khoury et al.¹⁴⁹

MO, médula ósea; OMS, Organización Mundial de la Salud; SM, mastocitosis sistémica.

2.2 Subtipos diagnósticos de mastocitosis

Como hemos descrito anteriormente, en la actualidad la mastocitosis se divide en 3 grandes grupos de pacientes con formas de presentación y un comportamiento clínico y pronóstico diferentes: (i) MC, (ii) SM y (iii) sarcoma de mastocitos¹⁴⁹. A su vez la MC y la SM se subdividen en tres y seis variantes distintas según la OMS¹⁴⁹. A continuación, revisaremos los aspectos más relevantes de cada uno de estos subtipos diagnósticos de mastocitosis y sus variantes.

2.2.1 Mastocitosis cutánea

Según los criterios establecidos por la OMS¹⁴⁹, la MC se caracteriza por la presencia de mastocitos patológicos en lesiones cutáneas, como consecuencia de la infiltración de la piel por las células tumorales, en ausencia de criterios histológicos, citomorfológicos, fenotípicos y moleculares de afectación de MO o de otros órganos y tejidos, asociando o

no este cuadro a sintomatología relacionada con la liberación de mediadores mastocitarios a nivel local o sistémico. Así mismo, según la OMS¹⁴⁹, la MC debe subclasificarse de acuerdo con la forma de presentación de la enfermedad en la piel, en tres subtipos principales: i) mastocitosis cutánea maculopapular (MCMP) conocida frecuentemente también como urticaria pigmentosa (UP); ii) mastocitosis cutánea difusa (MCD); y, iii) mastocitoma cutáneo. Desde el punto de vista epidemiológico, la MC suele manifestarse (y diagnosticarse) en los primeros años de vida, remitiendo de forma espontánea en muchos niños durante la prepubertad o la pubertad¹⁵³.

De las diferentes variantes de MC, la MCMP o UP representa el subtipo más prevalente, tanto en niños como en adultos¹⁷³. Entre los niños, esta variante representa entre 70% y 90% de los casos, habiéndose descrito dos subtipos de MCMP: una variante con lesiones monomórficas de pequeño tamaño, y una segunda variante con lesiones polimórficas de aspecto variable y que frecuentemente tienen un mayor tamaño^{172,177}. En esta última variante, las lesiones predominan en el tronco y en las zonas próximas a la raíz de las extremidades. No obstante, dado que en adultos la variante monomórfica es, de ambas, la única que se manifiesta, se piensa que sólo esta variante monomórfica de los niños podría persistir en etapas más avanzadas de la vida, en la transición a la edad adulta^{153,172,177}.

A su vez, las MCD (1-3% de los casos de MC) constituyen una variante que aparece de forma exclusiva en niños y que se caracteriza habitualmente por asociarse a un engrosamiento de la piel, sin bordes bien delimitados y con aspecto de “piel de naranja”, junto a cifras más elevadas de sBT¹⁷⁷. En este tipo de lesiones cutáneas, los infiltrados de mastocitos se localizan a modo de banda en la dermis papilar y suprarreticular¹⁷⁸. En las formas más graves de MCD, las manifestaciones clínicas derivan de una mayor (y más extensa) liberación de mediadores mastocitarios, reflejada con frecuencia, en la formación

de vesículas en las zonas de piel más afectadas y niveles de sBT más elevados, asociados a cuadros de flushing, hipotensión y/o colapso vascular^{172,177-180}.

Finalmente, el mastocitoma cutáneo (presente en 10-35% de las mastocitosis cutáneas de niños) se caracteriza por la presencia de una lesión única, de aspecto ovalado y tamaño variable, formada por mastocitos de aspecto maduro¹⁷⁷. Habitualmente el mastocitoma cutáneo se localiza en el tronco y las extremidades, afectando la dermis papilar y reticular, si bien en algunos pacientes puede extenderse a capas más profundas de la dermis¹⁸¹. Esta variante se observa de forma prácticamente exclusiva en niños, remitiendo espontáneamente en la mayoría de los pacientes antes que estos alcancen la edad adulta^{172,179}.

2.2.2 Mastocitosis sistémica

La SM constituye la forma más prevalente de mastocitosis en adultos, y se caracteriza por ser una enfermedad compleja y muy heterogénea, asociada a un amplio espectro de manifestaciones clínicas relacionadas con la infiltración y acumulación de mastocitos en diferentes órganos y tejidos, y su activación asociada a la liberación de un amplio espectro de mediadores mastocitarios^{182,183}. Transcripcionalmente, el mastocito es una de las células inmunes más pleiomórficas, como es atestiguado por la existencia de distintos fenotipos específicos de tejido, con diferencias en el contenido granular, los patrones de expresión de citoquinas y receptores de membrana¹⁸⁴. Esta heterogeneidad de los mastocitos de diferentes tejidos podría estar implicada, al menos en parte, en el amplio abanico de manifestaciones clínicas observadas en la SM (Figura 5)¹⁸⁵.

En términos generales, entre las manifestaciones clínicas más habituales de los pacientes con diferentes formas de SM, se incluyen: i) síntomas constitucionales como pérdida de peso, dolor, náusea o fatiga, asociados clínicamente con la liberación por parte del mastocito de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH; abreviado del inglés,

“corticotropin-releasing hormone”), la histamina, la IL-6 y TNF α , y ii) síntomas asociados a la liberación de mediadores inducidos por diferentes estímulos tales como el estrés, alérgenos, fármacos u otros elementos, que dependerán principalmente de la localización tisular de los mastocitos que responden a dichos estímulos^{157,185,186}. Así, los pacientes con SM a nivel del tubo digestivo presentan con frecuencia diarrea, dolor abdominal, reflujo esofágico y vómito, manifestaciones que se asocian con la producción y liberación a nivel local, de mediadores como la CRH, histamina, IL-6, neurotensina, PGD₂, serotonina, TNF α y triptasa¹⁸⁵. Por otro lado, a nivel de la piel, los pacientes pueden presentar manifestaciones cutáneas como prurito, angioedema y flushing, que se han relacionado con la secreción mastocitaria de CRH, histamina, IL-6, IL-8, IL-33, PGD₂, TNF α y triptasa¹⁸⁵, mientras que a nivel musculoesquelético, son especialmente relevantes, desde el punto de vista clínico, la afectación ósea reflejada por un lado en osteopenia, osteoporosis y lesiones líticas, aparentemente relacionadas con la liberación de mediadores como la IL-6, el IFN γ , PGD₂, TNF α , triptasa y el ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL; abreviado del inglés, “receptor activator of nuclear factor- κ B ligand”), y por otra parte, en la presencia de osteoesclerosis asociada a niveles elevados de CCL5 y descenso de los niveles de IFN γ y RANKL, entre otros mediadores^{185,187}. En el ámbito neurológico, destacan síntomas como la ansiedad, la depresión, la pérdida de concentración y memoria, la migraña o el insomnio, asociados a la producción de CRH, IL-6, histamina, PGD₂ y TNF α , mientras que, a nivel cardiovascular, caben señalar síntomas y signos (relacionados con CRH, IL-6, quimasa, renina, histamina, triptasa y TNF α) como el síncope, taquicardia, anafilaxia e hipotensión,¹⁸⁵. También es habitual encontrar pacientes con SM que presentan manifestaciones respiratorias relacionadas con la liberación de histamina, leucotrienos, IL-6 y PGD₂ como: congestión nasal, sibilancias, hinchazón de garganta o falta de aliento¹⁸⁵. Otras manifestaciones clínicas, y en especial aquellas debidas a la afectación funcional de uno o más órganos y tejidos como la MO o el hígado, son menos

frecuentes y características de las formas más avanzadas de la enfermedad, al ser debidas a un mayor grado de infiltración tisular por mastocitos activados (aunque más inmaduros), con la consiguiente disfunción del órgano infiltrado^{157,186}.

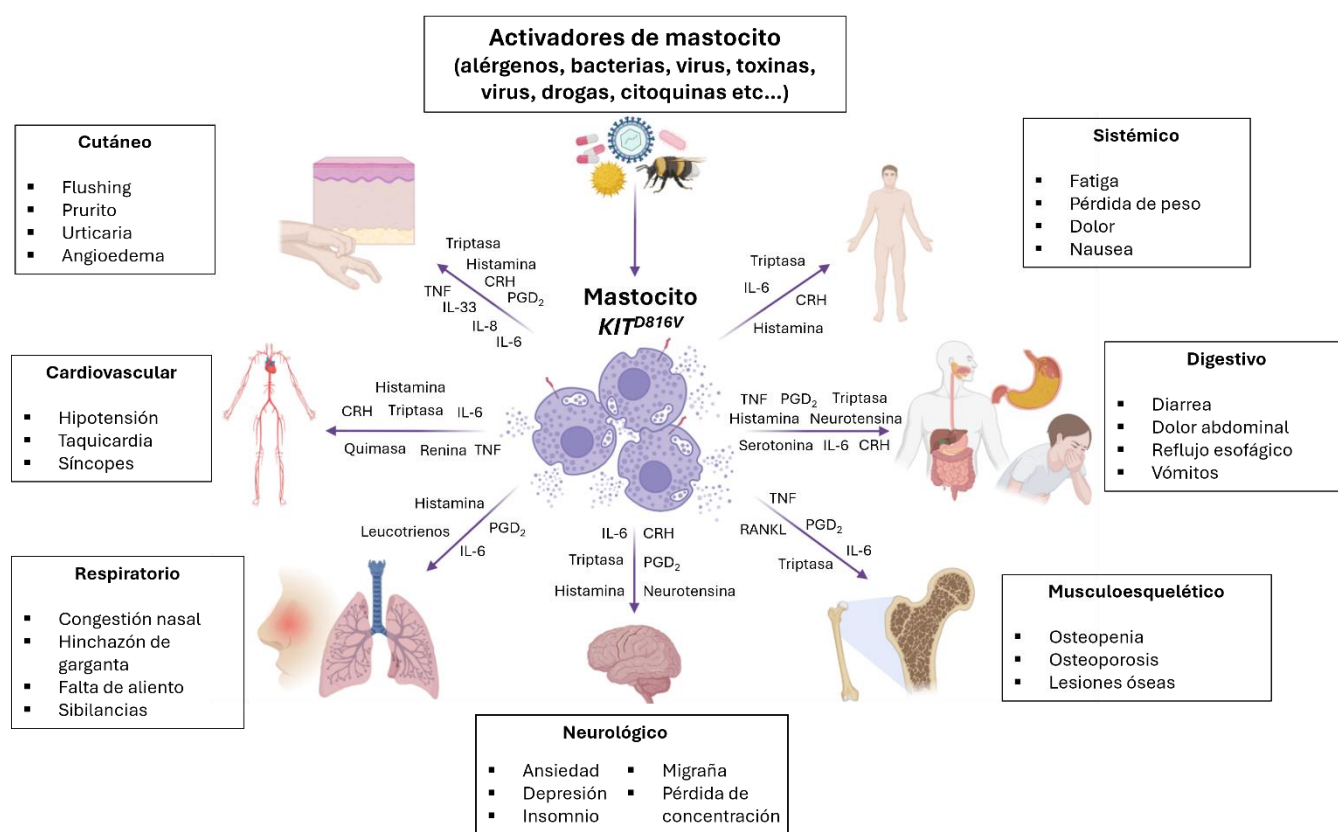


Figura 5: Síntomas y manifestaciones clínicas asociadas a la liberación de mediadores por parte del mastocito característicos de pacientes con SM (adaptado de Theoharides et al.¹⁸⁵).

CRH, hormona liberadora de la corticotropina; IL, interleuquina; PGD₂, prostaglandina D₂; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear κ B; TNF, factor de necrosis tumoral.

Tal y como hemos referido anteriormente, la clasificación OMS de 2022¹⁴⁹ subdivide la SM en 6 subtipos diagnósticos diferentes, dependiendo del patrón de afectación tisular de la enfermedad, reflejado en gran parte, en la presencia vs ausencia de los denominados hallazgos B (*B-findings*; abreviado del inglés, ‘burden of disease findings’) asociados habitualmente a un curso relativamente benigno de la enfermedad, y la presencia/ausencia

de los conocidos como hallazgos C (*C-findings*; abreviado del inglés, ‘cytoreduction-requiring’) que habitualmente reflejan la afectación funcional de uno o más órganos y tejidos asociado a la necesidad de emplear tratamientos citorreductores¹⁵³. Merece destacar que en el caso de los hallazgos de tipo C, no estarían incluidos entre ellos, los déficits funcionales de un órgano o tejido producidos por una neoplasia hematológica asociada, y los secundarios, por ejemplo, a infecciones o a terapias citorreductoras¹⁵³.

Tanto la clasificación OMS¹⁴⁹ como la ICC¹⁶⁷ consideran, para la definición de hallazgo B, 3 criterios diferentes: i) hallazgos relacionados con una alta carga de mastocitos, como son una infiltración de MO por mastocitos $\geq 30\%$ de la celularidad global medida mediante técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y/o niveles de sBT $\geq 200\text{ng/mL}$ y/o una frecuencia alélica de la variante (VAF; abreviado del inglés, “variant allele frequency”) de *KIT*^{D816V} $\geq 10\%$ en MO o sangre periférica (SP); ii) signos de mieloproliferación y/o mielodisplasia, tales como la presencia de una MO hipercelular con indicios de displasia, en ausencia de criterios diagnósticos de síndrome mielodisplásico (SMD) o de neoplasia mieloproliferativa (NMP); y, iii) organomegalias, que incluyen la presencia de adenopatías (>2 cm según la OMS y $>1\text{cm}$ según la ICC) y/u otras organomegalias palpables (e.g. esplenomegalia y/o hepatomegalia) en ausencia de afectación funcional del órgano involucrado. A su vez, en ambas clasificaciones constituyen hallazgos de tipo “C” la presencia de: i) citopenias consistentes en hemoglobina (Hb) <100 g/L y/o recuentos en sangre de granulocitos neutrófilos $<1.0 \times 10^9/\text{L}$ y/o de plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$; ii) hepatopatía (e.g., hígado cirrótico o hepatomegalia asociada a aumento de los niveles séricos de enzimas hepáticas, ascitis y/o hipertensión portal); iii) afectación del bazo con esplenomegalia palpable e hiperesplenismo; iv) malabsorción con hipoalbuminemia y pérdida de peso debida a la infiltración de mastocitos en el tracto gastrointestinal; y/o, v) la presencia de lesiones osteolíticas de gran tamaño (≥ 2 cm) y/u osteoporosis severa asociada a fracturas patológicas (Tabla III)¹⁵³.

Tabla III. Hallazgos de tipo B y C empleados para la clasificación de pacientes con SM según los criterios OMS 2022 e ICC 2022

Hallazgos tipo B	Hallazgos tipo C
Alta carga mastocitaria: • Infiltración mastocitaria $\geq 30\%$ analizada en biopsia de MO mediante IHQ, y/o • sBT $\geq 200\text{ng/mL}$, y/o • VAF de $KIT^{D816V} \geq 10\%$ en MO o SP* Signos de mieloproliferación y/o mielodisplasia: • MO hipercelular con signos de displasia y sin criterios de SMD/NMP Organomegalias: • Hepatomegalia palpable sin ascitis u otros signos de daño hepático, o • Esplenomegalia sin hiperesplenismo y sin pérdida de peso, y/o • Linfadenopatía palpable ($>2\text{cm}$)**	Citopenia(s): • Hb $<100\text{g/L}$ • N° de neutrófilos $<1.0 \times 10^9/\text{L}$ • N° de plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$ Hepatopatía: • hepatomegalia asociada a aumento de enzimas hepáticas, ascitis y/o hipertensión portal. Afectación esplénica: • esplenomegalia palpable con hiperesplenismo Afectación gastrointestinal: • malabsorción con hipoalbuminemia y pérdida de peso Afectación ósea: • lesiones osteolíticas de gran tamaño ($\geq 2\text{ cm}$) y/u osteoporosis severa con fracturas patológicas

Adaptado de Khoury et al.¹⁴⁹ y de Arber et al.¹⁶⁷.

* No incluida en la clasificación ICC 2022.

** $<1\text{ cm}$ según la clasificación ICC 2022.

Hb, hemoglobina; ICC; Consenso internacional de Clasificación; IHQ; inmunohistoquímica; MO, Médula ósea; NMP; neoplasias mieloproliferativas; OMS, Organización Mundial de la Salud; sBT, niveles basales de triptasa sérica; SMD, síndrome mielodisplásico; SP, sangre periférica; VAF, frecuencia de variante alélica.

En términos generales, la ausencia de hallazgos de tipo C se asocia con formas indolentes de la enfermedad, distinguiendo los hallazgos de tipo B entre BMM e ISM por un lado y SSM por otra parte¹⁵³. Por el contrario, la presencia de hallazgos de tipo C sería característica de las formas avanzadas de SM, asociadas a un comportamiento clínico más

agresivo y peor pronóstico¹⁵³. A diferencia de lo que ocurre en la clasificación ICC de 2022¹⁶⁷, en la actualización de la clasificación de la OMS de ese mismo año¹⁴⁹, se identifica por primera vez la BMM como una variante independiente de otras formas indolentes de SM. Esto se debe a las características específicas y únicas de este grupo de pacientes como: la ausencia de lesión cutánea en prácticamente todos los casos, asociada a una baja carga mastocitaria y mutacional (en ausencia de hallazgos B), y muy buen pronóstico¹⁵⁷. Estas características distinguen la BMM de otras ISM sin lesión cutánea, pero con mayor carga mutacional, junto a niveles de triptasa más elevados (>200 ng/mL) (hallazgos B) y un peor pronóstico, que deben seguir siendo diagnosticados como ISM sin lesión cutánea y no como BMM^{153,188}. A continuación, describimos de forma específica las características típicas de cada una de las diferentes variantes de SM reconocidas como tal en la bibliografía^{157,186,189–191}.

2.2.2.1 Mastocitosis de médula ósea (BMM)

La primera referencia que encontramos en la bibliografía sobre la BMM es de 1991, cuando Metcalfe et al.¹⁹² describieron una variante de ISM sin lesión cutánea. Más tarde, en 2008, Vardiman et al.¹⁹³ describieron por primera vez un grupo de pacientes con una variante de ISM con afectación preferentemente de MO, baja carga mastocitaria, asociada a síndrome de activación mastocitaria en ausencia de lesiones cutáneas, acuñando el término de BMM. En 2008 estos autores proponen la inclusión de esta variante de SM de MO en su propuesta de clasificación de las SM, destacando la importancia de los hallazgos histológicos y moleculares características, para el diagnóstico y manejo de esta variante de la enfermedad. Esta referencia es esencial para la comprensión de la BMM como una entidad clínica específica y diferenciada de otras formas de mastocitosis sistémica, y en especial, de ISM. No obstante todo lo anterior, y aunque el término BMM empezó a acuñarse en la literatura hace casi 20 años, no se ha reconocido la BMM como una entidad independiente según la OMS, hasta 2022, permaneciendo ésta aún en la clasificación ICC

como una subvariante de ISM^{149,167}. Tal como hemos referido anteriormente, la decisión, de incluir la BMM como una entidad diferente de la ISM, deriva de la necesidad de identificar de forma específica estos pacientes que presentan mejor pronóstico, y distinguirlos de la ISM típica, que muestra tasas de supervivencia libre de progresión a los 10 años ligeramente inferiores (96% vs 93%)^{153,157,188}. Estos pacientes, además de presentar un mejor pronóstico asociado a una baja tasa de progresión, muestran un acúmulo de mastocitos clonales restringido a MO con niveles bajos o moderados de infiltración medular, en ausencia de lesiones cutáneas, asociado a niveles de sBT normales o ligeramente aumentados (<125 ng/mL), en ausencia de hallazgos de tipo B y C^{157,194}.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes con BMM suelen presentar síndromes de activación mastocitaria, asociados con frecuencia, a periodos asintomáticos¹⁹¹. Los síntomas pueden variar considerablemente entre diferentes pacientes, lo que unido a la ausencia de lesiones cutáneas, supone que el diagnóstico de este subtipo de SM se convierta en muchos casos en un auténtico reto¹⁹¹. Cabe destacar que los pacientes con BMM de edad avanzada, en su mayoría varones, tienden a mostrar reacciones anafilácticas con menos síntomas relacionados con liberación de mediadores¹⁵⁷; además, con frecuencia, los episodios de anafilaxia presentan una fuerte asociación con reacciones alérgicas graves^{157,191,195}. Además cabe señalar que, aunque en general los niveles más elevados de mediadores mastocitarios están estrechamente relacionados con una mayor carga mastocitaria en MO, en estos pacientes no se observa una correlación significativa entre (la intensidad y tipo de) los síntomas asociados a la liberación de mediadores por parte del mastocito y los niveles de los primeros en sangre/plasma¹⁵⁷. Por otra parte, estos pacientes presentan una fuerte asociación con anafilaxia severa, frecuentemente desencadenada por picaduras de himenópteros, y, en menor medida, por medicamentos, alimentos o de causa desconocida (idiopática)^{196,197}. La elevada prevalencia de anafilaxia es superior entre los pacientes con BMM, respecto a la observada en la ISM típica con

lesiones cutáneas (90% vs 24.5%)¹⁹⁸. Por último, merece destacar que con relativa frecuencia, los pacientes con BMM presentan osteopenia y osteoporosis, pudiendo esta afectación ósea incluso presentarse como el único síntoma de la enfermedad, constituyendo un signo de sospecha de BMM en varones jóvenes con baja densidad mineral ósea (DMO), pese a mostrar una baja carga mastocitaria, y niveles séricos normales de triptasa y otros mediadores mastocitarios. Hasta la fecha no se ha podido establecer con precisión la causa de las alteraciones óseas antes descritas¹⁹¹.

2.2.2.2 Mastocitosis sistémica indolente (ISM)

La ISM se considera el subtipo más frecuente de SM¹⁵⁷. Habitualmente, la ISM se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas típicas asociadas a un infiltrado por mastocitos patológicos en MO (con o sin la formación de agregados mastocitarios). Igualmente, en la ISM es frecuente la presencia de mastocitos con morfología atípica y expresión aberrante de las moléculas CD25 y/o CD2 en su membrana, junto a positividad para la mutación D816V (u otras mutaciones) de *KIT*^{5,199}. Desde el punto de vista histológico, la cantidad de mastocitos en la biopsia de MO suele ser relativamente baja a moderada (<5-10% de la celularidad de MO) en ausencia de hallazgos B y C^{157,194}. A nivel sérico, los valores basales de triptasa, aunque suelen estar aumentados, habitualmente se sitúan entre 20 y 200 ng/mL, existiendo no obstante pacientes que presentan valores normales de esta enzima en suero¹⁵⁷. Además, este subtipo de SM también se caracteriza por la coexistencia de lesiones cutáneas asociadas con frecuencia a síntomas relacionados con la liberación local y/o sistémica de mediadores mastocitarios, si bien, una pequeña proporción de casos no presentan afectación cutánea²⁰⁰. En general, los pacientes con ISM muestran un buen pronóstico con una esperanza de vida ligeramente inferior a la de la población general. Esto último es debido a que existe un pequeño porcentaje de casos (1-3%) en los que la enfermedad progresa con el paso del tiempo a formas más avanzadas de SM (e.g. SSM o ASM e incluso, SM-AHN y MCL)^{190,194,201}.

2.2.2.3 Mastocitosis sistémica quiescente (SSM)

La SSM representa desde 2016^{175,202} y según la OMS¹⁴⁹ (y más recientemente la ICC)¹⁶⁷, un subtipo diagnóstico de SM con entidad propia. Tras las actualizaciones de las clasificaciones de la mastocitosis de 2022^{149,167}, la SSM se define por la presencia de ≥ 2 hallazgos de tipo B, que incluyen ahora una VAF de *KIT*^{D816V} elevada en ausencia de hallazgos de tipo C y de criterios diagnósticos característicos de pacientes de MCL y AHN¹⁵³. Dado que el pronóstico de estos sujetos es menos favorable que el de los pacientes diagnosticados de BMM y ISM, con una supervivencia global intermedia entre la de la ISM y la de las formas avanzadas de SM, habitualmente se recomienda realizar un seguimiento estrecho de los mismos que permita detectar de forma temprana signos de progresión de la enfermedad^{200,203,204}. En este sentido se han identificado como parámetros más útiles para seguimiento de estos pacientes, los niveles séricos de sBT y de la fosfatasa alcalina, y la VAF de *KIT*^{D816V} en sangre^{205–207}. Las modificaciones en estos parámetros a lo largo de la evolución de la enfermedad suelen asociarse en el tiempo con la aparición de hallazgos B y C, y/o la presencia de blastos, en cuyo caso debe repetirse el examen de la médula ósea²⁰⁸.

2.2.2.4 Mastocitosis sistémicas avanzadas: ASM, SM-AHN y

MCL

Dentro de las SM avanzadas se engloban tres subtipos diagnósticos distintos de la enfermedad - la ASM, SM-AHN y la LMC – que presentan en común al menos un hallazgo de tipo C (Tabla III). La ASM constituye aproximadamente el 5-10% de todas las SM¹⁸⁹. Habitualmente en estos pacientes se observa una infiltración marcada de mastocitos en MO, que debe ser menor al 20%, asociada con frecuencia a esclerosis ósea, lesiones osteolíticas y/o focos escleróticos visibles mediante técnicas de imagen¹⁵³. Además, los mastocitos de pacientes con ASM suelen expresar en la membrana citoplasmática las proteínas CD25 (con o sin CD2) y CD30, y su inmunofenotipo suele ser relativamente

inmaduro (e.g. bajos niveles de expresión de FcεRI)²⁰⁹. La práctica totalidad de los pacientes que presentan ASM son portadores de la mutación D816V de *KIT*, no sólo en los mastocitos patológicos, sino también en células de otras líneas mieloides y linfoides de MO y SP^{156,210}. Por lo general, este subtipo de SM debuta sin la presencia de lesiones cutáneas, ni síntomas locales relacionados con la liberación de mediadores mastocitarios²¹¹. En los últimos años, se ha propuesto subdividir las ASM en función del porcentaje de mastocitos presentes en MO en ASM típica (cuando se observan <5% de mastocitos en el aspirado de MO) y ASM en transformación a leucemia de mastocitos (cuando el porcentaje de mastocitos en la citología del aspirado medular oscila entre 5% y 19%), asociándose este último subtipo a una progresión más rápida de la enfermedad y un mayor deterioro funcional de los órganos infiltrados por las células tumorales^{153,189}.

La SM asociada a otra hemopatía (SM-AHN) constituye el subgrupo más numeroso de SM avanzadas y a la vez el más heterogéneo también, tanto desde el punto de vista clínico como pronóstico. Esto es debido principalmente a dos factores: el subtipo de SM y la neoplasia hematológica concreta a la que ésta se asocia^{157,190,200,212}. Las neoplasias hematológicas que se asocian a SM en este grupo de pacientes, son mayoritariamente de naturaleza mieloide, siendo en orden decreciente, la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), los SMD y la leucemia mieloblástica aguda (LMA), las hemopatías malignas más habituales²¹³. En una menor proporción de casos, el componente mastocitario de la SM-AHN se asocia a hemopatías linfoides, como la leucemia linfática crónica (LLC), distintos subtipos de linfomas no-Hodgkin (LNH) o incluso el mieloma múltiple^{153,212,214}. En este contexto cabe recordar que los trastornos clonales considerados estadios previos a una hemopatía maligna (e.g. gammapatía monoclonal de significado incierto, linfocitosis B monoclonal o hematopoyesis clonal de pronóstico indeterminado), no se considera que constituyan AHN, y por lo tanto, no representan condiciones que modifique el diagnóstico de cualquier subtipo de SM a SM-AHN¹⁵³. En general, para el diagnóstico de SM-AHN deben

aplicarse, por un lado, los criterios diagnósticos OMS o ICC de SM, y por otra parte, los criterios propuestos para el diagnóstico de la hemopatía asociada²⁰². 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 AHN¹⁵⁷, siendo en general desfavorable si lo comparamos con otras formas no avanzadas de la enfermedad, o incluso la ASM²¹⁴⁻²¹⁶.

Finalmente la MCL, constituye de todas las variantes de SM avanzadas (y no avanzadas) la menos frecuente, la más agresiva y la de peor pronóstico²¹⁷. En términos globales, la MCL constituye <1% de todas las SM^{157,189}. Para su diagnóstico, según la OMS 2022¹⁴⁹, se requiere de la presencia de una infiltración por células tumorales >20% en aspirados de MO (o incluso en la biopsia de MO según la ICC)¹⁶⁷ hallazgo que suele asociarse con una diseminación en sangre y/o infiltración de otros órganos y tejidos, provocando en última instancia un déficit funcional del órgano (o de los órganos) afectado(s)^{153,218}. Desde el punto de vista clínico, la MCL constituye un subtipo diagnóstico muy heterogéneo ya que puede debutar como leucemia primaria o secundaria a otras formas de SM, con presencia o no de lesiones cutáneas, y un inmunofenotipo muy variable de los mastocitos desde células maduras a precursores pobremente diferenciados, aunque con expresión aberrante de CD25 y/o CD2²¹⁹. La mutación D816V de *KIT* se encuentra en un porcentaje variable (46-68%) de los casos, mientras que en cerca del 20% de los pacientes se detectan otras mutaciones de este gen^{194,217,220}. Desde el punto de vista pronóstico, antes de la llegada de los nuevos inhibidores de tirosina quinasa (e.g., *KIT*^{D816V}), la esperanza de vida de los pacientes con MCL mostraba medianas cercanas a los 10-24 meses²⁰⁴.

2.2.2.5 Mastocitosis sistémica bien diferenciada

Como ya comentamos anteriormente, la WDSM es reconocida por la OMS 2022¹⁴⁹ (pero no por la ICC 2022)¹⁶⁷ como una variante morfológica que puede darse en cualquier subtipo de SM, caracterizada por presentar mastocitos redondeados e hipergranulados que infiltran la piel y la MO. En la mayoría de los pacientes con WDSM, no se detecta la mutación *KIT*^{D816V}, y los mastocitos neoplásicos suelen ser negativos para la expresión de CD25 y CD2¹⁶⁸; sin embargo, de forma habitual se encuentran otras mutaciones en *KIT* como las mutaciones *KIT*^{K509I} o *KIT*^{F522C}, además de positividad para CD30¹⁵³. Un aspecto relevante de estos pacientes, reside en que muchos de ellos presentan mutaciones distintas a *KIT*^{D816V} susceptibles de responder a inhibidores convencionales de tirosina quinasas como imatinib^{153,168}.

3. El sistema inmune en la mastocitosis sistémica

Si bien en la gran mayoría de pacientes diagnosticados de SM se demuestra la presencia, en común, de la mutación *KIT*^{D816V}, la enfermedad muestra un comportamiento clínico y evolutivo muy variable y altamente heterogéneo, incluso dentro de un mismo subgrupo diagnóstico²²¹. Estos hallazgos demuestran que la presencia de una mutación activante de *KIT* en los mastocitos patológicos no explica, por sí sola, el comportamiento clínico y evolutivo variable de la enfermedad, ni el amplio abanico de manifestaciones clínicas y síntomas de la misma y su diferente respuesta a los nuevos tratamientos con fármacos que inhiben de forma específica *KIT*^{D816V}, por ejemplo, en las formas avanzadas de SM y en la ISM^{222–225}. En conjunto estos hallazgos sugieren que en la SM, aunque las manifestaciones clínicas de la enfermedad sean debidas en gran medida a la masa tumoral, el patrón de afectación de diferentes órganos y tejidos, y a los síntomas y signos de la enfermedad derivados de una liberación incrementada de mediadores mastocitarios, el mastocito por sí solo no explicaría el amplio abanico de manifestaciones clínicas y

síntomas observados. En ese sentido, cabe recordar que el mastocito es una célula relevante del sistema inmune, cuya alteración podría tener efectos directos o indirectos (mediados por otras células inmunes) sobre los tejidos diana de sus mediadores.

Recientemente, algunos estudios han descrito la existencia de perfiles inmunes alterados en pacientes con SM²²⁶⁻²³¹, sugiriendo la posible existencia de efectos desencadenados por el mastocito patológico sobre otras células del sistema inmune de estos pacientes, como consecuencia de la activación constitutiva de *KIT* presente en la SM. Así, a nivel sistémico, se ha descrito un aumento en los niveles plasmáticos de IL-1 β , IL-6 y CCL23 en pacientes con ISM y ASM, correlacionándose el incremento de estas citocinas y quimiocinas en plasma con un mayor grado de severidad y una mayor tasa de progresión de la enfermedad²³¹. Además, se ha sugerido que la IL-6 podría contribuir a la activación constitutiva y la acumulación de mastocitos patológicos en la SM²³². Aunque algunos autores, como Tobío et al.²³³, identificaron al mastocito como la principal fuente de IL-6 en los pacientes diagnosticados de SM. Sin embargo, otros autores han demostrado una baja expresión génica de IL-6 en los mastocitos purificados de MO de pacientes con ISM y ASM²⁰⁹, que sin embargo, presentaban niveles elevados de IL-6 en plasma²³¹, lo cual sería probablemente debido a una producción y secreción incrementadas por parte de otras células de la inmunidad innata como el monocito/macrófago²³⁴. Estos hallazgos sugieren que otras células inmunitarias distintas del mastocito y capaces de producir IL-6 y otras citoquinas inflamatorias, podrían estar implicados (y alterados) en la SM contribuyendo a determinar, y explicar también, el comportamiento clínico y evolutivo heterogéneo de la enfermedad.

En este sentido, recientemente se ha asociado el incremento de los niveles solubles de IL-6 e IL-1 β , junto a otros marcadores proinflamatorios, a una inmunidad innata entrenada, un término que refleja la reprogramación epigenética y metabólica a medio

plazo de células inmunitarias innatas como los monocitos, y que se considera pueda actuar como un elemento modulador, en la protección contra infecciones y los efectos de la respuesta inflamatoria²³⁵. Este entrenamiento se desencadenaría tras un estímulo (por ejemplo antigénico) inicial, seguido de un período de reposo durante el que podría tener lugar una respuesta alterada a un estímulo posterior no relacionado que ocurriera en ese momento^{236–238}. Merece destacar que, dado que muchas células de la inmunidad innata tienen una vida media relativamente (muy) corta, los efectos funcionales descritos en la inmunidad entrenada, cuya duración comprende varias semanas y en algunos casos, incluso varios meses (e.g., hasta un año), se consideran residirían en la reprogramación inmunitaria de las células madre hematopoyéticas de la MO²³⁶. Como resultado de esta reprogramación de los precursores hematopoyéticos, las células mieloides recién producidas presentarían ya las características típicas de la inmunidad entrenada^{236,239–241}. Cabe señalar que este efecto está bien documentado en los monocitos, células que se ha demostrado que bajo estas circunstancias presentan un aumento de la producción de IL-1 β , TNF α e IL-6²³⁶. Algunas de estas citoquinas son además, inductoras de respuestas Th17²³⁵, por lo que el microambiente creado por las células innatas entrenadas podría llegar a tener incluso efectos adicionales sobre la diferenciación, polarización y función de distintos subtipos de linfocitos. En este sentido, en la alergia alimentaria, se han descrito alteraciones en la distribución de los monocitos y las células T CD4⁺ en la sangre, asociadas a una mayor producción de TNF α , IL-6 e IL-1 β ²⁴². En su conjunto, estos hallazgos sugieren que células inmunes innatas como los monocitos, inducidos por la inmunidad entrenada o por cambios epigenéticos en la MO, podrían constituir la principal fuente de producción de citoquinas inflamatorias que, como la IL-6, afectarían de forma directa la diferenciación y distribución de otras células inmunes en sangre, y por lo tanto la respuesta inmunitaria del individuo.

De acuerdo con esta hipótesis, en los últimos años se han generado nuevas evidencias que apoyan la existencia de una respuesta inmunitaria innata y adaptativa alterada en pacientes con SM²²⁶⁻²³⁰. Así, Hermans et al.²²⁷ describieron la existencia de una disminución significativa del número de pDC y de monocitos circulantes en sangre de pacientes con ISM, con respecto a adultos sanos. De forma similar, van del Ploeg et al.²²⁶ describieron un aumento en el recuento de las células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2; abreviado del inglés, “type 2 innate lymphoid cells”) en sangre en pacientes con ISM portadores de la mutación *KIT*^{D816V}, tanto respecto a otros pacientes que no presentaban esta mutación, como a adultos sanos. Además, los niveles más elevados de ILC2 en sangre se asociaban de forma específica con manifestaciones cutáneas como el prurito, independientemente de los niveles de triptasa sérica^{226,230}. En consonancia con estos hallazgos, Ercolano et al.²³⁰ mostraron que las células ILC2 de pacientes con SM podrían estar actuado sobre las células Tregs a través de un mecanismo inductor de hiporreactividad a IL-9, causado por una reducción en la expresión del receptor de IL-9 en las ILC2. En conjunto, estos resultados apuntan la posibilidad de que las alteraciones descritas en células innatas de pacientes con ISM, puedan influir también, sobre los componentes de la respuesta adaptativa. De acuerdo con ello, Kulinski et al.²²⁸ observaron que los pacientes con ISM presentan valores absolutos de células T CD8⁺ y NK en sangre significativamente disminuidos, traducándose este descenso en un aumento de la frecuencia media de células T CD4⁺ y del cociente entre células T CD4⁺/T CD8⁺, respecto a los niveles observados en adultos sanos. En línea con estos resultados, Hermans et al.²²⁷, encontraron también un incremento numérico en sangre de pacientes con ISM de células T CD4⁺ con fenotipo Th 2, junto a valores normales de linfocitos B totales analizadas por estos autores. De acuerdo con estas observaciones, Makovoz et al.²²⁹ reportaron niveles séricos normales de inmunoglobulinas en pacientes con SM, asociados en algunos pacientes, a un descenso de IgG o IgM y/o IgA, sin que existiera evidencia de una asociación

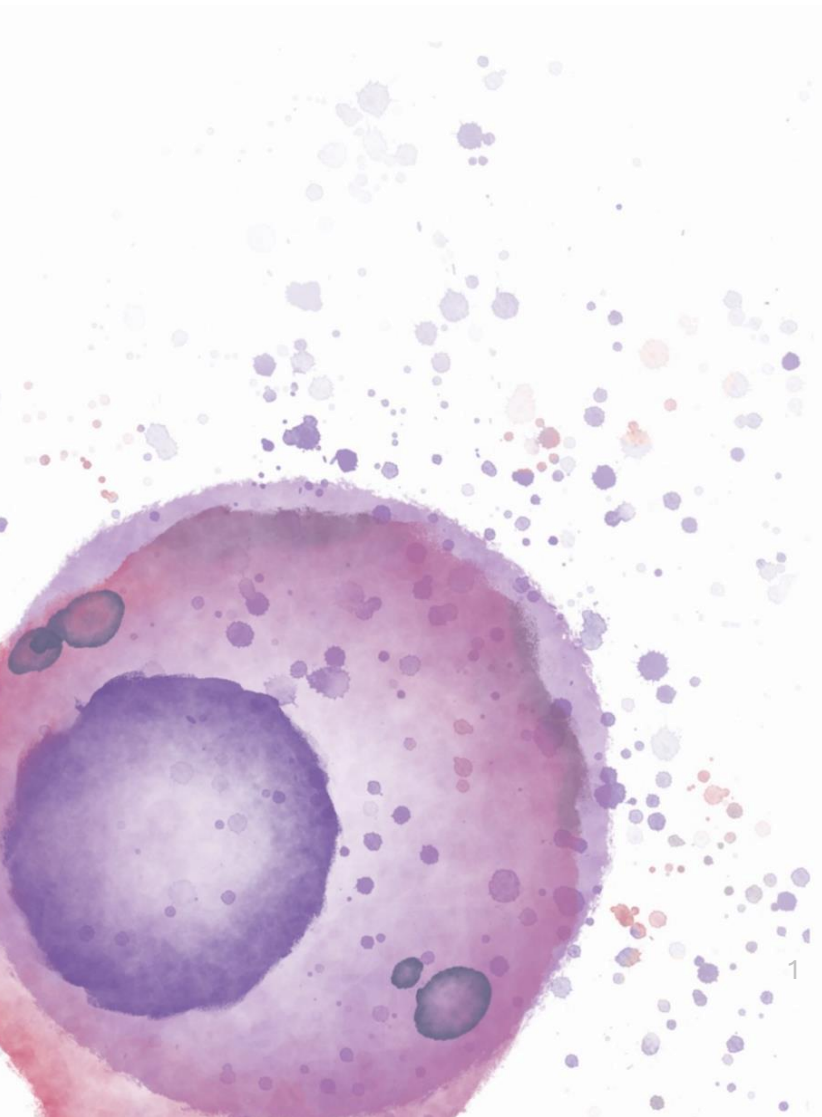
entre este descenso y un incremento en la frecuencia de infecciones y/o de enfermedades autoinmunes.

Además de los cambios antes referidos en la distribución y funcionalidad de las células inmunes de los pacientes con SM, se ha descrito también recientemente, la existencia de un aumento en varios marcadores solubles en suero/plasma, tales como la zonulina, proteínas fijadoras de ácidos grasos (FABP; abreviado del inglés, “intestinal fatty acid binding protein”), sCD14 y LPS²⁴³. Estos marcadores están habitualmente asociados a una alteración de la permeabilidad gastrointestinal (GI), correlacionándose en algunos casos con los niveles séricos de IgA e IgM presentes en pacientes con ISM²⁴³. Por otra parte, la existencia de niveles elevados de diversas citoquinas liberadas por el mastocito como TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-13, se ha relacionado también con el aumento de la permeabilidad intestinal en estos pacientes²⁴⁴, en los que la frecuencia e intensidad de los síntomas GI no parece estar directamente relacionada, al menos de forma exclusiva, con la presencia de la mutación *KIT*^{D816V}, los niveles séricos de triptasa o el grado de infiltración mastocitaria en biopsias GI²⁴⁵. Ante estos hallazgos cabe pensar que estos síntomas podrían estar estrechamente relacionados con los efectos locales de los mediadores liberados por el mastocito a nivel de la mucosa intestinal, y su impacto directo, y/o indirecto (mediado por los cambios en la permeabilidad de la barrera mucosa y en las células epiteliales que la constituyen) a nivel local (y sistémico) sobre otras células del sistema inmune²⁴⁵. Todo ello podría contribuir a explicar la relación que aparentemente existe entre algunas manifestaciones clínicas (e.g., pérdida de masa ósea) características de algunos subtipos diagnósticos de SM y mediadores producidos por células innatas y/o linfocitos T y/o NK, como es el caso del IFN γ , además de TNF α , IL-1 β e IL-6¹⁸⁷.

En resumen, todas estas observaciones descritas en los últimos años, apuntan a que en la SM pueda coexistir, al menos en algunos grupos de pacientes, una importante

desregulación del sistema inmune. Esta alteración podría estar relacionada de forma directa o indirecta con la activación constitutiva del mastocito patológico y ser modulada por el micromedioambiente tumoral en el que esta ocurre, pudiendo así, influir en el perfil de las manifestaciones clínicas de la enfermedad que presenta cada paciente a nivel individual.

Hipótesis y objetivos



La SM constituye un grupo de enfermedades con un comportamiento clínico variable, caracterizadas por la acumulación de mastocitos patológicos clonales en múltiples órganos y tejidos, entre los que se incluyen habitualmente la piel, la MO, el hígado y la mucosa del tracto gastrointestinal^{153,186}. La mutación D816V del protooncogén *KIT* constituye la alteración genética característica de la SM, estando presente en alrededor del 90% de los casos¹⁵⁶. Dicha mutación provoca una ganancia de función en el dominio tirosina quinasa del receptor Kit, que hace que el mastocito portador de esta alteración se active de forma constitutiva^{156,157}. Merece destacar sin embargo, que esta mutación se encuentra indistintamente en todas las formas de SM, a pesar de la heterogeneidad clínica que presentan los pacientes, lo cual sugiere que por sí sola, la mutación *KIT*^{D816V} no pueda explicar el comportamiento clínico-biológico variable de la enfermedad.

Actualmente sabemos que los mastocitos activados constitutivamente por *KIT*^{D816V} exhiben una liberación incrementada de mediadores mastocitarios, que además de actuar sobre las células epiteliales y estromales del micromedioambiente tumoral²⁴⁶, podrían activar y ejercer efectos directos (o indirectos) sobre otras células de la inmunidad innata y adaptativa⁷². Así, se ha descrito que la liberación de triptasa- α por parte del mastocito escinde los receptores PAR₂ (abreviado del inglés, “protease-activated receptor-2”) y EMR₂ (abreviado del inglés, “epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2”) expresados en la superficie de la membrana citoplasmática de monocitos y macrófagos, pudiendo inducir la activación en cascada de estas células^{247,248}. Por otro lado, se conoce que el mastocito puede modular la migración de DC, y su función, regulando además, los procesos de maduración, procesamiento de antígenos y activación de células T^{12,123}. Todo ello apunta a que el mastocito pueda ejercer también un papel importante en la inmunidad adaptativa, induciendo la activación, reclutamiento, proliferación y producción de citoquinas por parte de las células T, y modulando la polarización de los linfocitos T colaboradores hacia la producción de diferentes patrones

de citoquinas^{133,134,231,249}. Así mismo, el mastocito puede inducir el cambio de clase de Ig en linfocitos B, promoviendo su diferenciación a células B de memoria productoras de IgE y PC secretoras de IgE (e IgA)^{53,72}. Esto le confiere al mastocito, un papel relevante en la respuesta alérgica mediada por IgE, así como en la homeostasis de bacterias comensales en el tracto gastrointestinal, donde las citoquinas y otros mediadores liberados por el mastocito pueden inducir además, un aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa, con efectos indirectos sobre la respuesta inmunitaria local y sistémica^{12,53,72}.

Si tenemos en cuenta el importante papel inmunomodulador que ostenta el mastocito sobre otras células y componentes de la inmunidad innata y adaptativa en situaciones fisiológicas, ya sea por contacto directo, mediante la liberación de mediadores y exosomas, o de forma indirecta mediante el aumento de permeabilidad de mucosas, cabe plantear la posibilidad de que los mastocitos clonales de pacientes con mastocitosis portadores de una mutación activante de *KIT*, al estar constitutivamente activados, puedan ejercer un importante papel inmunomodulador sobre el resto de células inmunes, además de los efectos que ejercen sobre las células epiteliales y estromales de los tejidos en los que se localizan. Todo ello podría conllevar una alteración de la respuesta inmunitaria en estos pacientes, y por consiguiente, tener un impacto relevante en la fisiopatología y el comportamiento clínico de la enfermedad. En este sentido, en los últimos años se han acumulado un número cada vez mayor de evidencias que apuntan hacia la existencia de perfiles inmunes alterados en pacientes con SM^{226–228}. Entre otras alteraciones, estas incluyen una disminución anormalmente acentuada de células T CD8⁺ y NK en sangre periférica, junto a cifras elevadas de ILC2 y niveles anormalmente altos de IL-6 en plasma, aparentemente independientes de los niveles de expresión observados en los mastocitos de pacientes con SM^{226–228,231}. Sin embargo, estos hallazgos con frecuencia se ven limitados por el escaso número de pacientes analizados, por limitarse a un único subtipo diagnóstico de SM y por no profundizar en la identificación dentro de las distintas poblaciones

mayoritarias de las células inmunes, de las subpoblaciones funcionales o madurativas concretas que estarían afectadas. Una limitación adicional de los estudios publicados hasta la fecha sobre los perfiles de alteración inmune en SM radica en la ausencia de valores de referencia normales apropiados, a la hora de definir las alteraciones características de la enfermedad para las diferentes variables inmunes analizadas, que hoy sabemos, se ven en gran medida influidas por la edad de cada individuo, entre otros factores^{250–252}.

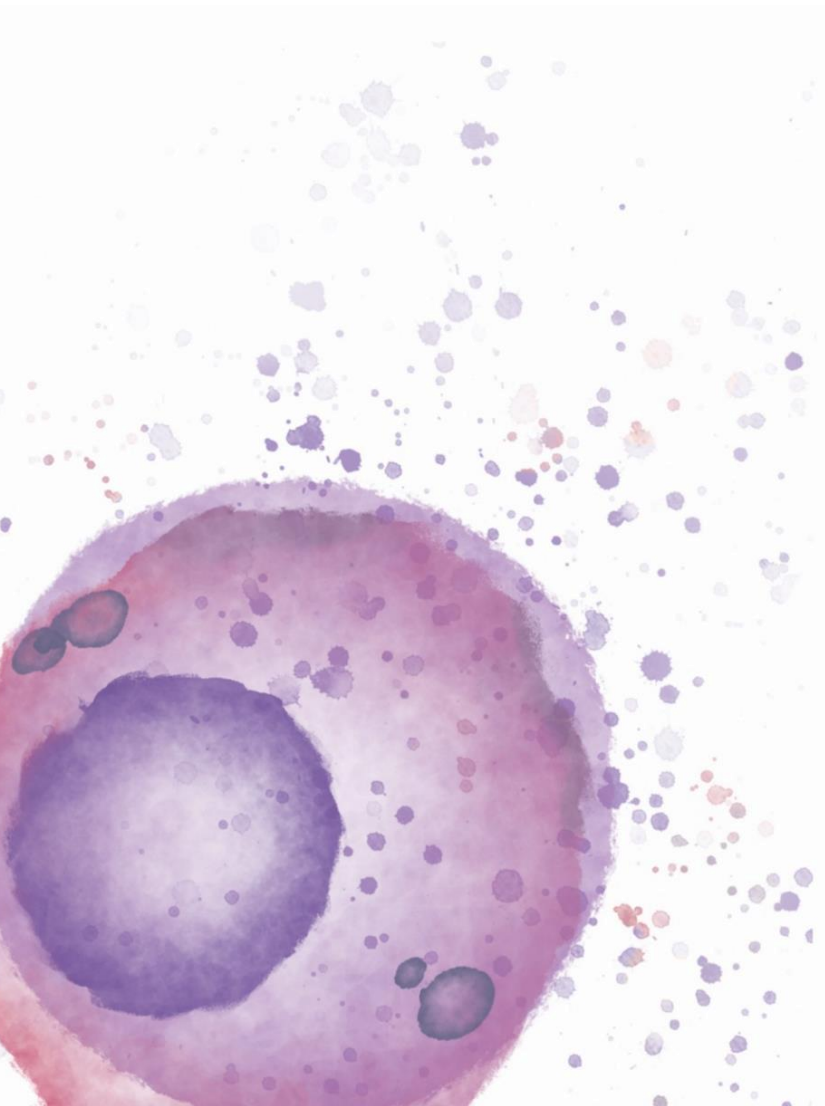
Ante estos antecedentes, en esta tesis doctoral nos planteamos la hipótesis de que la activación constitutiva de los mastocitos provocada por las mutaciones activantes de *KIT* presentes en la práctica totalidad de los pacientes con SM, podría tener efectos directos e indirectos sobre el micromedioambiente tumoral, incluidas las células del sistema inmune, generando cambios estructurales y funcionales en las mismas, que conllevarían a una respuesta inmunitaria desregulada que pudiera influir y condicionar, al menos en parte, el comportamiento clínico de la enfermedad en los distintos subtipos diagnósticos de SM. Partiendo de esta hipótesis, nos propusimos como **objetivo general** evaluar el estado del sistema inmune en su conjunto, con especial énfasis en los compartimentos monocítico, de células dendríticas y de linfocitos B y T de sangre periférica, como reflejo a nivel sistémico de las alteraciones tisulares subyacentes. Para alcanzar este objetivo, nos planteamos tres **objetivos específicos**:

1. Determinar la distribución y estado funcional de las diferentes subpoblaciones de monocitos y DC de sangre periférica, con el fin de definir las posibles alteraciones existentes en las células mieloides innatas de sangre de pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de SM.
2. Analizar de forma detallada la distribución de las diferentes subpoblaciones de células T circulantes en sangre de pacientes con SM, poniendo especial énfasis

en las alteraciones estructurales de los distintos compartimentos funcionales y madurativos de las células T, con el fin de evaluar su posible asociación con el comportamiento clínico (signos y síntomas característicos) de la enfermedad.

3. Investigar la distribución de células B y PC en sangre periférica, junto a los niveles de los distintos isotipos de anticuerpos en plasma, en pacientes con SM, para identificar los posibles perfiles de alteración de la respuesta inmunitaria humoral en los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad.

Material, métodos y resultados



En esta sección de la memoria se describen los pacientes, los materiales, y los métodos empleados, así como los resultados obtenidos, en relación con cada uno de los objetivos planteados en este trabajo doctoral, mediante la inclusión de los artículos científicos originales publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos está precedido de un breve resumen en castellano, con el fin de facilitar una rápida revisión del contenido de los mismos.

Artículo 1:

“Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients”.

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4}, María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5}, Ana Henriques^{2,4,6}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4}, Iván Álvarez-Twose^{2,4,6}, Carlos E. Pedreira⁷, Laura Sánchez-Muñoz^{2,4,6}, Daniela Damasceno^{1,2,3}, Carolina Caldas^{1,2,3,4}, Javier I. Muñoz-González^{2,4,6}, Almudena Matito^{2,4,6}, Juan Flores-Montero^{1,2,3}, Oscar González-López^{1,2,3,4}, Ignacio Criado^{1,2,3}, Andrea Mayado^{*1,2,3,4}, Alberto Orfao^{*1,2,3,4}

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC); Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

³Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España

⁴Red Española de MAstocitosis (REMA), Toledo y Salamanca, España.

⁵Servicio de Secuenciación (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, España.

⁷Departamento de Sistemas y Computación (PESC), COPPE, Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), Río de Janeiro, Brasil.

*AM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben ser considerados como último autor del mismo.

Clinical and Translational Allergy, 14 de Junio de 2022; 14;12(6):e12167 *

doi: 10.1002/clt2.12167

PMID: 35734269

PMCID: PMC9194602.

* La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I incluido al final de la presente memoria de tesis doctoral.

Introducción: La SM constituye un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por una expansión clonal de mastocitos patológicos que en más del 90% de los casos son portadores de la mutación *KIT*^{D816V}. Esta mutación induce un estado de activación constitutiva en el mastocito que da lugar a un aumento de la liberación de sus mediadores citoplasmáticos, entre los que se incluyen diversas citoquinas inflamatorias.

Los mastocitos son células mieloides con un amplio papel en la inmunidad innata y que, ya sea por contacto directo o mediante la liberación de mediadores y exosomas, pueden interaccionar con otras células inmunes como los monocitos, macrófagos, DC, las células endoteliales y las células epiteliales de la piel y mucosas, modulando la activación y funcionalidad de las mismas. Entre otros mediadores, y a modo de ejemplo, los mastocitos pueden liberar α -triptasa, una enzima que es capaz de procesar los receptores PAR₂ y EMR₂ expresados en la superficie de la membrana de monocitos y macrófagos, conduciendo a su posterior activación.

De acuerdo con este papel inmunomodulador de los mastocitos, cabe plantear la hipótesis de que la activación constitutiva de *KIT* presente en los mastocitos de pacientes con SM podría conducir a una alteración de la distribución y/o del comportamiento funcional de otras células de la inmunidad innata, con un posible impacto (variable) en la respuesta inmunitaria de pacientes con distintos subtipos diagnósticos de SM. En este sentido, existe un número cada vez mayor de evidencias que apoyan la existencia de perfiles inmunes alterados en SM, incluyendo un aumento de citoquinas inflamatorias en plasma (e.g. IL-6), además de una disminución del número de células T CD8⁺ y NK circulantes en sangre y un aumento de los niveles de ILC2. Sin embargo, el aumento de los niveles plasmáticos de algunas citoquinas inflamatorias, y en particular de la IL-6, no se corresponde con los bajos niveles de expresión génica de IL-6 observados en los mastocitos de pacientes con SM, lo cual sugiere que estas citoquinas podrían estar

producidas en su mayor parte por otras células de la inmunidad innata debido a una alteración más amplia y extensa del sistema inmunitario de estos pacientes. Entre las células candidatas a ser las responsables de la producción de citoquinas inflamatorias, estarían incluidos el monocito circulante, además de los macrófagos tisulares y las DC.

Objetivo: En base a todo lo anteriormente expuesto, en este primer capítulo del trabajo doctoral nos propusimos investigar la distribución y el estado funcional de las diferentes subpoblaciones de monocitos y DC de sangre periférica de pacientes con SM, con el objetivo de definir las posibles alteraciones presentes en pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de la enfermedad.

Material y métodos: En este estudio se incluyeron un total de 115 pacientes diagnosticados de SM en los centros de referencia de la Red Española de MASTocitosis (REMA) (Hospital del Valle de Toledo y Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca), incluyendo 45 pacientes con BMM, 61 ISM y 9 casos de ASM. Como grupo control se estudiaron en paralelo 32 donantes sanos de la misma edad, que no presentaban antecedentes de alergia ni de otros trastornos inmunitarios. En cada sujeto se llevaron a cabo diferentes análisis con el objetivo de conocer tanto el estado funcional como la distribución de las distintas poblaciones de células de la inmunidad innata en sangre de los pacientes con SM, respecto a los sujetos sanos de la misma edad. Los estudios funcionales realizados estaban dirigidos a determinar: i) la producción espontánea (*ex vivo*) de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TNF α y TGF β por parte de los monocitos y DC presentes en muestras de sangre periférica de 53 pacientes y 16 controles empleando citometría de flujo de alta sensibilidad; ii) la capacidad de producir las mismas citoquinas inflamatorias tras estimulación *in vitro* con LPS e IFN γ (asociado a bloqueo de su secreción a nivel de células individuales usando Brefeldina A) por parte de dichas células presentes en muestras de sangre periférica de un subgrupo de 7 pacientes y 15 controles, empleando

citometría de flujo como método de medida; y iii) la cuantificación de los niveles solubles de citoquinas en plasma de 52 pacientes y 16 controles utilizando el sistema de inmunoensayo Cytometric Bead Array (CBA) y los reactivos necesarios para la medición de citoquinas inflamatorias humanas adaptados para su adquisición en un citómetro FACSCanto II (BD). Finalmente, analizamos también la distribución de las principales poblaciones de monocitos y DC presentes en sangre periférica de 70 pacientes con SM y 12 controles, empleando un panel de anticuerpos en 14 colores diseñado de forma específica por el grupo EuroFlow para la monitorización inmune de monocitos y DC, mediante citometría espectral (citómetro Aurora de 3 láseres, de la casa comercial Cytex).

Resultados: De forma global, observamos que respecto a los monocitos de sangre periférica de adultos sanos, los monocitos circulantes de pacientes con SM presentaban una producción espontánea de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α ($P < 0.001$) y en menor medida también de IL-10 ($P = 0.036$), significativamente elevada. Sin embargo, un análisis más detallado de estos resultados mostró que el aumento en el número de monocitos positivos para algunas de estas citoquinas como la IL-1 β ⁺ y la IL-10⁺, estaba restringida de forma exclusiva a pacientes con BMM ($P \leq 0.018$) e ISM ($P \leq 0.034$), mientras que los pacientes con ASM presentaban niveles normales de producción por parte de los monocitos circulantes para ambas interleuquinas. Además merece destacar que los pacientes con ISM mostraban recuentos significativamente disminuidos en sangre de monocitos TGF β ⁺ ($P = 0.03$ frente al grupo control). Con el fin de determinar si el incremento generalizado de la producción espontánea de citoquinas inflamatorias por parte de los monocitos de sangre periférica de pacientes con SM se asociaba con un incremento en los valores plasmáticos de las mismas, analizamos sus niveles en muestras pareadas de plasma de los mismos pacientes. Como cabría esperar, encontramos niveles aumentados de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α ($P < 0.001$) e IL-10 ($P = 0.024$) en plasma en los pacientes con SM, respecto a los sujetos control, independientemente del subtipo diagnóstico de la enfermedad. En cambio, los

niveles de IL-12 permanecían igualmente bajos o indetectables en pacientes y controles. En su conjunto estos datos sugieren que en la SM se produce un aumento espontáneo de la producción espontánea de citoquinas por parte de los monocitos circulantes en sangre, que podría conducir a un aumento de los niveles en plasma de esas mismas citoquinas inflamatorias. Con el objetivo de evaluar si el aumento de la producción espontánea de citoquinas inflamatorias se asociaba con una mayor capacidad de producción celular, analizamos la capacidad de producir citoquinas por los monocitos circulantes tras estimulación *in vitro* con LPS más IFN γ . Curiosamente, los monocitos de pacientes con SM, una vez estimulados *in vitro*, mostraban una menor capacidad de producción de citoquinas respecto a monocitos de sujetos sanos, reflejado en un menor porcentaje de monocitos IL-1 β ⁺ y TGF β ⁺ ($P < 0.013$) que el observado en el grupo control. Estos hallazgos sugieren que los monocitos circulantes de pacientes con SM están constitutivamente activados, pero funcionalmente agotados.

Ante estas observaciones, nos planteamos determinar si esta alteración funcional de los monocitos circulantes de pacientes con SM se reflejaba además, en cambios en la distribución en sangre de las distintas subpoblaciones de células monocíticas y de DC. En ese sentido, constatamos la existencia de un descenso global del recuento de monocitos ($P = 0.032$) en pacientes con SM comparado con el grupo control, siendo este descenso a expensas tanto de los monocitos con fenotipo intermedio (iMo) entre el monocito clásico (cMo) y el no clásico (ncMo) ($P = 0.008$) como de los ncMo ($P = 0.002$). En relación con los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad, cabe señalar que los pacientes con ISM mostraron un recuento de cMo inferior al observado para los demás pacientes ($P < 0.043$), mientras que los ncMo Slan⁺ CD36⁻ estaban significativamente disminuidos respecto al grupo control en todos los subtipos diagnósticos de la enfermedad, con un descenso más pronunciado en los casos de ASM. En paralelo, los pacientes con SM mostraron también recuentos sanguíneos disminuidos de mDC totales y de sus subpoblaciones CD1c⁺,

CD1c⁺CD14⁻CD5⁻ y CD141⁺ ($P \leq 0.015$), que afectaban de forma específica a pacientes con ISM y ASM, tanto cuando los comparábamos con el grupo control como con pacientes con BMM ($P \leq 0.038$). Respecto a las DC plasmocitoides, observamos una disminución progresivamente más marcada de las mismas en sangre desde los pacientes con BMM a los que presentaban ISM y ASM ($P < 0.019$). Por el contrario, la subpoblación de DC Axl⁺ mostró niveles significativamente elevados respecto a los valores normales de forma exclusiva entre los pacientes que presentaban BMM ($P \leq 0.01$). En conjunto, estos resultados reflejan una cinética alterada de los monocitos y DC circulantes en la SM, asociada a la alteración funcional de los mismos.

Conclusiones: Los monocitos circulantes de pacientes con SM están constitutivamente activados y funcionalmente agotados, contribuyendo al menos en parte, al aumento de los niveles en plasma de una amplia variedad de citoquinas inflamatorias con efectos pleiotrópicos sobre distintas células y tejidos. Además, en los pacientes con SM, esta alteración funcional de los monocitos se asocia con una redistribución en sangre de sus diferentes subpoblaciones madurativas, consistente en una disminución del número de iMo y ncMo (Slan⁺), junto a diferentes perfiles de alteración de las DC reflejados en un mayor número de DC Axl⁺ en las fases tempranas de la enfermedad (BMM), y a un recuento (globalmente) reducido tanto de pDC como de las subpoblaciones de DC mieloides CD141⁺ y CD1c⁺ y CD1c⁺ CD14⁻ CD5⁻ en pacientes con ISM y ASM. Estos hallazgos ponen de relieve la existencia de importantes alteraciones en las células de la respuesta inmunitaria innata en pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de SM.

ORIGINAL ARTICLE

Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4} | María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5} | Ana Henriques^{2,4,6} |
 Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5} | Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4} |
 Iván Álvarez-Twose^{2,4,6} | Carlos E. Pedreira⁷ | Laura Sánchez-Muñoz^{2,4,6} |
 Daniela Damasceno^{1,2,3} | Carolina Caldas^{1,2,3,4} | Javier I. Muñoz-González^{2,4,6} |
 Almudena Matito^{2,4,6} | Juan Flores-Montero^{1,2,3}  | Oscar González-López^{1,2,3,4}  |
 Ignacio Criado^{1,2,3} | Andrea Mayado^{1,2,3,4} | Alberto Orfao^{1,2,3,4} 

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

²Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

³Biomedical Research Institute of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain

⁵Sequencing Service (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

⁶Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain

⁷Systems and Computing Department (PESC), COPPE, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Alberto Orfao, Centro de Investigación del
 Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, Paseo
 de la Universidad de Coimbra, 37007
 Salamanca, Spain.
 Email: orfao@usal.es

Funding information

Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Grant/
 Award Number: PI19/01166; Centro de
 Investigación Biomédica en Red de Cáncer
 (CIBERONC), Grant/Award Number: CB16/
 12/00400; European Union (EU); The Spanish
 National DNA Bank Carlos III, Grant/Award
 Number: PT20/00085; Government of Castilla
 y Leon, Spain; European Regional
 Development Fund, Grant/Award Number:
 422058

Abstract

Background: Mast cells (MC) from systemic mastocytosis (SM) patients release MC mediators that lead to an altered microenvironment with potential consequences on innate immune cells, such as monocytes and dendritic cells (DC). Here we investigated the distribution and functional behaviour of different populations of blood monocytes and DC among distinct diagnostic subtypes of SM.

Methods: Overall, we studied 115 SM patients - 45 bone marrow mastocytosis (BMM), 61 indolent SM (ISM), 9 aggressive SM (ASM)- and 32 healthy donors (HD). Spontaneous and *in vitro*-stimulated cytokine production by blood monocytes, and their plasma levels, together with the distribution of different subsets of blood monocytes and DCs, were investigated.

Results: SM patients showed increased plasma levels and spontaneous production by blood monocytes of IL1 β , IL6, IL8, TNF α and IL10, associated with an exhausted ability of LPS + IFN γ -stimulated blood monocytes to produce IL1 β and TGF β . SM (particularly ISM) patients also showed decreased counts of total monocytes, at the expense of intermediate monocytes and non-classical monocytes. Interestingly,

Andrea Mayado and Alberto Orfao have equally contributed to this work and they should be considered as joint senior authors.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. Clinical and Translational Allergy published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of European Academy of Allergy and Clinical Immunology.

while ISM and ASM patients had decreased numbers of plasmacytoid DC and myeloid DC (and their major subsets) in blood, an expansion of AXL⁺ DC was specifically encountered in BMM cases.

Conclusion: These results demonstrate an altered distribution of blood monocytes and DC subsets in SM associated with constitutive activation of functionally impaired blood monocytes and increased plasma levels of a wide variety of inflammatory cytokines, reflecting broad activation of the innate immune response in mastocytosis.

KEYWORDS

cytokines, dendritic cells, microenvironment, monocyte, systemic mastocytosis

1 | INTRODUCTION

Systemic mastocytosis (SM) comprises a heterogeneous group of disorders that range from bone marrow (BM) mastocytosis (BMM) and indolent SM (ISM) to advanced forms of SM (AdvSM), such as aggressive SM (ASM), SM with an associated hematological neoplasm (SM-AHN) and mast cell leukaemia (MCL).^{1,2} Most (>90%) SM cases carry the KITD816 V mutation in the tyrosine kinase domain of the stem cell growth factor receptor gene (*KIT*), while other *KIT* mutations are present in a smaller percentage (≈1%–4%) of cases.³ KITD816 V (and other *KIT* mutations) induce constitutive activation of *KIT* and its downstream Ras/MAP/ERK, PI3 K/AKT, JNK and STAT3 signaling pathways,^{4,5} leading to an expansion of activated clonal mast cells (MC) and an increased release of MC mediators (e.g. tryptase and histamine), and inflammatory cytokines by the activated MC.^{6–10}

MC are myeloid cells that play key roles in the innate/inflammatory immune response.¹¹ Once activated, MC interact with other immune cells either by direct cell-to-cell contact or via release of mediators that act on surrounding immune cells, including monocytes, macrophages, dendritic cells (DC), T-cells and endothelial cells.¹² MC-released serine proteases such as α-tryptase, cleave receptors -e.g. PAR2 (protease-activated receptor-2) and EMR2 (epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2)- expressed on the surface membrane of human monocytes and macrophages, leading to their downstream activation.^{13,14} In parallel, other MC mediators such as tumour necrosis factor-α (TNFα) and prostaglandin D2 (PGD2) also activate macrophages and instruct DC to polarize TCD4⁺ cells toward a T-helper 2 (Th2) response, respectively.^{15,16} Those effects of MC mediators on surrounding immune cells are further enhanced by activated MC-derived exosomes which have been shown to induce in vitro phenotypic and functional maturation of DC,¹⁷ and directly promote activation, proliferation and cytokine secretion -e.g., interleukin (IL)-22, interferon (IFN)-γ and TNFα-by TCD4⁺ cells following HLA class-II and CD40-CD154-mediated signaling.¹⁸ Based on this immunomodulatory role of MC, it might be hypothesized that constitutive activation of *KIT* in SM MC, may lead to an altered distribution and/or functional behaviour of other immune cells, with

further impact on dysregulated immune responses and disease behavior.^{19–21}

In this regard, increased evidences support an altered innate and adaptative immune response in SM. Thus, abnormally decreased TCD8⁺ and NK-cell counts together with increased levels of circulating type II innate lymphoid cells (ILC2) have been reported in ISM,^{22,23} in parallel to an increase in plasma of IL6 and other inflammatory cytokines, which would further contribute to an enhanced activation and accumulation of clonal MC in SM.²⁴ Despite these findings, the major (cell) source of these cytokines and their pathogenic role in the outcome of SM, remain poorly understood. Thus, Tobio et al.²⁵ identified MC from two SM patients as the main source of IL6,²⁵ while Teodosio et al. reported low IL6 gene expression levels in highly-purified BM MC from both ISM and ASM patients, who typically had increased IL6 plasma levels.^{26,27} Overall, the latter findings suggest that immune cells other than MC, capable of producing IL6 and other inflammatory cytokines, might be key in enhancing immune dysregulation in SM.²⁷ Among candidate cells, blood monocytes, tissue macrophages and DC are included.

Here we investigated the distribution and functional behavior of different populations of blood monocytes and DC in a large series of 115 SM patients. Our ultimate goal was to gain insight into the potential alterations of innate myeloid cells in blood of patients with distinct diagnostic subtypes of SM.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Patients, controls and samples

A total of 115 SM patients diagnosed according to the WHO criteria² at the reference centres of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA; Mast Cell Unit, Hospital del Valle, Toledo; and, Cancer Research Centre, Salamanca, Spain), were studied. Those included 45 BMM, 61 ISM and 9 ASM cases. Thirty-two age-matched healthy adult donors (HD) who had no past or present history of allergy or other immune disorders, were studied as controls. Demographic, biochemical and clinical data on SM patients grouped according to the diagnostic subtype of the disease are shown in Table 1 in Supplementary

Information and their distribution per each set of assays performed is detailed in Table 2 in Supplementary Information. Briefly, functional analysis of spontaneous (ex vivo) cytokine production was initially investigated at the single-cell level in 53 patients –20 BMM, 28 ISM and 5 ASM- and 16 HD; further in vitro monocyte-stimulatory assays were performed in a subset of 7 of these 53 patients –2 BMM, 4 ISM and 1 ASM- and 15 HD. Quantification of cytokine plasma levels was performed in parallel in 52 patients –19 BMM, 28 ISM, and 5 ASM- and 6 HD- and flow cytometry immune cell profiling studies were done in 70 patients –24 BMM, 39 ISM and 7 ASM- and 12 HD; finally, soluble plasma levels of CCL2 (C-C motif chemokine ligand-2) and EMR2 plus CXCR2 (C-X-C motif chemokine receptor-2), SAA1 (serum amyloid-A1) and TLR2 (Toll Like Receptor-2) were evaluated in 57 -20 BMM, 32 ISM and 5 ASM- and in 30 patients –9 BMM, 17 ISM and 4 ASM-, respectively.

Each patient and HD gave his/her written informed consent to participate in the study according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local Ethics Committees (approval codes: PI 2019 03 260 and CEIC 2016 09 07).

2.2 | Spontaneous and in vitro-stimulated cytokine production by blood monocytes

For ex vivo cytokine production assays, blood was diluted 1:1 (vol:vol) in RPMI 1640 and incubated with 10 mg/ml brefeldin A (BFA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 6 h at 37°C in a 95% humid atmosphere containing 5% CO₂. Cultured cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) and incubated for 30 min in the darkness (4°C) with a 12-color combination of monoclonal antibodies (MAb) directed against CD45, CD33, CD123, CD3, CD19, CD56, CD16, FcεR1α, HLA-DR, CD300e and CD14, for identification and subsetting of PB monocytes (Table 3 in Supplementary Information). Stained cells were washed in PBS, fixed for 15 min with solution A of Fix & Perm (eBioscience, San Francisco, CA), washed in PBS, permeabilized with solution B of Fix & Perm, and stained for 15 min (RT) in the dark in separate aliquots for intracytoplasmic IL1β, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, TNFα, and TGFβ (Table 3 in Supplementary Information). Stained cells were washed in PBS and measured (>2 × 10⁵ leukocytes) in a BD-LSR Fortessa X-20 flow cytometer (BD), using the FACSDiva software (BD). For data analysis, the Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used to evaluate cytokine production by each subset of blood monocytes identified, based on the percentage of positive cells/cytokine.

In a subset of patients and of HD, an aliquot of blood diluted 1:1 (vol:vol) in RPMI 1640 was cultured in parallel for 2 h in the presence of (20 µg/mL) lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) and (0.4 µg/mL) IFNγ (R&D Systems, Minneapolis, MN) to actively induce cytokine production in vitro, before adding BFA to block cytokine secretion to the extracellular compartment. Stimulated cells were then cultured for another 4 h, and stained as described above. In all experiments, an aliquot of unstimulated blood was processed in parallel as negative control.

2.3 | Quantification of cytokine levels in plasma

Soluble TNFα, IL1β, IL6, IL8, IL10 and IL12 levels were assessed in plasma using the Cytometric Bead Array (CBA) immunoassay system (BD) and the Human Inflammatory Cytokine Kit (BD), strictly following the recommendations of the manufacturer. Afterward, a minimum of 3000 events per bead population was measured in a FACSCanto II flow cytometer (BD) using FACSDiva™. For data analysis the FCAP Array software (v3.0; BD) was used.

2.4 | Flow cytometric identification and enumeration of blood monocyte and dendritic cell populations

The distribution of distinct subsets of monocytes and DC was investigated in K3-EDTA-anticoagulated fresh (<24 h) blood. For this purpose, 10⁷ cells/sample were stained with the Euroflow 14-color (16-antibody) monocyte-DC immune monitoring tube (MoDC IMM tube) (Supplementary Table 3) using the EuroFlow Bulk Lysis standard operating procedure for staining of cell surface membrane markers-only (www.euroflow.org), as previously described.^{28–30} In a subset of SM patients and HD, expression of EMR2 (CD312) and the IL8-receptor (CD182) on different subsets of stained blood monocytes and DC were also evaluated (Table 3 in Supplementary Information), after measuring ≥5 × 10⁶ nucleated cells/sample in a 3-laser Aurora flow cytometer (Cytek, Landing Parkway, CA) equipped with the SpectroFlo software (Cytek). For data analysis Infinicyt was used.

2.5 | Quantification of CCL2, CXCR2, EMR2, SAA1 and TLR2 plasma levels

CCL2 and EMR2 plasma levels were measured using the Human CCL2/MCP-1 Quantikine (R&D Systems), and the Human EMR2 (Thermo-Fisher, Waltham, MA) enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) kits. CXCR2, SAA1 and TLR2 plasma levels were evaluated with the Human CXCR2 (EIAab Science Inc, Wuhan, Hubei, China), SAA1 (Abcam, Cambridge, UK), and TLR2 (Cloud Clone Corp., Wuhan, Hubei, China) ELISA kits, respectively.

2.6 | Statistical methods

For all continuous variables, median (range) and mean (standard deviation; SD) values, as well as the 10th, 25th, 75th and 90th percentiles, were calculated; for categorical variables, frequencies were used. The statistical significance of differences observed among groups was assessed with the Kruskal-Wallis and the Mann-Whitney U tests (for continuous variables), or the chi-square and Fisher exact tests (for categorical variables). The degree of correlation between different variables was determined by the Spearman's test. For all statistical analyses the IBM-SPSS software (version 23.0; IBM,

Armonk, NY) was used. p -values < 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

3 | RESULTS

3.1 | Spontaneous ex vivo cytokine production by blood monocytes and cytokine plasma levels in SM

Under baseline ex vivo conditions, blood monocytes from SM patients showed a significantly ($P < 0.001$) increased (vs. HD) spontaneous production of IL1 β , IL6, IL8, TNF α , and to a less extent also IL10 ($P = 0.036$), with higher numbers of cytokine-producing monocytes (Figure 1A,B). Of note, increased numbers of IL6 $^{+}$, IL8 $^{+}$ and TNF α^{+} monocytes in blood after short-term in vitro culture ($P \leq 0.017$) were observed across all diagnostic subtypes of SM (Figure 2A). In turn, increased numbers of IL1 β^{+} and IL10 $^{+}$ monocytes were restricted to BMM ($P \leq 0.018$) and ISM ($P \leq 0.034$) while normal in ASM (Figure 2A). In contrast, ISM cases displayed decreased counts in blood of TGF β^{+} monocytes ($P = 0.03$ vs. HD) (Figure 1B in Supplementary Information), while similar percentages of IL12 $^{+}$ and IL13 $^{+}$ monocytes were found in blood of SM and HD (Figure 1A in Supplementary Information).

To determine whether the increased spontaneous production of inflammatory cytokines by blood monocytes was associated with increased amounts in plasma of the same cytokines, due to their in vivo release to the extracellular medium, we subsequently, investigated their plasma levels. Interestingly, increased IL1 β , IL6, IL8, TNF α ($P < 0.001$) and IL10 ($P = 0.024$) levels were found in plasma of SM versus HD (Figure 1C), both groups showing similarly low/undetectable IL12 levels (Figure 1B in Supplementary Information). Of note, the same pattern of alteration was observed for soluble IL1 β , IL6, IL8 and TNF α ($P \leq 0.006$) across the distinct diagnostic subtypes of SM, although ISM patients displayed higher IL8 levels than BMM cases ($P = 0.05$), and increased IL10 levels were restricted to ISM and ASM patients ($P = 0.010$ and $P = 0.015$ vs. HD, respectively) (Figure 2B). These data suggest that spontaneously increased cytokine production by circulating blood monocytes occurs in SM, which might lead to increased levels in plasma of the same inflammatory cytokines. In fact, a significant correlation between the number of IL1 β^{+} ($P = 0.009$), IL6 $^{+}$ ($P = 0.043$) and IL8 $^{+}$ ($P = 0.016$) blood monocytes and the plasma levels of the corresponding cytokines was observed (Figure 1C in Supplementary Information).

In order to further assess whether increased spontaneous production of inflammatory cytokines, was associated with an overall enhanced cytokine production capacity after in vitro stimulation, blood monocytes from 7 SM patients and 15 HD were further stimulated in vitro with LPS plus IFN γ , prior to evaluation of cytokine production. Interestingly, in vitro stimulated blood monocytes from SM patients showed lower numbers of for example, IL1 β^{+} ($P = 0.008$) and TGF β^{+} monocytes ($P = 0.013$) than HD, although for the latter there were hardly any producing cells (Figure 3). These findings suggest that (compared to normal monocytes), circulating monocytes

from SM patients are constitutively activated, but functionally exhausted. Alternatively, they might consist of different subsets which are for example, unresponsive to LPS and IFN γ (Figure 3 in Supplementary Information).

3.2 | Distribution of distinct populations of monocytes and dendritic cells in blood of SM patients

Compared to HD, total monocyte counts were significantly decreased ($P = 0.032$) in SM. This was at the expense of both intermediate monocytes (iMo) ($P = 0.008$) and non-classical monocytes (ncMo) ($P = 0.002$) and, within the latter, of the SLAN $^{+}$ CD36 $^{+}$ ($P = 0.037$) and SLAN $^{+}$ CD36 $^{-}$ ($P = 0.008$) ncMo subsets. ISM patients also showed decreased counts of classical monocytes (cMo) versus both HD ($P \leq 0.021$) and other SM patients ($P = 0.043$ vs. BMM; and $P = 0.019$ vs. ASM) (Figure 4A). Of note, decreased cMo counts in ISM versus BMM were mostly at the expense of the CD62L $^{+}$ Fc ϵ RI $^{+}$ subset ($P = 0.011$), while ASM cases showed higher counts of CD62L $^{-}$ Fc ϵ RI $^{-}$ cMo versus BMM ($P = 0.047$) (Figure 4B).

Among SM, BMM and ISM were those groups of patients that showed significantly decreased counts of iMo versus HD ($P = 0.041$) (Figure 4A), while ncMo and their SLAN $^{+}$ CD36 $^{-}$ subset were decreased (vs. HD) across all subtypes of SM (Figures 4A,C). In turn, ncMo were more pronouncedly decreased in ASM than BMM ($P = 0.047$), in association with lower counts of their SLAN $^{+}$ CD36 $^{-}$ subset –vs BMM and ISM ($P \leq 0.047$) (Figure 4C).

Likewise, blood counts of myeloid DC (mDC) and their CD1c $^{+}$, CD1c $^{+}$ CD14 $^{-}$ CD5 $^{-}$ and CD141 $^{+}$ mDC subsets, were all decreased in SM ($P \leq 0.015$ vs. HD) (Figure 5A,B). Among SM patients, decreased total DC and mDC (and their subset) counts were found in ISM and ASM patients versus both HD ($P \leq 0.035$) and BMM ($P \leq 0.038$) (Figure 5A,B). Such decrease was due to lower counts of the CD1c $^{+}$ CD14 ^{low} and CD1c $^{+}$ CD14 $^{-}$ CD5 $^{+}$ mDC subsets in ISM versus HD ($P \leq 0.030$) and BMM ($P \leq 0.005$) (Figure 5B). In turn, the number of plasmacytoid DCs (pDCs) progressively decreased from BMM to ISM ($P = 0.001$ vs. BMM) and ASM cases ($P = 0.019$ vs. ISM) (Figure 5A). Conversely, Axl DC were increased only in BMM cases ($P \leq 0.01$ vs. HD; ISM; and ASM) (Figure 5A). Altogether, these results reveal markedly altered monocyte and DC kinetics in blood of SM, in association with their functional alteration (Figure 3 SupplInfo).

3.3 | Plasma levels and surface membrane expression of senescence-, chemotaxis- and activation-associated markers on circulating monocytes in SM

Normal CXCR2 and SAA1 levels were found in plasma of SM (Figure 2C,E in Supplementary Information), associated with undetectable TLR2 and normal CXCR2 membrane expression levels on blood monocytes from SM patients and HD. In contrast, lower levels of CCL2 were found in plasma of ISM versus both BMM and ASM

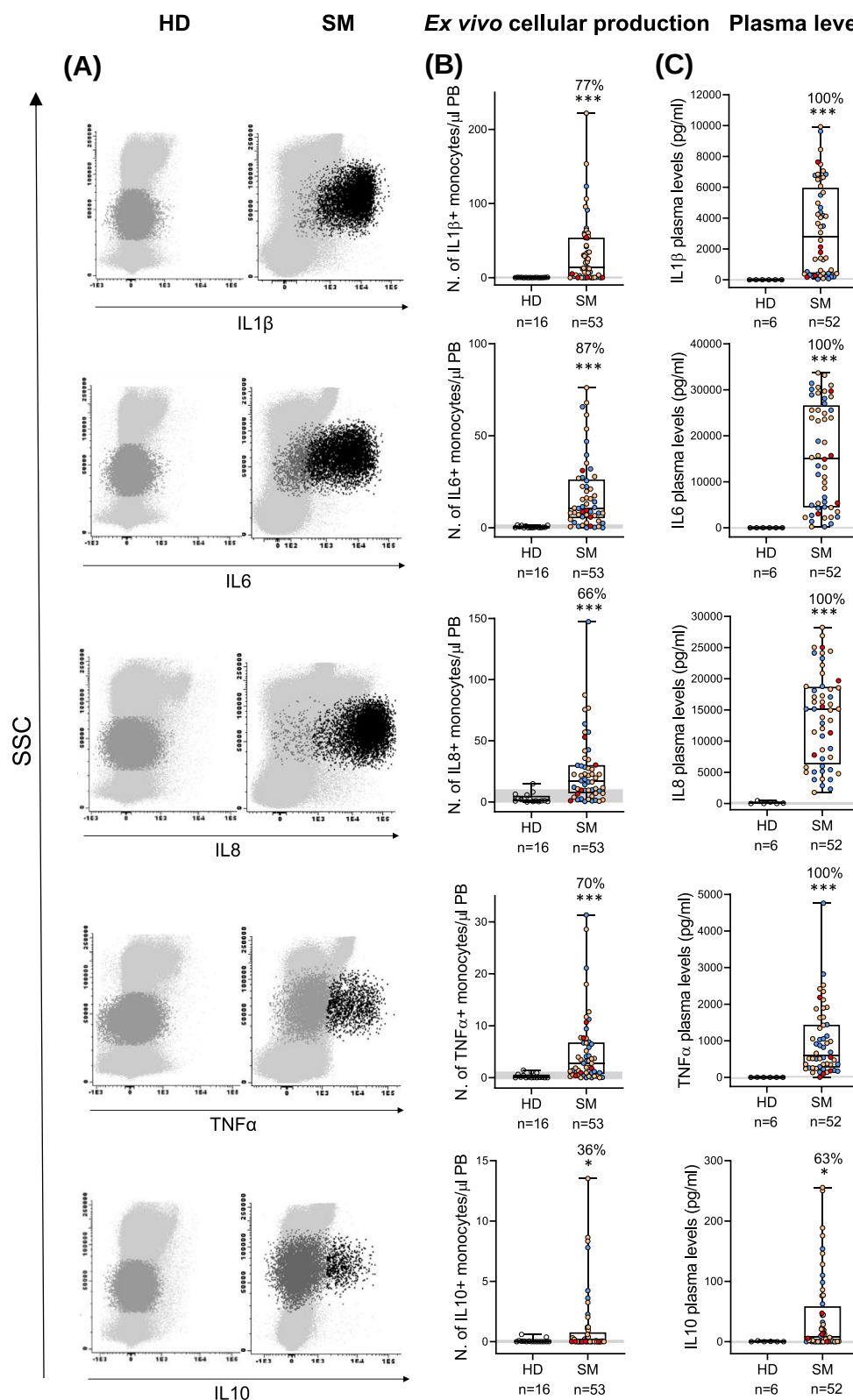
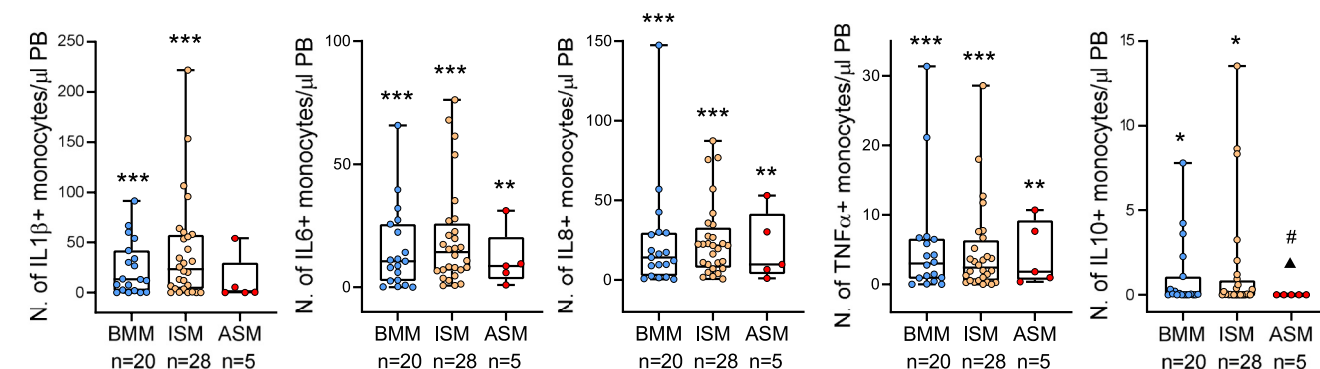


FIGURE 1 Distribution of ex vivo cytokine-producing blood monocytes and soluble cytokine levels in plasma of systemic mastocytosis (SM) patients versus age-matched healthy donors (HD). (A) Bivariate flow cytometry dot plot histograms showing representative intracytoplasmic staining profiles for IL1 β , IL6, IL8, IL10 and TNF α by cytokine producing blood monocytes (black dots) from a representative SM patient (right panels) and an HD (left panels). (B) Number of ex vivo cytokine-producing monocytes in blood of SM patients versus HD. (C) Soluble cytokine plasma levels in SM versus HD. Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. Blue dots represent bone marrow mastocytosis cases, orange dots show indolent systemic mastocytosis patients, and red dots corresponded to aggressive systemic mastocytosis cases. Percentage values indicate the percentage of SM patients above percentile 95 of HD. *p*-values: * <0.05, ** <0.010, *** <0.001. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; SSC, sideward light scatter

N. of ex vivo cytokine-producing monocytes



Soluble cytokine plasma levels

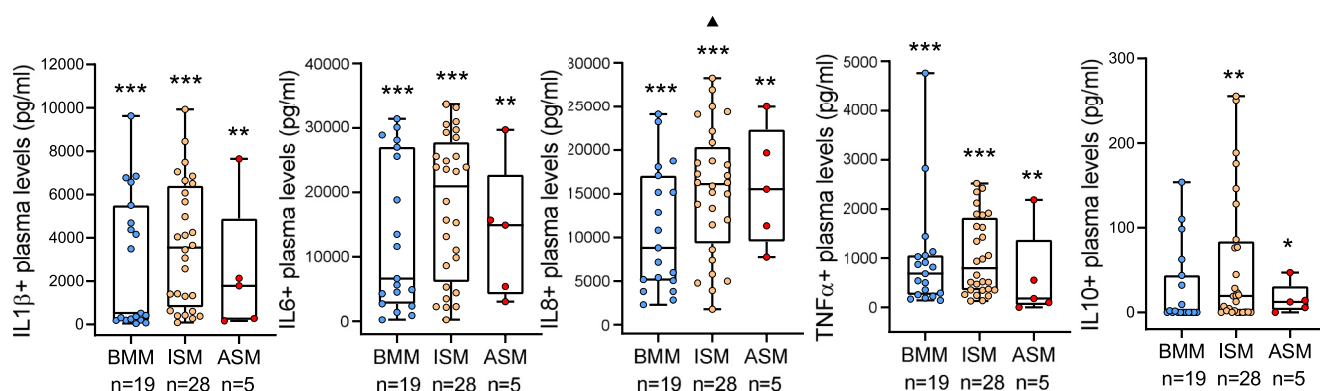


FIGURE 2 Distribution of ex vivo cytokine-producing monocytes in blood (A) and soluble cytokine levels in plasma (B) of SM patients classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease. Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, and the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. * versus HD, ▲ versus BMM, # versus ISM. *p*-values: * <0.05, ** <0.010, *** <0.001, ▲ <0.05, ▲▲ <0.01, ▲▲▲ <0.001, # <0.05; ## <0.01, ### <0.001. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis

($P \leq 0.042$) (Figure 2B in Supplementary Information), together with increased cell surface expression of its CD192 receptor on monocytes ($P = 0.037$) of SM patients, regardless of the subtype of the disease. This was at the expense of higher CD192 levels on iMo and ncMo ($P \leq 0.003$) -including their $SLAN^-CD36^+$, $SLAN^-CD36^-$, $SLAN^+CD36^-$, and $SLAN^+CD36^+$ ($P \leq 0.034$) subsets- (Figure 6A,B). Thus, CD192 expression was increased ($P \leq 0.046$) in all subsets of ncMo in BMM, all ncMo subsets except $SLAN^+CD36^+$ ncMo of ISM patients, and only on $SLAN^-CD36^+$ ncMo in ASM cases (Figure 6B). Altogether these findings suggest that except for CCL2/CD192, all other markers investigated in SM, which are associated with immunosenescence, show normal soluble and cellular expression levels. Likewise, normal plasma and cell surface membrane expression levels of the EMR2 activation-associated marker were observed on blood monocytes of SM patients, suggesting a limited role for the tryptase-EMR2 pathway on the activation of blood monocytes.

4 | DISCUSSION

Mast cells are key players in various physiologic and pathologic immune conditions due to their functional plasticity and the ability to release a broad array of bioactive mediators.^{31–33} Thereby, MC might exert their effects on other immune cells via their ability to modulate tissue distribution and functionality of lymphocytes, monocytes, macrophages, DC and endothelial cells, among other cells^{12,34,35} As an example, tryptase can activate normal blood mononuclear cells and induce them to synthesize and release pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF α , IL1 β and IL6), but not Th1 (IL12 and INF γ) or Th2 cytokines (IL4 and IL10).³⁶ In this regard, Li et al. confirmed that monocytes are the source of IL6 secreted in response to tryptase.³⁷

In line with these observations, previous studies in SM have recurrently reported abnormally high cytokine levels in plasma.^{25,27,38,39} Interestingly, these have been repeatedly suggested

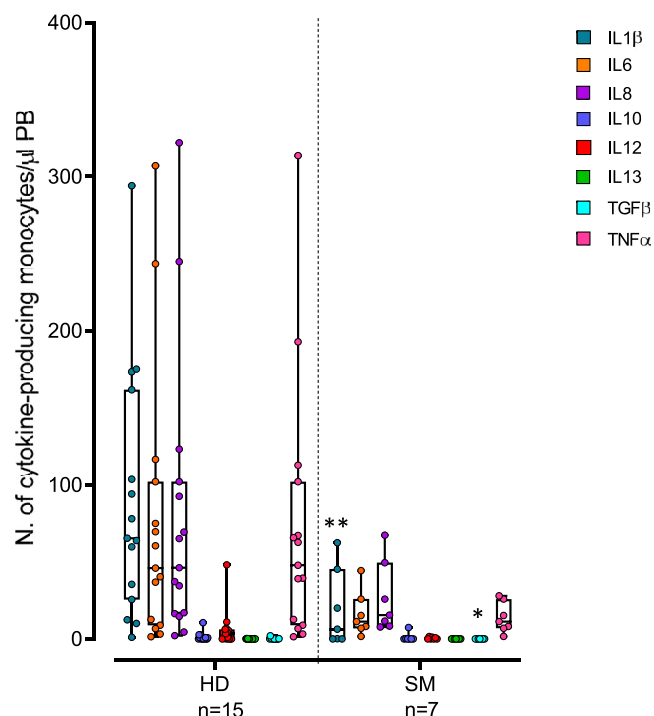


FIGURE 3 Number of cytokine-producing monocytes after in vitro stimulation of blood samples with LPS plus IFN γ in systemic mastocytosis (SM) patients classified according to the diagnostic subtypes of the disease versus age-matched healthy donors (HD). Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. p -values: * <0.05 , ** <0.010 , *** <0.001

to derive from an increased production by the pathologic MC.²⁵ Despite this, data on cytokine production by purified primary MC could not confirm an increased production of inflammatory cytokines at the mRNA level.²⁶ In turn, most of the above studies have specifically focused on cytokine production by MC, while little is known about the potential contribution of other immune cells to the increased levels of inflammation cytokines in SM. Recently, Hermans et al. reported upregulation of proteins associated with the IL6, TLR4, TNF α and IFN type I/II signaling pathways in a small group of eight ISM patients. In parallel, they also found decreased percentages of pDC and monocytes together with an increased proportion of Th2 cells in another group of 18 ISM patients, suggesting signs of broad immune activation, beyond, MC in SM.³⁸ However, functional analysis of the numerically altered immune cells is still missing.

Here, we investigated the potential existence of functional and numerical alterations on blood circulating monocytes and DC in patients with distinct diagnostic subtypes of SM. Overall, our results revealed that increased plasma levels of inflammatory cytokines, such as IL1 β , IL6, IL8 and TNF α and to less extent IL10, but not IL12, IL13 and TGF β , is a hallmark of SM, from BMM and ISM to ASM. Further single cell ex vivo studies demonstrated a parallel increase in the spontaneous production of the same cytokines by blood monocytes in SM, the number of cytokine-producing IL1 β ⁺, IL6⁺ and

TNF α ⁺ cells significantly correlating with their corresponding plasma levels. Although a primary functional alteration of blood monocytes might exist in SM, we could not relate it with the presence of KIT D816V mutated monocytes (Supporting Information). Alternatively, spontaneous in vivo activation and functional impairment of circulating blood monocytes could be a consequence of an underlying MC activation and/or MC immunosenescence. In this regard, the presence of KIT-mutated MC is a hallmark of SM, which has been associated with an increased release of tryptase and others mediators by KIT-mutated MC. Tryptase is known to activate cells that express EMR2 and/or PAR2 on their surface membrane such as human monocytes, EMR2-induced monocyte activation triggering inflammation.¹³ Despite this, here we failed to demonstrate altered plasma and/or monocyte cell surface expression levels of the EMR2 and PAR2 receptors (data not shown), suggesting no direct link between the tryptase-EMR2/PAR2 pathway and activation of blood monocytes in SM. This is further supported by the lack of correlation found here between the altered (cellular and soluble) levels of inflammatory cytokines and both serum tryptase levels and the *TPSAB1* genotype, of BMM, ISM and ASM patients (Supporting Information). Similarly, all senescence associated markers investigated (CXCR2, SAA1 and TLR2) showed normal soluble and cellular expression levels, suggesting activated blood monocytes from SM patients are pro-inflammatory rather than immunosenescent cells.

Despite blood monocytes from SM patients showed an abnormally increased spontaneous production of inflammatory cytokines, these cells appeared to be functionally exhausted, after in vitro stimulation with LPS and IFN γ . However, it should be noted that LPS plus IFN γ induce (conventional) activation of innate cells and polarize macrophages towards an M1-like pro-inflammatory phenotype^{40,41} while Th2 cytokines such as IL4 and IL13 are also activators of monocytes^{42–44} able to polarize these cells towards an M2-like anti-inflammatory phenotype. Consequently our findings might also reveal a different response profile of blood circulating monocytes from SM patients to different stimuli. Further in vitro functional studies in which the response of blood monocytes from SM patients to other stimuli such as to Th2 cytokines are needed to better understand the biological and pathophysiological significance of our findings.

The altered functionality of blood monocytes here reported in SM could also be due to a redistribution of different populations of monocytes in blood with increased numbers of activated monocytes (and potentially also DC). Here we demonstrated that SM patients do exhibit important numerical alterations of blood circulating monocyte and DC populations, in addition to their functional activation. Thus, we confirmed previous data showing decreased total monocyte and DC counts in SM.³⁸ Decreased monocyte counts were at the expense of both iMo and specific (SLAN⁺CD36[−] and SLAN⁺CD36⁺) subsets of ncMo. Despite these alterations were consistent across distinct diagnostic subtypes of SM, important differences were also noted among BMM, ISM and ASM cases. Thus, ISM patients showed lower counts of total monocytes and cMo than ASM cases. In contrast, ncMo (and their SLAN⁺CD36[−] subset) decreased in all

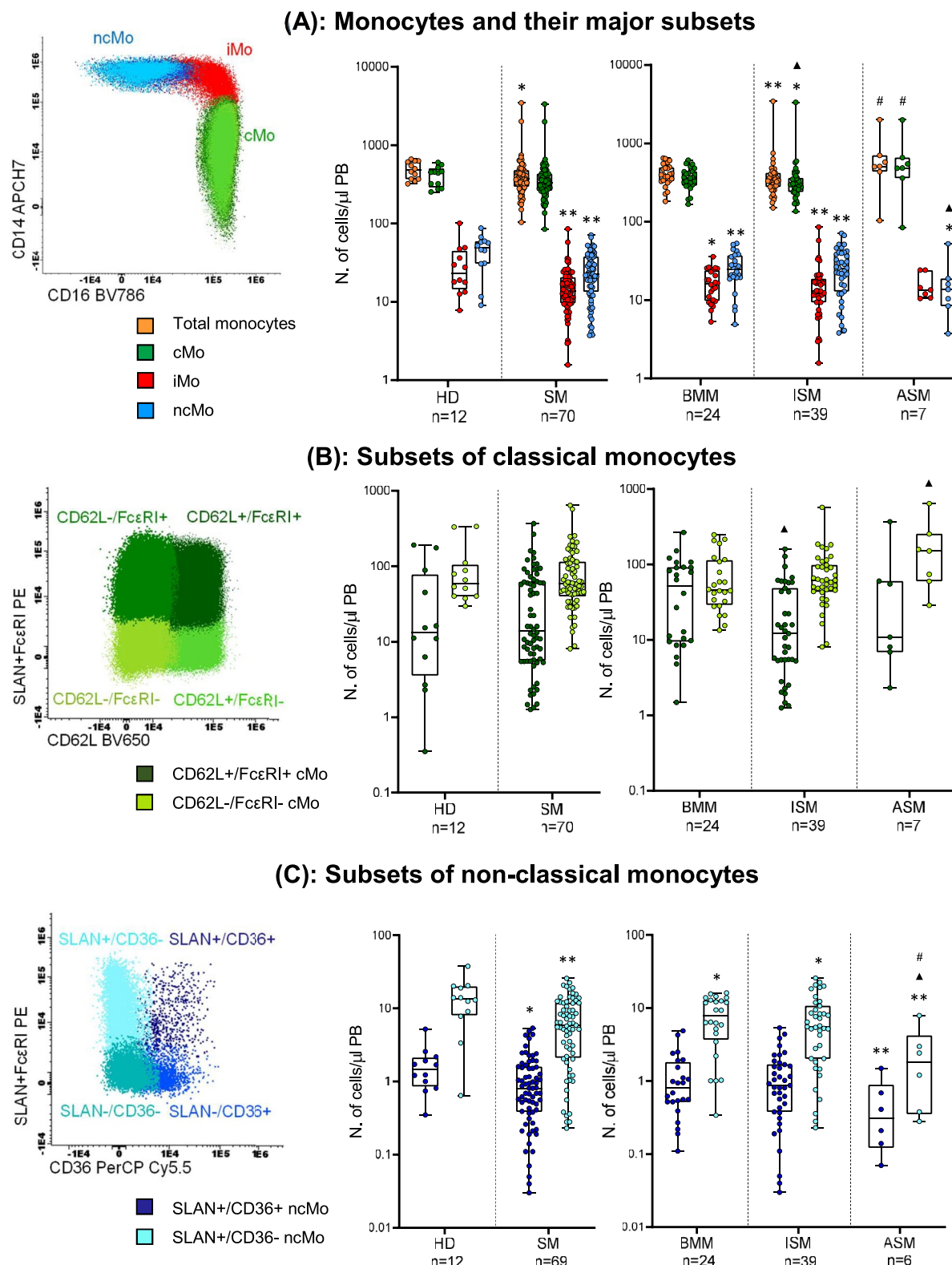


FIGURE 4 Distribution of total monocytes and the different populations of classical (cMo), intermediate (iMo) and non-classical (ncMo) monocytes in blood (left panel) of systemic mastocytosis (SM) patients and healthy donors (HD). A, Distribution of total monocytes and their major subsets of iMo, cMo and ncMo in HD versus all SM patients (middle panel) grouped per disease subtype (right panel). B, Distribution of different subsets of cMo (CD62L⁺/FcεRI⁺ cMo and CD62L⁻/FcεRI⁻ cMo) in blood of HD versus SM (middle panel) distributed according to the diagnostic subtype of the disease (right panel). C, Distribution of different subsets of ncMo (SLAN⁺/CD36⁺ and SLAN⁺/CD36⁻ ncMo) in HD versus SM patients (middle panel) classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease (right panel). Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. * versus HD, ▲ versus BMM, # versus ISM. *p*-values: * < 0.05, ** < 0.010, *** < 0.001, ▲ < 0.05, ▲▲ < 0.01, ▲▲▲ < 0.001, # < 0.05, ## < 0.01, ### < 0.001. BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis

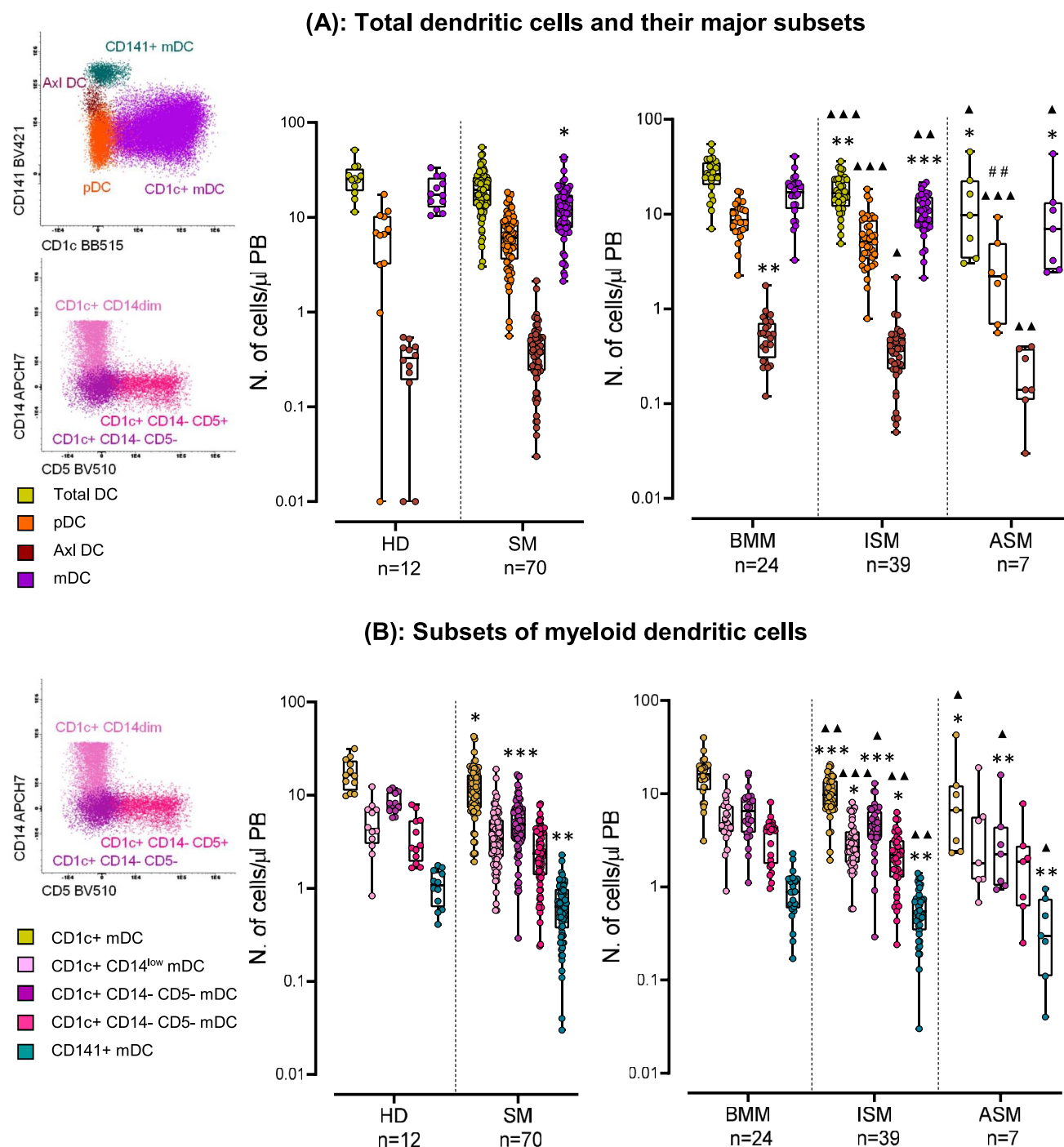


FIGURE 5 Distribution of different populations of dendritic cells (DC) (A) and myeloid DC subsets (B) in blood (left column in A-B) from healthy donors (HD) versus systemic mastocytosis (SM) patients (middle panels in A-B) classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease (right panels in A-B). Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. * versus HD, ▲ versus BMM, # versus ISM. *p*-values: * <0.05, ** <0.010, *** <0.001, ▲ <0.05, ▲▲ <0.01, ▲▲▲ <0.001, # <0.05, ## <0.01, ### <0.001. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis

subtypes of SM, particularly among ASM patients. Overall, these results point out the potential existence of an increased recruitment of blood monocytes -particularly of iMo and terminally differentiated (SLAN⁺) ncMo- to tissues such as the skin where activated clonal MC accumulate. In line with this hypothesis, previous data⁴⁵ has shown

that tumour HMC1 cells produce high levels of monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1 or CCL2), at the same time in vitro activated MC recruit monocytes and induce them to produce inflammatory cytokines such as TNF α .⁴⁵ Fully in line with this, here we also demonstrated that blood monocytes from SM patients display

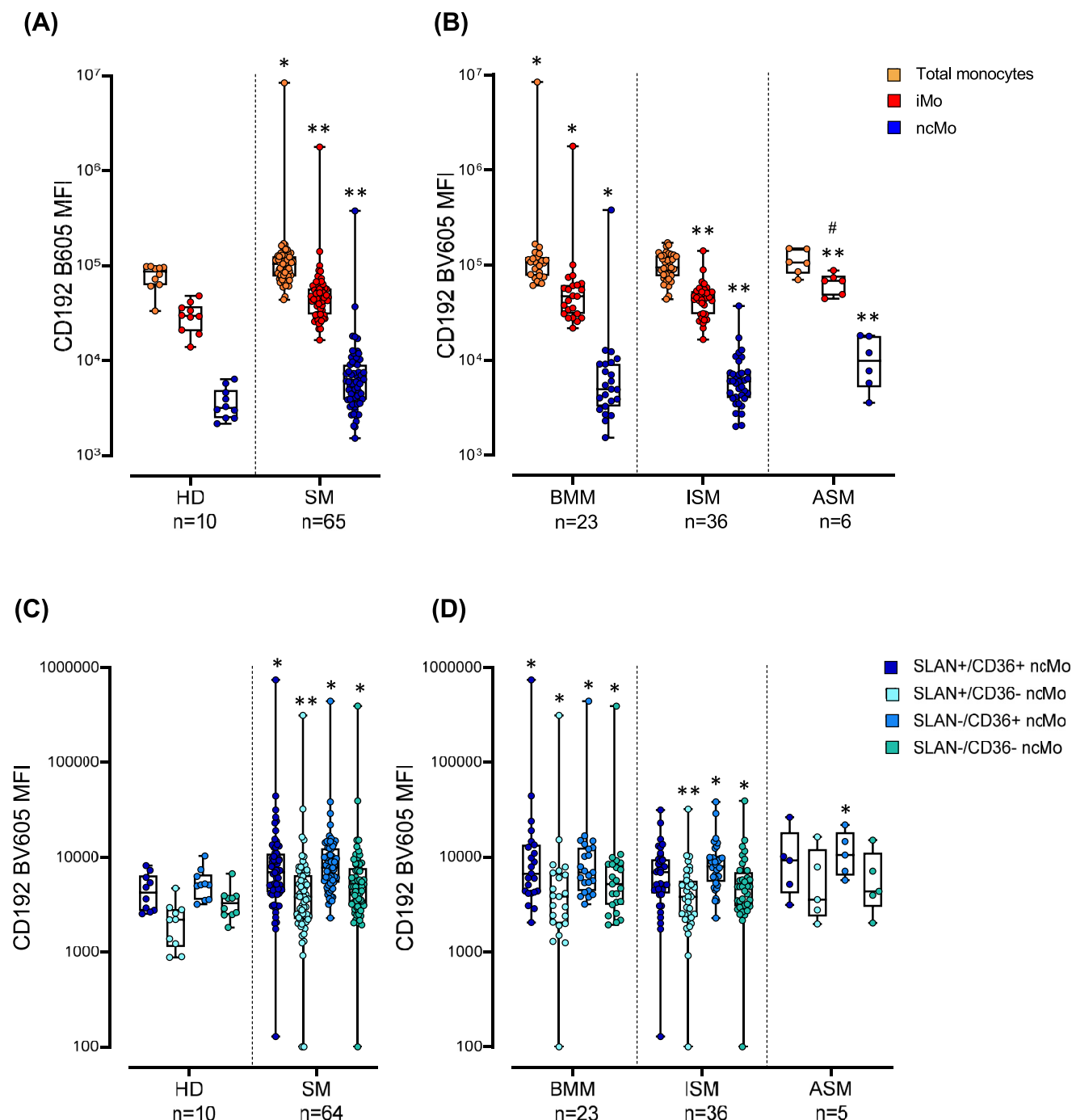


FIGURE 6 Surface membrane expression levels of the CD192/CXCR2 chemokine receptor on circulating blood monocytes and their subsets in healthy donors (HD) versus systemic mastocytosis (SM) patients (A and C) distributed according to the diagnostic subtype of the disease (B and D). Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, and the dots represent each individual case studied. * versus HD, # versus ISM. *p*-values: * <0.05, ** <0.010, *** <0.001, # <0.05, ## <0.01, ### <0.001. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; MFI, mean fluorescence intensity (arbitrary units scaled from 0 to 4,194,304)

increased levels on their surface membrane of the high-affinity MCP-1/CCL2 receptor, CCR2 (CD192) associated with lower CCL2 plasma levels.

Similarly to monocytes, pDC, mDC, and particularly the CD1c⁺, CD1c⁺CD14⁻CD5⁻ and CD141⁺ mDC subsets, were also numerically decreased in blood in SM and expressed increased amounts of

CD192 on their surface membrane. These findings suggest that DC might also undergo increased migration to tissues where clonal MC accumulate. Altogether, these results support and extend on previous observations³⁸ suggesting that clonal MC might produce proteases that affect the skin environment and activate keratinocytes to produce CCL19, in addition to MCP-1/CCL2, (a chemokine that

specifically recruits pDC to tissues) with potential consequences on activation of T-cells.³⁸ Interestingly, decreased counts of total DC, pDC and mDC (and their subsets) were more pronounced in ISM and ASM versus BMM, while Axl-DC were specifically increased in the latter patient group. At present, little is known about Axl-DC. Despite this, Axl-DC have been recently shown to promote T cell proliferation, and to be increased in inflamed tissues such as the lung and skin^{46–49} Altogether, these data suggest that Axl DC might play a specific role in patients presenting with severe MC activation symptoms (e.g. anaphylaxis), a hallmark of BMM. In line with this hypothesis, our data also suggest a close association between higher counts of AXL DC counts, as well as virtually all subsets of DC and monocytes circulating in blood of SM patients, and the occurrence of anaphylaxis (Table 4 in Supplementary Information).

In summary, here we confirm and extend on previous observations in SM, revealing an altered distribution of specific subsets of circulating monocytes and DC, associated with significantly increased numbers of activated but functionally exhausted blood monocytes, leading to increased levels of pro-inflammatory cytokines in plasma. Taken together, these findings point out a broad immune activation in SM, with a potential role for innate myeloid cells other than MC in the pathophysiology and clinical behaviour of mastocytosis; the specific mechanisms involved deserve further investigations.

AUTHOR CONTRIBUTION

Alba Pérez-Pons: Formal analysis; Methodology; Writing – original draft. **Maria Jara-Acevedo:** Formal analysis; Investigation; Supervision. **Ana Henriques:** Data curation; Methodology; Supervision. **Paula Navarro-Navarro:** Formal analysis; Methodology; Supervision. **Andres Garcia-Montero:** Funding acquisition; Investigation; Writing – review & editing. **Ivan Alvarez-Twose:** Data curation; Methodology; Supervision. **Carlos Pedreira E:** Methodology; Software. **Laura Sanchez Munoz:** Data curation; Methodology; Supervision. **Daniela Damasceno:** Methodology; Supervision. **Carolina Caldas:** Methodology; Supervision. **Javier I Muñoz-González:** Formal analysis; Methodology; Supervision. **Almudena Matito:** Data curation; Methodology; Supervision. **Juan Flores-Montero:** Methodology; Supervision. **Oscar González-López:** Methodology; Supervision. **Ignacio Criado:** Methodology. **Andrea Mayado:** Conceptualization; Investigation; Project administration; Supervision; Writing – original draft; Writing – review & editing. **Alberto Orfao:** Conceptualization; Investigation; Project administration; Supervision; Writing – original draft; Writing – review & editing.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (grant number PI19/01166; and Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer [CIBERONC] programme, grant number CB16/12/00400) and co-funded by the European Union (EU). We thank the support of the Spanish National DNA Bank Carlos III (www.bancoadn.org; biobank ID B.0000716; supported by ISCIII and co-founded by EU

[grant number PT20/00085]) for providing plasma samples. APP was supported by a grant of the Government of Castilla y León (Orden EDU/556/2019), Spain; co-financed with the “European Regional Development Fund” (BDNS, Identif.:422058). We thank the support of the Spanish Association of Mastocytosis and Related Diseases.

CONFLICTS OF INTEREST

Authors declared no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Juan Flores-Montero  <https://orcid.org/0000-0002-1119-4387>

Oscar González-López  <https://orcid.org/0000-0002-4169-4294>

Alberto Orfao  <https://orcid.org/0000-0002-0007-7230>

REFERENCES

1. Horny HP, Sotlar K, Valent P, Hartmann K. Mastocytosis – a disease of the hematopoietic stem cell. *Dtsch Arztebl.* 2008;105(40):686–692. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0686>
2. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood.* 2016;129(11):1420–1427. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-731893>
3. 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015545>
4. Larizza L, Magnani I, Beghini A. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2005;46(2):247–255. <https://doi.org/10.1080/10428190400007565>
5. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31(10):1053–1074. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00078-3)
6. 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. <https://doi.org/10.2165/11588890-000000000-00000>
7. Tefferi A, Pardanani A. Systemic mastocytosis: current concepts and treatment advances. *Curr Hematol Rep.* 2004;3(3):197–202.
8. 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. <https://doi.org/10.2174/187152806775269303>
9. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2010;5:99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
10. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853–2868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
11. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis.* 2012;1822(1):21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2010.12.014>

12. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010;3(2):111-128. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.136>
13. Lim J, Iyer A, Liu L, et al. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. *FASEB J.* 2013;27(12):4757-4767. <https://doi.org/10.1096/fj.13-232702>
14. Chang GW, Davies JQ, Stacey M, et al. CD312, the human adhesion-PCR EMR2, is differentially expressed during differentiation, maturation, and activation of myeloid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(1):133-138. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.148>
15. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature.* 1990;346(6281):274-276. <https://doi.org/10.1038/346274a0>
16. Theiner G, Gessner A, Lutz MB. The mast cell mediator PGD2 suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to Th2 polarized immune responses in vivo. *Immunobiology.* 2006;211(6-8):463-472. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.05.020>
17. Skokos D, Botros HG, Demeure C, et al. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol.* 2003;170(6):3037-3045. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3037>
18. Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol.* 2015;6:394. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00394>
19. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7(3):211-217. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.02.013>
20. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
21. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):71-78. <https://doi.org/10.1038/nrc1256>
22. Kulinski JM, Eisch R, Young ML, et al. Skewed lymphocyte subpopulations and associated phenotypes in patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(1):292-301.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.07.004>
23. van der Ploeg EK, Hermans MAW, van der Velden VHJ, Dik WA, van Daele PLA, Stadhouers R. Increased group 2 innate lymphoid cells in peripheral blood of adults with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147:1490-1496.e2.
24. Valent P. KIT D816V and the cytokine storm in mastocytosis: production and role of interleukin-6. *Haematologica.* 2020;105(1):5-6. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.234864>
25. Tobio A, Bandara G, Morris DA, et al. Oncogenic D816V-KIT signaling in mast cells causes persistent IL-6 production. *Haematologica.* 2020;105(1):124-135. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.212126>
26. Teodosio C, García-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):1213-24, 1224.e1-4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.674>
27. 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. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.176>
28. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia.* 2012;26(9):1986-2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>
29. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia.* 2017;31(10):2094-2103. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.29>
30. Diks AM, Khatri I, Oosten LEM, et al. Highly sensitive flow cytometry allows monitoring of changes in circulating immune cells in blood after Tdap booster vaccination. *Front Immunol.* 2021;12:666953. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.666953>
31. Gri G, Frossi B, D'Inca F, et al. Mast cell: an emerging partner in immune interaction. *Front Immunol.* 2012;3:120. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00120>
32. Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(6):475-529. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i6.30>
33. Krystal-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast cell: a multifunctional master cell. *Front Immunol.* 2016;6:620. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620>
34. Mekori YA, Hershtko AY, Frossi B, Mion F, Pucillo CE. Integrating innate and adaptive immune cells: mast cells as crossroads between regulatory and effector B and T cells. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:84-89. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.087>
35. Merluzzi S, Betto E, Ceccaroni AA, Magris R, Giunta M, Mion F. Mast cells, basophils and B cell connection network. *Mol Immunol.* 2015;63(1):94-103. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.02.016>
36. Malamud V, Vaaknin A, Abramsky O, et al. Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of TNF- α , IL-6 and IL-1 β : possible relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;138(1-2):115-122. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00090-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00090-0)
37. Li T, Wang H, He S. Induction of interleukin-6 release from monocytes by serine proteinases and its potential mechanisms. *Scand J Immunol.* 2006;64(1):10-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01772.x>
38. Hermans MAW, Heeringa JJ, Swagemakers SGA, et al. Altered leukocyte subsets and im 1 mune proteome indicate pro-inflammatory mechanisms in mastocytosis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2022;S0091-6749(22)00004-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.12.786>
39. Rabenhorst A, Christopeit B, Leja S, et al. Serum levels of bone cytokines are increased in indolent systemic mastocytosis associated with osteopenia or osteoporosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(5):1234-1237.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.019>
40. Dalton DK, Pitts-meek S, Keshav S, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes Bradley and Timothy A. *Science.* 1993;259:1739-1742.
41. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-483.
42. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci.* 2003;104:27-38.
43. Goerdts S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 1999;10:137-142.
44. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis.* 2003;1639:141-151.
45. Hermans MAW, Schrijver B, van Holten-Neelen CCPA, et al. The JAK1/JAK2-inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(11):1412-1420. <https://doi.org/10.1111/cea.13217>
46. Leylek R, Idoyaga J. The versatile plasmacytoid dendritic cell: function, heterogeneity, and plasticity. *International Review of Cell and*

- Molecular Biology*. 2019;349:177-211. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.10.002>
47. Villar J, Segura E. Decoding the heterogeneity of human dendritic cell subsets. *Trends Immunol* 2020;41(12):1062-1071. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.002>
48. Jardine L, Wiscombe S, Reynolds G, et al. Lipopolysaccharide inhalation recruits monocytes and dendritic cell subsets to the alveolar airspace. *Nat Commun*. 2019;10(1):1999. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09913-4>
49. Chen YL, Gomes T, Hardman CS et al. Re-evaluation of human BDCA-2+ DC during acute sterile skin inflammation. *J Exp Med*. 2020; 217(3): jem.20190811. https://doi.org/10.1084/jem_20190811

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Pérez-Pons A, Jara-Acevedo M, Henriques A, et al. Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients. *Clin Transl Allergy*. 2022; e12167. <https://doi.org/10.1002/clt2.12167>

Artículo 2:

“T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: association with disease features”.

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4}, Cristina Teodosio^{1,2,3}, María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5}, Ana Henriques^{4,6}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4}, Iván Álvarez-Twose^{2,4,6}, Quentin Lecrevisse^{1,2,3}, Rafael Fluxa⁷, Laura Sánchez-Muñoz^{4,6}, Carolina Caldas^{1,2,3,4}, Julio Pozo^{1,2,3}, Silvia Martín^{1,2,3}, Teresa Contreras-Sanfeliciano⁸, Carlos E. Pedreira⁹, Vitor Botofago¹⁰, Oscar González-López^{1,2,4}, Andrea Mayado^{*1,2,3,4}, Alberto Orfao^{*1,2,3,4}

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC); Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

³Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España

⁴Red Española de MAstocitosis (REMA), Toledo y Salamanca, España.

⁵Servicio de Secuenciación (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, España.

⁷Cytognos SL, Salamanca, España.

⁸Departamento de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁹Departamento de Sistemas y Computación (PESC), COPPE, Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), Río de Janeiro, Brasil.

¹⁰Departamento de Hematología y Hemoterapia, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, España.

*AM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben ser considerados como último autor del mismo.

Allergy, 1 de febrero de 2024 *

doi: 10.1111/all.16043.

PMID: 38299742.* La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en formato electrónico en la página web de la revista, así como en el Anexo I incluido al final de la presente memoria de tesis doctoral

Introducción: La SM está integrada por un grupo heterogéneo de enfermedades derivadas de la expansión clonal de mastocitos patológicos. Más del 90% de estos pacientes son portadores de mutaciones asociadas a una ganancia de función en el receptor Kit que originan una activación constitutiva de los mastocitos mutados, y a su vez, inducen la liberación continuada de mediadores mastocitarios al microambiente donde se encuentran otras células del sistema inmune. Actualmente sabemos que el mastocito juega un importante papel inmunomodulador en la inmunidad adaptativa, actuando sobre la presentación de antígenos e induciendo la activación, reclutamiento, proliferación y producción de citoquinas por parte de los linfocitos T. Además, el mastocito tiene la capacidad de inducir la polarización de las células T colaboradoras mediante la liberación de citoquinas que promueven su diferenciación hacia fenotipos Th1, Th2, Th17 o Th22.

Recientemente se ha demostrado la co-localización de mastocitos activados y células T en tejidos infiltrados por agregados de mastocitos en pacientes con SM. Estos hallazgos, junto a los perfiles funcionales alterados de la inmunidad innata observados en la sangre periférica de pacientes con SM, y la disminución de recuentos de células NK y de linfocitos T CD8⁺, además del incremento en los niveles de ILC2 circulantes, apoyan en su conjunto la hipótesis de que la activación de los mastocitos portadores de mutaciones activantes de *KIT* podría tener efectos (directos o indirectos) sobre las células inmunitarias, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, incluyendo efectos sobre los linfocitos T.

Objetivo: En este apartado del trabajo doctoral, nuestro objetivo se centró en estudiar la distribución de distintas poblaciones de células T CD4⁺ y T CD4⁻ presentes en sangre de pacientes diagnosticados de SM, con el fin de comprender mejor el potencial papel de las células T, Tregs y T-citotóxicas en la fisiopatología y el comportamiento clínico de la mastocitosis.

Material y métodos: En conjunto estudiamos un total de 115 pacientes diagnosticados con SM en los centros de referencia de la REMA (Hospital del Valle de Toledo y Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca), incluyendo 38 BMM, 67 ISM y 10 casos de ASM. Como grupo control analizamos 83 donantes sanos del mismo rango de edad que no presentaban antecedentes de alergia ni de otros trastornos inmunitarios. Del conjunto de paciente estudiamos en 115 muestras de sangre periférica, la distribución de células T y sus subpoblaciones, mediante el panel de monitorización inmune de linfocitos T CD4⁺ propuesto por el Consorcio EuroFlow para citometría de flujo espectral. La distribución de las distintas poblaciones celulares identificadas se normalizó por edad respecto a su distribución en el grupo control, y los resultados obtenidos se correlacionaron con la presencia de *KIT*^{D816V} multilineal, el genotipo *TPSAB1* asociado a α -triptasemia (HaT) y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En un subgrupo de 17/115 pacientes y en 31/83 controles se analizaron además muestras de MO, con el objetivo de identificar y cuantificar de forma simultánea las células T, B y NK presentes en las mismas, empleando el tubo de screening de linfocitos (LST; abreviado del inglés, “Lymphocyte Screening Tube”) propuesto por el grupo EuroFlow, y citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad.

Resultados: En conjunto, los pacientes con SM mostraron valores normales en sangre de células T y B totales, con respecto al grupo control. Por el contrario, estos mismos pacientes mostraban cifras de células NK circulantes en sangre significativamente disminuidas ($P < 0.001$), lo que contrastaba con su aumento porcentual en MO. No obstante, aunque los valores de linfocitos T totales en sangre eran normales, los pacientes con SM presentaban cifras significativamente disminuidas de células T citotóxicas CD4⁺, a expensas de la casi totalidad de sus distintos compartimentos madurativos ($P < 0.035$), excepto las células T CD4⁺ naive que estaban incrementadas respecto a valores normales ($P < 0.001$). En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de una disminución significativa de células T citotóxicas y células NK circulantes en la sangre de pacientes con

SM, asociada a una mayor producción y liberación a sangre de células T CD4⁺ naïve. Un análisis detallado de las diferentes subpoblaciones de células T CD4⁺, reveló además la existencia entre los pacientes con SM analizados de valores anormalmente bajos de células T CD4⁺ de tipo Th1 (P=0.015) y sus subpoblaciones, de células Th2 de memoria efectora (EM; abreviado del inglés, “effector memory”) (P=0.042) y de linfocitos T CD4⁺Th22 efectores terminales (TE; abreviado del inglés, “terminal effector”) (P=0.016), junto con un aumento de algunas subpoblaciones de células T foliculares (TFH; abreviado del inglés, “T follicular helper”) (P=0.009).

Un análisis multivariante (análisis canónico) en base a la distribución en sangre de las distintas subpoblaciones T estudiadas (normalizadas por edad) reveló la existencia de distintos perfiles inmunes en los diferentes subtipos diagnósticos de SM, destacando sobre todo el descenso generalizado de la mayor parte de subpoblaciones funcionales efectoras T en la ASM, y en menor medida también, en la ISM y la BMM. Además, al agrupar los pacientes de acuerdo con la presencia de la mutación *KIT*^{D816V} restringida al mastocito (vs multilíneal) y la presencia vs ausencia de un genotipo de HaT, constatamos la existencia de un descenso de células Th2 y Treg de tipo Th2 entre los pacientes que presentaban mutación multilíneal de *KIT*^{D816V} (vs aquellos casos con la mutación restringida al mastocito), y un aumento de los valores de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th17, Th1/Th17 y Th22 en pacientes con SM y HaT. Finalmente, mediante un nuevo análisis multivariante (análisis canónico) demostramos la existencia de una estrecha asociación entre las alteraciones en la distribución de las diferentes subpoblaciones T estudiadas y la presencia (vs ausencia) de signos y síntomas clínicos característicos de la enfermedad como anafilaxia, alergia a veneno de himenópteros, enfermedad ósea, prurito, flushing y síntomas gastrointestinales, cuando restringíamos el análisis a pacientes con BMM e ISM con la mutación restringida al mastocito, desapareciendo estas asociaciones en pacientes con ISM portadores de mutación multilíneal de *KIT* o ASM.

Conclusiones: Los pacientes diagnosticados de SM presentan alteraciones importantes de las distintas subpoblaciones de células T CD4⁺ y T CD4⁻ y de células NK circulantes en sangre, asociándose a diferentes perfiles de alteración inmune a los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad. Además, estos perfiles de alteración inmune muestran una estrecha relación con el patrón de afectación de la hematopoyesis por *KIT*^{D816V}, el genotipo HaT y diferentes manifestaciones clínicas características de la enfermedad, cuando restringimos este último análisis a pacientes con mutación de *KIT*^{D816V} restringidas al mastocito.

T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: Association with disease features

Alba Pérez-Pons^{1,2,3,4}  | Cristina Teodosio^{1,2,3} | María Jara-Acevedo^{1,2,3,4,5} |
Ana Henriques^{4,6,7} | Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,4,5}  | Andrés C. García-Montero^{1,2,3,4} |
Iván Álvarez-Twose^{2,4,6} | Quentin Lecrevisse^{1,2,3} | Rafael Fluxa⁷ |
Laura Sánchez-Muñoz^{2,4,6} | Carolina Caldas^{1,2,3,4} | Julio Pozo^{1,2,3} | Silvia Martín^{1,2,3} |
Teresa Contreras Sanfeliciano⁸ | Carlos E. Pedreira⁹ | Vitor Botafogo¹⁰ |
Oscar González-López^{1,2}  | Andrea Mayado^{1,2,3,4}  | Alberto Orfao^{1,2,3,4} 

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

²Biomedical Research Networking Center Consortium (CIBERONC; CB16/12/00400), Madrid, Spain

³Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

⁴Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo, Salamanca, Spain

⁵Sequencing Service (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

⁶Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Virgen del Valle Hospital, CIBERONC, Toledo, Madrid, Spain

⁷Cytognos SL, Salamanca, Spain

⁸Department of Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

⁹Systems and Computing Department (PESC), COPPE, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

¹⁰Department of Hematology and Hemotherapy, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Correspondence

Alberto Orfao, Centro de Investigación del Cáncer, Campus Miguel de Unamuno, Paseo de la Universidad de Coimbra, 37007 Salamanca, Spain.
Email: orfao@usal.es

Funding information

HORIZON EUROPE Marie Skłodowska-Curie Actions; Junta de Castilla y León; European Regional Development Fund; Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer; Instituto de Salud Carlos III

Abstract

Background: Systemic mastocytosis (SM) is a heterogeneous disease characterized by an expansion of *KIT*-mutated mast cells (MC). *KIT*-mutated MC display activated features and release MC mediators that might act on the tumour microenvironment and other immune cells. Here, we investigated the distribution of lymphocyte subsets in blood of patients with distinct subtypes of SM and determined its association with other disease features.

Methods: We studied the distribution of TCD4⁺ and TCD4[−] cytotoxic cells and their subsets, as well as total NK- and B cells, in blood of 115 SM patients—38 bone

Abbreviations: AdvSM, advanced systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; ASOqPCR, allele-specific oligonucleotide quantitative polymerase chain reaction; BD, Becton Dickinson Biosciences; BM, bone marrow; BMM, bone marrow mastocytosis; CM, central memory; DC, dendritic cells; EE, early effector; EM, effector memory; GI, gastrointestinal; HD, healthy donor; HVA, Hymenoptera venom allergy; H₂T, hereditary α tryptasemia; ICAM-1, adhesion molecule-ligand 1; IFN γ , interferon- γ ; IL, interleukin; ILC2, type II innate lymphoid cells; ISM, indolent systemic mastocytosis; KIT, receptor tyrosine kinase; MAb, monoclonal antibody; MC, mast cell; MCA, mast cell activation; MCL, mast cell leukaemia; NK, natural killer; PB, peripheral blood; PNA, peptide nucleic acid; qdPCR, quantitative real-time digital PCR.; REMA, Red Española de Mastocitosis (Spanish network on mastocytosis); sAP, serum alkaline phosphatase; sBT, serum baseline tryptase; SD, standard deviation; sLDH, serum lactate dehydrogenase; SM, systemic mastocytosis; SM-AHN, systemic mastocytosis associated with another haematological neoplasm; SSM, smoldering systemic mastocytosis; s β 2M, serum beta2-microglobulin; TE, terminal effector; TFH, T-follicular helper; TGF- β , transforming growth factor β ; Th, T helper; TM, transitional memory; TNF α , tumour necrosis factor α ; Treg, T-regulatory cells; WHO, World Health Organization.

Andrea Mayado and Alberto Orfao have equally contributed to this work and should be considered as joint senior authors.

Universidad de Salamanca: <https://ror.org/02f40zc51>.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2024 The Authors. *Allergy* published by European Academy of Allergy and Clinical Immunology and John Wiley & Sons Ltd.

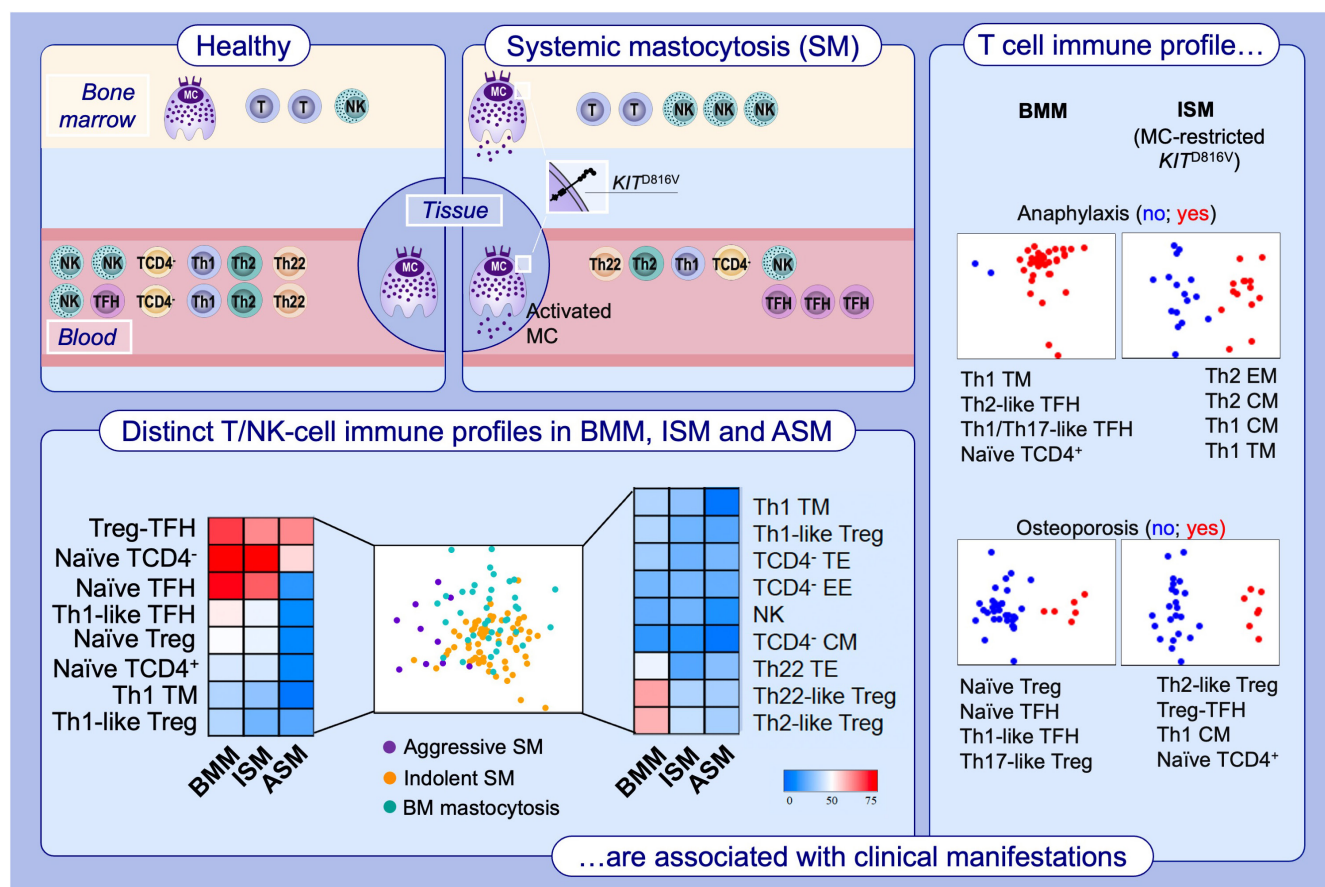
marrow mastocytosis (BMM), 67 indolent SM (ISM), 10 aggressive SM (ASM)- and 83 age-matched healthy donors (HD), using spectral flow cytometry and the EuroFlow Immunomonitoring panel, and correlated it with multilineage KIT^{D816V} , the alpha-tryptasemia genotype (H α T) and the clinical manifestations of the disease.

Results: SM patients showed decreased counts (vs. HD) of TCD4⁺ cytotoxic cells, NK cells and several functional subsets of TCD4⁺ cells (total Th1, Th2-effector memory, Th22-terminal effector and Th1-like Tregs), together with increased T-follicular-helper and Th1/Th17-like Treg counts, associated with different immune profiles per diagnostic subtype of SM, in multilineal versus MC-restricted KIT^{D816V} and in cases with a H α T⁺ versus H α T⁻ genotype. Unique immune profiles were found among BMM and ISM patients with MC-restricted KIT^{D816V} who displayed H α T, anaphylaxis, hymenoptera venom allergy, bone disease, pruritus, flushing and GI symptoms.

Conclusion: Our results reveal altered T- and NK-cell immune profiles in blood of SM, which vary per disease subtype, the pattern of involvement of haematopoiesis by KIT^{D816V} , the H α T genotype and specific clinical manifestations of the disease.

KEYWORDS

cytotoxic T cells, helper T cells, lymphocytes, mast cells, systemic mastocytosis



GRAPHICAL ABSTRACT

Constitutively activated tumour MC in SM patients are associated with a broad activation of the innate immune response and an altered distribution of other adaptive immune cells. The altered circulating T- and NK-cell immune profile in SM varies depending on disease subtype, the pattern of involvement of haematopoiesis by KIT^{D816V} , the H α T genotype and specific clinical manifestations of the disease. These altered immune profiles contribute to a better understanding of the different patterns of clinical manifestations of the disease, independently of the MC burden.

1 | INTRODUCTION

Systemic mastocytosis (SM) consists of a group of heterogeneous disorders resulting from the clonal expansion of morphologically and immunophenotypically aberrant mast cells (MC) that accumulate in one or more organ systems, such as the skin, bone marrow (BM) and the gastrointestinal (GI) tract.^{1–3} Based on the World Health Organization (WHO) 2022 classification, SM is further divided into BM mastocytosis (BMM), indolent SM (ISM), smoldering SM (SSM) and advanced forms of SM (AdvSM) that include aggressive SM (ASM), SM with an associated haematological neoplasm (SM-AHN) and mast cell leukaemia (MCL).^{4–6} At present, it is well-established that most ($\approx 95\%$) SM patients display gain-of-function mutations of *KIT*, a gene that encodes for a type III tyrosine kinase receptor (CD117) expressed by haematopoietic precursor cells and MC, which plays a key role in regulating MC proliferation, maturation, adhesion, chemotaxis and survival.⁷ In $>90\%$ of the cases, the *KIT*^{D816V} mutation is found, whereas other *KIT* mutations are identified in $\approx 1\%$ – 4% of the patients.⁸ Constitutive activation of mutated *KIT* leads to an increased release of MC mediators (e.g., tryptase and histamine) and inflammatory cytokines, which exert multiple effects on the MC microenvironment, including on other immune cells.^{9–13}

MC are key players in the first-line defence during the innate immune response.¹⁴ In addition, MC also play an important role in the adaptive immune response through the secretion of soluble molecules and/or direct interactions with other surrounding (e.g., immune) cells.¹⁵ Thus, activated MC can modulate antigen presentation and induce activation, recruitment, proliferation and cytokine production by multiple T-cell subsets.^{16,17} Among other molecules, these processes involve cell adhesion proteins such as ICAM-1 (adhesion molecule-ligand 1), antigen-presenting molecules like HLA-I and HLA-II, and the CD80, CD86 and OX40L (CD252) molecules which act as costimulatory ligands for CD28⁺ T cells and T-regulatory cells (Tregs).¹⁸ Moreover, MC also have the ability to support polarization of T helper (Th) responses by TCD4⁺ lymphocytes, through secretion of cytokines such as interleukin (IL)-12 and interferon- γ (IFN γ) for Th1 cells, IL-4 for Th2 T-lymphocytes, IL-6 and tumour growth factor (TGF)- β for Th17 priming, and IL-6 plus tumour necrosis factor (TNF)- α for polarization of T-lymphocytes towards Th22 cells.¹⁹ Of note, increasing evidence exists about the selective colocalization of activated MC and T cells in inflamed tissues in disease conditions where MC play a regulatory role,²⁰ (e.g., graft-versus-host disease, several autoimmune disorders and chronic inflammatory diseases), in addition to the tissue MC aggregates found in SM patients.¹⁶

Thoroughly, the above findings suggest that constitutively activated MC from SM patients might exert direct effects on other innate immune cells, as well as on T-lymphocytes. In this regard, previous studies have reported an altered innate immune response associated with increased numbers of activated, but functionally exhausted, monocytes and dendritic cells (DC) in blood of SM patients, in parallel to increased plasma levels of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α .²¹ These immunological effects

might also contribute to explain the abnormally decreased blood counts of both natural killer (NK) cells and TCD8⁺ T-lymphocytes,²² together with the increased number of circulating type II innate lymphoid cells (ILC2)²³ and TCD4⁺ cells,²⁴ previously reported in ISM.^{22–24} However, both the local interplay between the activated MC and the T, NK and B cells in different diagnostic subtypes of SM other than ISM, and their impact on the clinical manifestations of the disease, still remain largely unexplored. Here, we hypothesized that the release of mediators from constitutively activated MC cells from SM patients might exert downstream effects on both innate and adaptive cells such as NK- and T cells. In turn, these effects might modulate MC activation (MCA) and MCA-associated symptoms and signs of the disease.

In this study, we investigated the distribution of circulating T, B and NK cells in blood of a large cohort of SM patients with distinct disease subtypes, with a special focus on the distribution of distinct functional populations of TCD4⁺ cells. Our aim was to gain insight into the potential role of pivotal adaptive Th and Treg cells in the pathophysiology and clinical behaviour of mastocytosis.

2 | METHODS

2.1 | Patients, controls and samples

A total of 115 patients—67 women and 48 men; median age of 55 years (range: 27–77 years)—consecutively diagnosed with SM between June 2019 and June 2023, and retrospectively classified according to the WHO 2022 criteria,^{4–6} at the reference centres of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA; Institute of Mastocytosis Studies-CLMast-, Hospital Virgen del Valle, Toledo; and Cancer Research Centre, Salamanca, Spain), based on standardized histopathologic, cytomorphologic, immunophenotypic, biochemical and molecular criteria, were included in this study. Patients enrolled in clinical trials and/or cytostatic treatment were specifically excluded. Thirty-eight patients had BMM, 67 ISM and 10 ASM. In parallel, 105 age-matched (median age: 52 years; range: 21–80 years) healthy donors (HD) who had no past or present history of allergy or other immune disorders were studied as controls. Clinical data about the presence versus absence (and severity) of disease features such as anaphylaxis, hymenoptera venom allergy (HVA), bone disease (i.e., osteopenia, osteoporosis and/or bone lesions—osteolytic lesions and patchy or diffuse bone sclerosis), pruritus, flushing, GI symptoms, history of *Helicobacter Pylori* infection and other bacterial/viral infections (i.e., recurrent urinary tract infections, recurrent respiratory infections, bilateral pneumonia and recurrent COVID infection) were retrospectively collected (Table 1). Prior to entering the study, each patient and HD gave his/her written informed consent to participate, according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committees of the two participating institutions (approval codes: PI-2022-03-997 and PI-2019-03-260).

TABLE 1 Demographic, clinical and laboratory findings at diagnosis in adult systemic mastocytosis patients ($n=109$), distributed according to the distinct WHO 2022 diagnostic subtypes of the disease.

Variable	SM ($n=115$)	BMM ($n=38$)	ISM ($n=67$)	ASM ($n=10$)	p Value
Age (y)*	55 ± 11	54 ± 9	55 ± 12	64 ± 11	<.034 ^{b,d}
Sex (M/F)	48/67 (41.7%/58.3%)	19/19 (50%/50%)	24/43 (35.8%/64.2%)	5/5 (50%/50%)	NS
Anaphylaxis	66 (57.4%)	36 (94.7%)	26 (38.8%)	4 (40%)	<.001 ^{a,b}
Skin lesion	76 (66.1%)	0 (0%)	67 (100%)	9 (90%)	<.009 ^d
Venom allergy	28 (24.3%)	18 (47.4%)	9 (13.4%)	1 (10%)	<.032 ^{a,b}
Osteopenia	50 (43.5%)	21 (55.3%)	28 (41.8%)	1 (10%)	.011 ^b
Osteoporosis	23 (20%)	6 (15.8%)	17 (25.4%)	0 (0%)	NS
Bone sclerosis	20 (17.4%)	1 (2.6%)	11 (16.4%)	8 (80%)	<.033 ^d
<i>H. Pylori</i> infection	18 (15.7%)	3 (7.9%)	13 (19.4%)	2 (20%)	NS
Pruritus	57 (49.6%)	12 (31.6%)	39 (58.2%)	6 (60%)	.009 ^a
Flushing	43 (37.4%)	10 (26.3%)	28 (41.8%)	5 (50%)	NS
GI symptoms	41 (35.6%)	11 (28.9%)	22 (32.8%)	8 (80%)	<0.004 ^{b,c}
HαT ⁺ genotype	12/85 (14.1%)	6/25 (26.3%)	4/51 (7.8%)	2/9 (22.2%)	NS
Haemoglobin ($\times 10^9$ /l)*	14 ± 1.5	14.3 ± 1.4	13.8 ± 1.2	11.2 ± 1.5	<.026 ^d
N. of platelets ($\times 10^9$ /L)*	233 ± 65	230 ± 50	235 ± 63	235 ± 119	NS
N. of leucocytes ($\times 10^9$ /L)*	6596 ± 1916	6800 ± 1809	6480 ± 1667	6600 ± 3523	NS
Serum tryptase (ng/mL)*	99 ± 171 ($n=113$)	26 ± 22	85 ± 84 ($n=65$)	466 ± 374	<.001 ^d
Serum IgE (KU/l)	70 ± 136	126 ± 168	48 ± 116	8 ± 9	<.027 ^d
Serum LDH (U/l)	149 ± 48	159 ± 51	145 ± 42	138 ± 67	<.011 ^{a,b}
SAP (U/l)	88 ± 70	70 ± 19	76 ± 27	238 ± 167	<.001 ^{b,c}
Serum β -2-microglobulin (μ g/mL)	2.4 ± 1.4	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.5	4.8 ± 3.8	<.001 ^{b,c}
<i>KIT</i> ^{D816V} mutation	113 (98.3%)	36 (94.7%)	67 (100%)	10 (100%)	NS
Other <i>KIT</i> mutations	D816H 1 (0.9%) D816Y 1 (0.9%)	D816H 1 (2.6%) D816Y 1 (2.6%)	0 0	0 0	NS
% of BMMC* by FCM	0.44% ± 1.2 ($n=109$)	0.06% ± 0.06 ($n=36$)	0.29% ± 0.40 ($n=63$)	2.7 ± 3.2%	<.004 ^d

Note: Results expressed as number of cases (percentage) or as*mean ± one standard deviation (SD).

Abbreviations: ASM, aggressive systemic mastocytosis; BM, bone marrow; BMM, bone marrow mastocytosis; F, female; FCM, flow cytometry; ISM, indolent systemic mastocytosis; LDH, lactate dehydrogenase; M, male; MC, mast cell; NS, statistically not significantly different ($p > .05$); SAP, serum alkaline phosphatase; SM, systemic mastocytosis; y, years.

^aBMM versus ISM patients.

^bBMM versus ASM patients.

^cISM versus ASM patients.

^dAll SM patients.

2.2 | Flow cytometric identification and quantification of total lymphocytes, NK cells, B cells, T cells and their subsets

Blood and BM samples were separately collected in tubes containing (K3) EDTA and stained fresh (<24 h) after collection. Blood samples were stained with the 14-color Euroflow Immune monitoring (IMM) TCD4⁺ tube, and BM samples were stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) (Table S1), following the EuroFlow standard operating procedures (SOP) (www.euroflow.org) for staining of cell surface membrane markers-only, aimed at simultaneous immunophenotypic identification of T, B and NK cells, as well as the most relevant maturation-associated and functional subsets of TCD4⁺ cells.²⁵ Stained blood samples

were measured in 3- and 5-laser Aurora flow cytometers (Cytek® Biosciences, Fremont, CA) equipped with the SpectroFlo® software (Cytek), while BM samples were analysed in a FACSCanto II flow cytometer (Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA) using the FACSDiva™ software (BD). For flow cytometry data analysis, the Infinicyt™ software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was used as described in the article's online repository materials and illustrated in Figures S1 and S2.

2.2.1 | *KIT* mutational analysis

The *KIT*^{D816V} mutation was investigated in genomic (g) DNA from whole BM and FACS-purified ($\geq 97\%$ purity) BM MC, eosinophils,

monocytes, neutrophils, CD34⁺ haematopoietic precursors cells (HPC) and T cells from each SM patient, using a previously described allele-specific oligonucleotide quantitative PCR (ASOqPCR) approach²⁶ and a peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR-clamping method,^{8,27,28} respectively.

2.2.2 | *TPSAB1* genotyping

TPSAB1 genotyping was performed in gDNA from 85 SM patients using a quantitative real-time digital PCR (qdPCR) assay, as described elsewhere.^{29,30} For this purpose, the Biomark™ HD system (Standard BioTools Inc., San Francisco, CA) and the Digital PCR Analysis Software (Standard BioTools Inc.) were used. Hereditary α -tryptasemia (H α T) was defined whenever ≥ 3 copies of the α -tryptase gene allele or 2 copies of the α -tryptase gene allele in the presence of 3 copies of the β -tryptase gene were found, following previously established criteria.²⁹

2.2.3 | Statistical methods

Power calculations (based on the comparison of means for quantitative data) were used to define the number of patients (vs. controls) required for the identification of statistically significant differences between independent groups with a similar (50% vs. 50%) distribution (EPIDAT4.2; Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Spain). For this purpose, we assumed that the two study groups to be compared have unknown, but similar, variances, with an expected mean difference in the variables of interest of $\geq 10\%$, resulting in a sample size of ≥ 64 patients (and controls) for a confidence level of 95% and a power of 80%. For all continuous variables, median (range) and mean ($\pm$ standard deviation; SD) values, as well as the 10th, 25th, 75th and 90th percentiles, were calculated, while for categorical variables, frequencies were used. The statistical significance of differences observed among groups was assessed employing the Kolmogorov–Smirnov and the Mann–Whitney *U* tests (for continuous variables) or the chi-square and Fisher exact tests (for categorical variables). *p*-values $< .05$ [with a false discovery rate (FDR) correction for multiple comparisons of $< 10\%$] were considered to be associated with statistical significance. For all statistical analyses, the IBM-SPSS software (version 28.0.0.0; IBM, Armonk, NY) and the MIDAS software (Massive Information Data Analysis Software v2.0.5.d; Cytognos SL) were used. Normalization of leucocyte values by age was performed with the MIDAS software as explained in detail elsewhere.³¹ Canonical multivariate analysis (CA) was used for identification of the T- and NK-cell populations which displayed the highest discriminatory value between different groups of patients and clinical manifestations of the disease, based on the evaluation of 27 different cell populations. Hierarchical clustering analysis was performed using Euclidean distances and the average linkage clustering method, employing the MultiExperiment Viewer version 4.9.0 software.³² Figures were plotted using MIDAS (v2.0.5.d) and GraphPad Prism (v8.0.2).

3 | RESULTS

3.1 | Distribution of NK cells, B cells, T-lymphocytes and their subsets in blood of SM patients

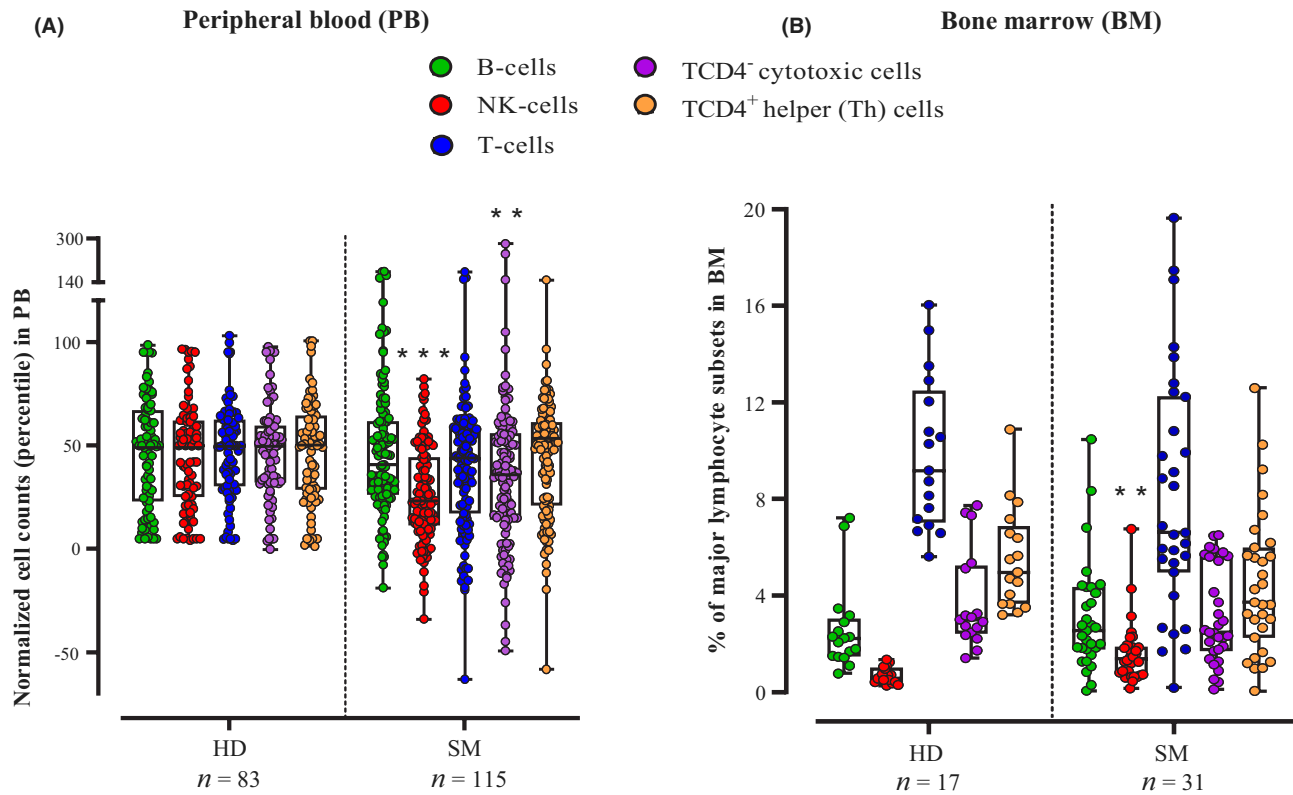
Significantly decreased numbers of total NK cells ($p < .001$), together with normal total B- and total T-cell counts, were observed in blood of SM patients versus HD (Figure 1A) (Table S2). In contrast, a higher percentage of NK cells ($p = .004$) associated with normal (total) B-cell and T-cell numbers were found in the BM of SM patients compared to normal BM (Figure 1B). Despite the overall normal T-cell counts, within T cells, SM patients also showed decreased values in blood of cytotoxic TCD4⁺ cells ($p = .008$ vs. HD) (Figure 1A), including lower counts of CM ($p < .001$), TM ($p = .004$), early effector (EE) ($p = .001$) and TE ($p = .035$) cytotoxic TCD4⁺ cells, but higher (vs. HD) naive TCD4⁺ cell counts ($p < .001$) (Figure 1C). Interestingly, lower counts of programmed cell death protein 1 (PD1⁺) naive ($p = .011$), EE ($p = .028$) and TM cytotoxic TCD4⁺ cells ($p = .028$) were also found in blood of SM patients compared with HD (Figure S6). Altogether, these results point out the existence of an imbalanced (i.e., decreased) distribution of total cytotoxic T cells and NK cells in SM, together with an increased production and release to blood of naive cytotoxic T cells. These alterations were associated with apparently (overall) normal TCD4⁺ cell numbers and B-cell counts as well as IgA, IgG and IgM immunoglobulin serum levels (Figure S5), but not IgE plasma levels which were higher in BMM and decreased in ISM and particularly in ASM patients ($p < .027$) (Table 1).

Despite the normal total TCD4⁺ cell counts, more detailed analysis of the TCD4⁺ cell compartment in blood of SM patients revealed decreased counts (vs. HD) of (total) Th1 cells ($p = .015$) at the expense of lower Th1 CM ($p = .004$), TM ($p < .001$) and TE ($p = .013$) cells (Figure 2A). This was paralleled by decreased counts of total TCD4⁺ TE cells ($p = .035$) (Figure 1C), Th2 effector memory cells ($p = .042$) and Th22 terminal effector cells ($p = .016$) (Figure 2B). Conversely, increased counts of CD4⁺ TFH cells ($p = .009$) at the expense of their naive ($p < .001$), Th17-like ($p = .04$) and Treg-TFH functional compartments ($p < .001$) were found in SM versus HD, together with lower Th1-like Treg cell counts ($p = .002$) (Figure 2C,D).

3.2 | Immune cell profiles in blood of SM

Multivariate canonical analysis (CA) based on the normalized distribution of the distinct lymphocyte subsets analysed in blood showed clearly different immune profiles in SM patients versus HD, as well as among the distinct diagnostic subtypes of SM (Figure 3A–D). Thus, ASM cases displayed a clearly unique immune profile compared to both ISM and BMM patients, which consisted of significantly decreased numbers of most maturation-associated and functional subsets of T cells (Figure 3C,D). In contrast, a significant overlap existed between BMM and ISM patients (Figure 3B), ISM cases showing a tendency towards an intermediate profile between BMM and ASM

Major lymphocyte populations



(C) Maturation-associated T-cytotoxic (CD4⁻) and T helper/Treg cell (CD4⁺) populations

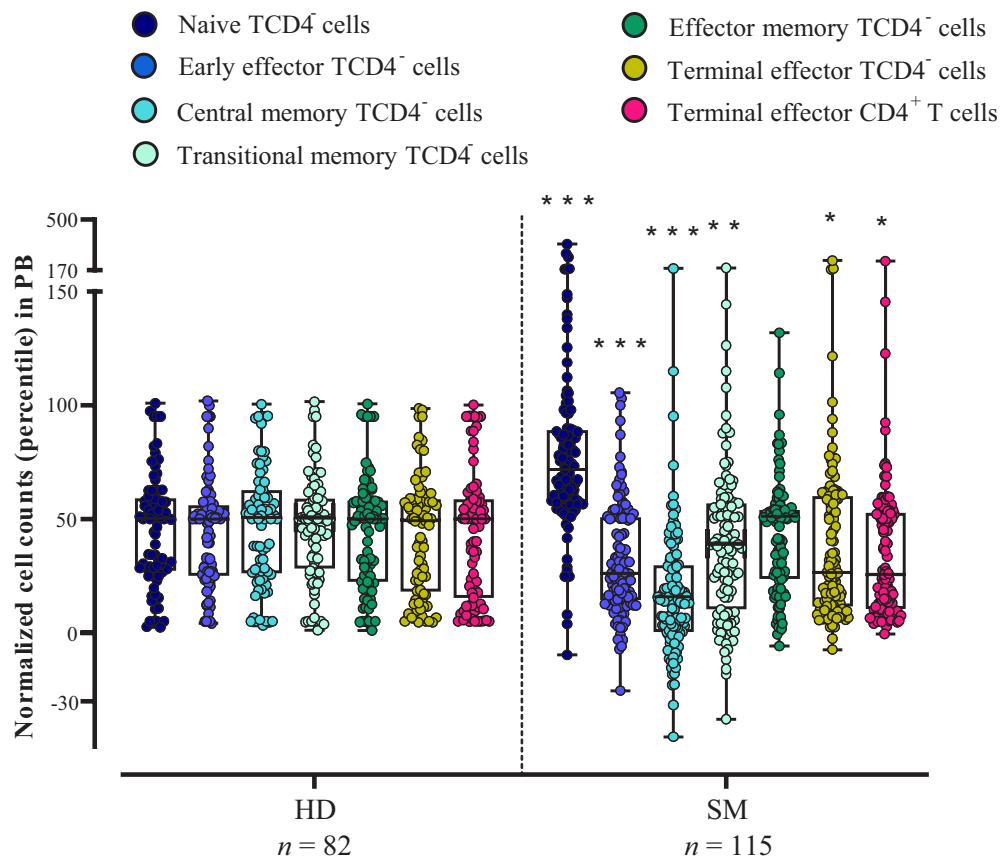


FIGURE 1 Distribution of the major populations of lymphocytes and their subsets in blood and the bone marrow (BM) of systemic mastocytosis (SM) patients compared to healthy donors (HD). Distribution of B lymphocytes, NK cells, total T cells and TCD4⁺ cytotoxic and CD4⁺ T-helper (Th) cells in blood (A) and BM (B); and (C) TCD4⁺ naive, central memory, transitional memory, early effector, effector memory and terminal effector cells, and TCD4⁺ terminal effector. Notched boxes correspond to normalized box plots based on 5th–95th percentile values observed among age-matched HD which extend from 25th to 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analysed. *p*-values: * $<.05$, ** $<.010$, *** $<.001$. HD, healthy donor; NK cells, natural killer cells; SM, systemic mastocytosis; Th, T helper cell.

cases (Figure 3A). Those subsets that contributed most to the altered immune cell profiles in BMM, ISM and ASM cases compared to HD included: naive TFH, Treg and TCD4⁺ cells, together with Treg-TFH cells, Th1 TM and Th22-like Tregs. Treg-TFH cells and naive TCD4⁺ cells were increased in all diagnostic subtypes of SM, particularly among BMM cases, whereas naive TFH cell values were increased in blood of BMM and ISM cases, whereas higher Th22-like Treg cell counts were restricted to BMM patients. Conversely, Th1 TM showed decreased values in all SM patients, with particularly lower counts among ASM patients, while naive Tregs were decreased in ISM and ASM, but not in BMM cases (Figure 3E).

Among SM patients, those lymphocyte populations that most discriminated between BMM and ISM cases were the Th1-like and Th2-like Tregs, and the Th22 TE TCD4⁺ cell populations, in addition to NK cells and some cytotoxic T-cell subsets like TCD4⁺ TE and EE cells. Th2-like Tregs showed slightly increased values in BMM, while they were decreased in ISM. Cytotoxic T cells (including their TE and EE subsets) and NK cells were systematically decreased in blood of all SM cases, whereas Th22 TE cells were found to be more prominently decreased among ISM cases (Figure 3E). Likewise, the most informative T-cell subsets for the discrimination between BMM and ASM patients also included Th2-like Tregs and T-cytotoxic subsets such as TCD4⁺ TE, EE and CM cells, together with naive TCD4⁺ cells. Th2-like Tregs were found at increased values in BMM, while they were decreased in ASM. Naive TCD4⁺ cells showed decreased values in both BMM and, particularly, ASM cases, while TCD4⁺ TE, EE and CM cells systematically displayed decreased values in both BMM and ASM patients. Finally, for the discrimination between ISM and ASM, Th1-like TFH cells, together with naive TCD4⁺ and NK cells (more significantly decreased in ASM than ISM patients), Th22 TE cells (more prominently decreased in ISM vs. ASM), and Th1-like Treg (decreased in both groups), were those immune cell populations that contributed the most (Figure 3E).

3.3 | Distribution of TCD4⁺ cells and their subsets in blood of ISM patients with MC-restricted versus multilineal *KIT* mutation

In order to investigate the potential association between the degree of involvement of haematopoiesis by the *KIT*^{D816V} mutation and the T-cell immune profile, ISM patients ($n=67$) were group according to the presence of MC-restricted versus multilineal *KIT*^{D816V} (Figure S6). Total Th2 cells ($p=.006$) and their more mature Th2 CM ($p=.016$), Th2 TM ($p=.016$) and Th2 EM ($p=.025$) subsets, as well

as Th2-like Tregs ($p=.010$) were all significantly decreased in blood of ISM patients with multilineal *KIT* compared to ISM patients that displayed a MC-restricted *KIT*^{D816V} profile (Figure 4A). Altogether, these findings point out a significantly more pronounced Th2 cell depletion in ISM presenting with multilineage versus MC-restricted *KIT*^{D816V}, in line with the even lower Th2 cell counts found in ASM. Of note, no statistically significant differences were found between ISM patients with MC-restricted versus multilineal *KIT*^{D816V} for any of the other lymphocyte populations analysed.

3.4 | Distribution of T cells and their subsets in blood of SM patients with a H α T⁺ versus H α T⁻ genotype

In a subset of 85 SM patients in whom the *TPSAB1* genotype had been assessed, including 12/85 (14.1%) H α T⁺ cases, we further investigated the potential association between H α T and the distribution of the different lymphocyte populations in blood. Compared to H α T⁻ cases, H α T⁺ SM patients displayed higher blood counts of several TCD4⁺ cell subsets including: Th17 EM ($p=.004$) and Th17 TE ($p=.027$) cells, Th22 EM ($p=.032$) and Th22 TE ($p=.041$) cells, Th1/Th17 cells ($p=.036$) and their Th1/Th17 CM ($p=.033$) and Th1/Th17 EM ($p=.027$) subsets (Figure 4B). Interestingly, the overall frequency of anaphylaxis was higher ($p>.05$) among our H α T⁺ (83.3%) versus H α T⁻ SM patients (54.8%) and these differences were maintained when BMM patients who had been diagnosed because of anaphylaxis were excluded from the analysis (66.6% vs. 37.7%, respectively; $p>.05$). In order to further investigate whether these differences were due to increased tryptase levels, we correlated baseline serum tryptase levels with the distribution of the different subsets of T cells, B cells and NK cells in blood, no significant association being observed for any of the cell subsets investigated. These results suggest that in SM, the altered blood T and NK-cell immune profiles observed are not directly dependent on the patient baseline serum tryptase levels.

3.5 | Association between the immune T-cell profile in blood and the clinical manifestations of SM

History of *H. pylori* infection and other bacterial/viral infections, anaphylaxis, HVA, bone disease and several other relevant MC activation-associated symptoms were recorded and compared between BMM and ISM patients presenting with a MC-restricted

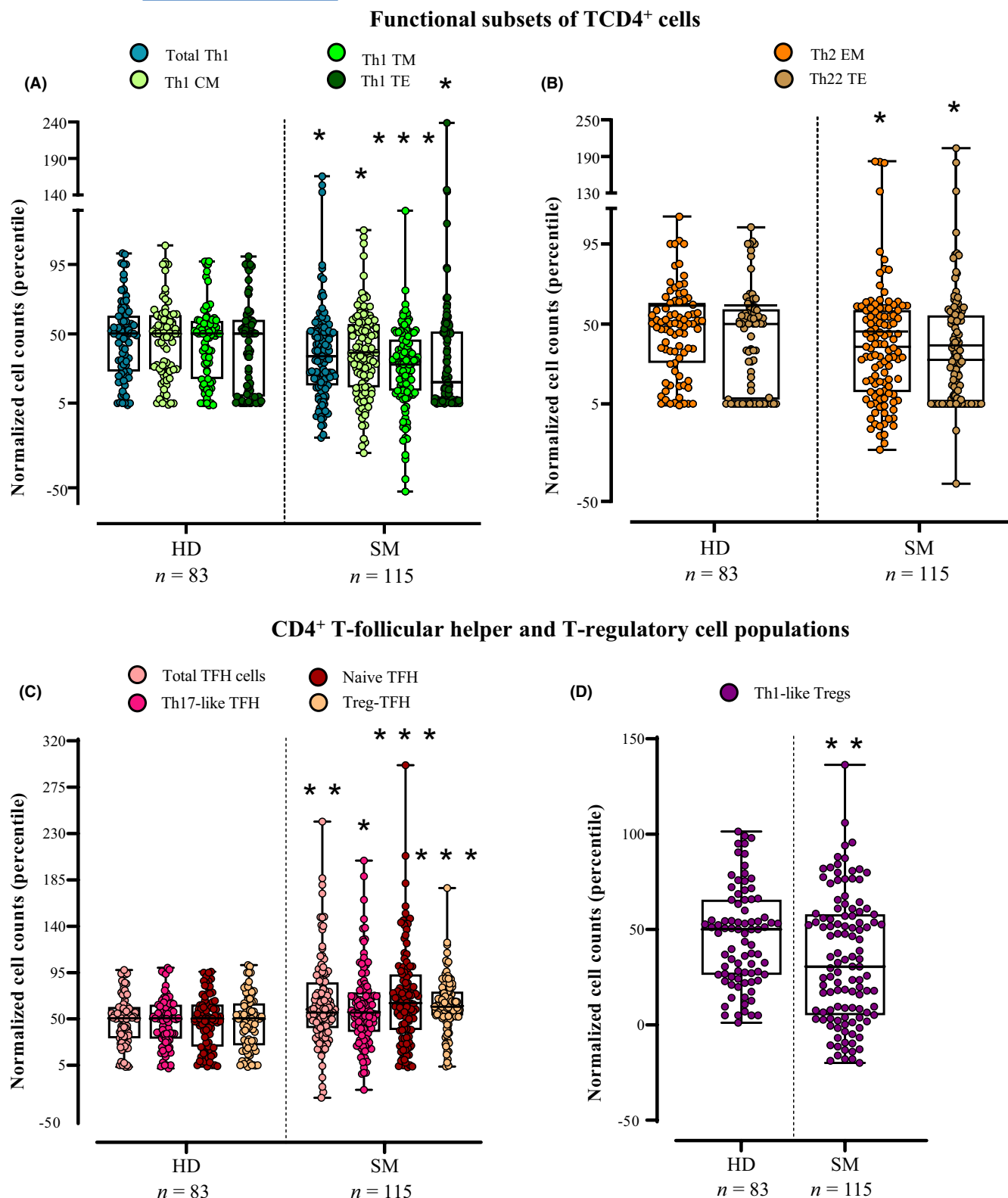


FIGURE 2 Distribution of different functional compartments of CD4⁺ T-helper, T-follicular helper (TFH) and T-regulatory (Tregs) cells in blood of systemic mastocytosis (SM) patients ($n=115$) compared to healthy donors (HD; $n=83$). In panel (A) TCD4⁺ Th1 cells, Th1 central memory cells, Th1 transitional memory cells and Th1 terminal effector cells are shown. In panel (B) Th2 effector memory cells and Th22 terminal effector cells are displayed, while in panel (C) total CD4⁺ TFH cells and their naive, Th17-like and Treg-TFH cell subsets, are shown. In panel (D) Th1-like Treg cells are depicted. Notched boxes correspond to normalized box plots based on 5th–95th percentile values observed among age-matched healthy donors (HD) which extend from the 25th to the 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analysed. p -values: * $<.05$, ** $<.010$, *** $<.001$. HD, healthy donor; SM, systemic mastocytosis; TFH, T-follicular helper cell; Th, T helper cell; Tregs, T-regulatory cells.

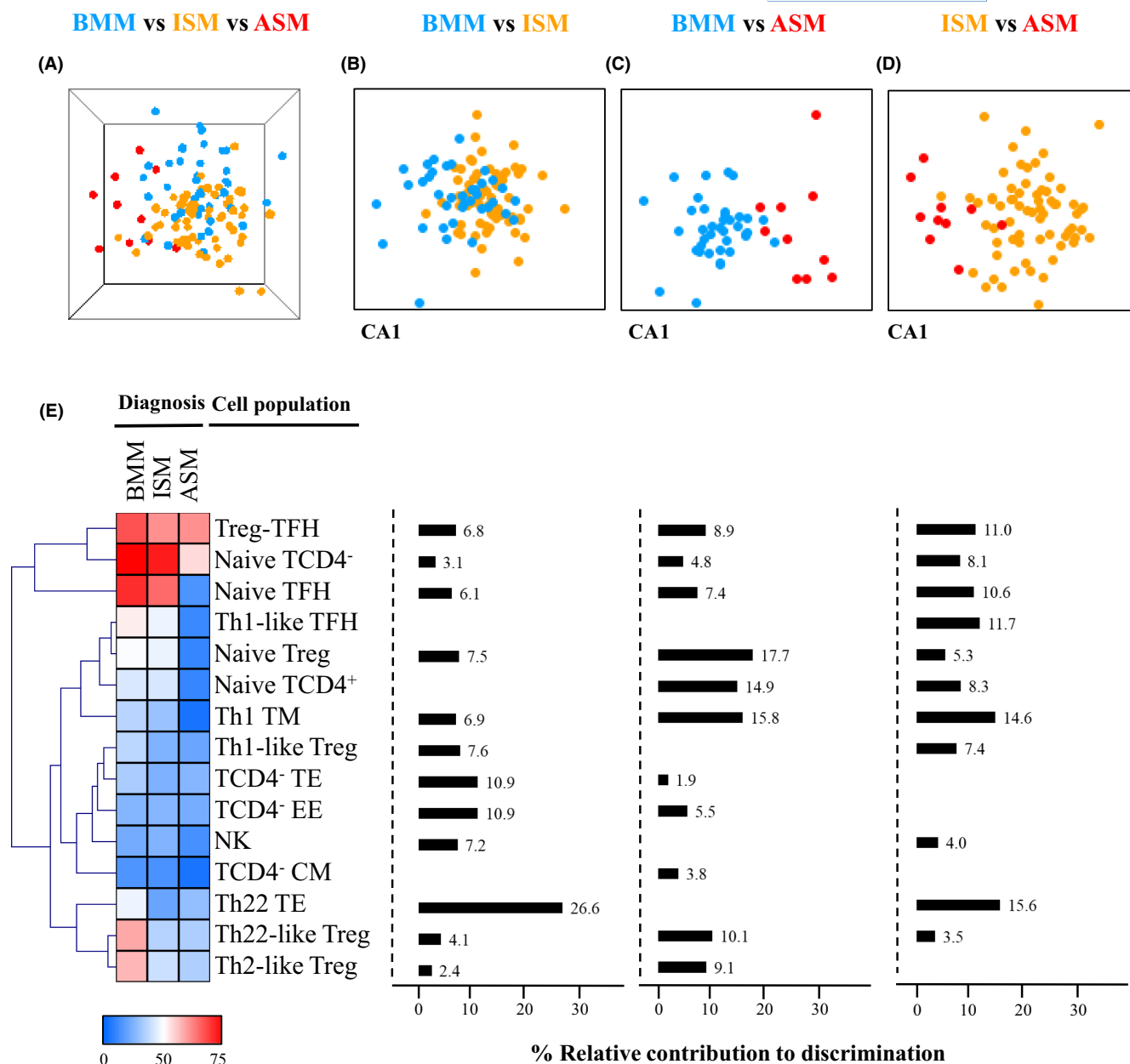
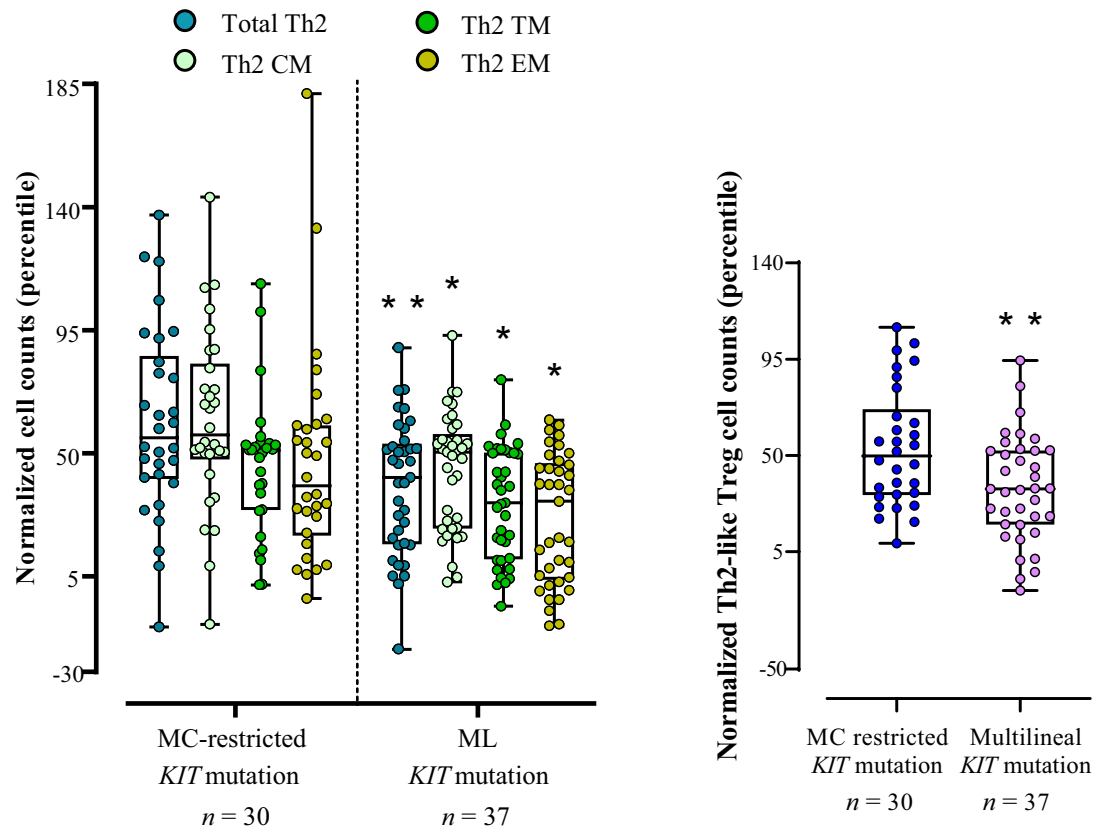


FIGURE 3 Overall T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis (SM) patients ($n = 115$) with distinct diagnostic subtypes of the disease based on multivariate canonical analyses (CA). Three-dimensional and two-dimensional plot representations of (multivariate) canonical analyses of BMM versus ISM versus ASM are shown in panels (A–D). In panel (E) those immune cell subsets that most contributed to discriminate among the different diagnostic subtypes of SM and their relative contribution are displayed. Data on CA plots are based on multivariate CA analyses of 16 different cell populations that showed statistically significant differences between the groups in the univariate analysis. In panels (A–D) ASM is depicted in red; BMM is shown in blue, and ISM is displayed in orange. Each individual circle represents a single case based on its blood immune profile (expressed as age normalized against the 5th–95th percentile values found among age-matched healthy donors). The heatmap shows color-coded percentile values normalized against age-matched HD. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; CA, canonical multivariate analysis; CM, central memory; EE, early effector; ISM, indolent systemic mastocytosis; TE, terminal effector; TFH cells, T-follicular helper cells; TM, transitional memory; Tregs, T-regulatory cells.

KIT^{D816V} mutational profile (Figure 5), and its potential association between the blood immune T-cell profiles investigated using CA. Multivariate CA revealed a strong association between the immune T-cell profile in blood (as a potential modulator of MCA) and several clinical manifestations of the disease in both BMM and ISM with MC-restricted *KIT*^{D816V} patients. Among BMM cases, the distribution of

Th2-like TFH cells and naive TCD4⁺ cells, together with the Th1 TM and the Th1/Th1-like TFH cells subsets or the Th2 CM and the Treg-TFH cell, allowed identification of cases who presented with vs without prior history of anaphylaxis and HVA, respectively (Figure 5A,B). As might be expected, IgE levels in plasma were significantly increased in SM patients who had anaphylaxis (87.4 ± 140.4 KU/l) and

(A)

Functional populations of TCD4⁺ cells

(B)

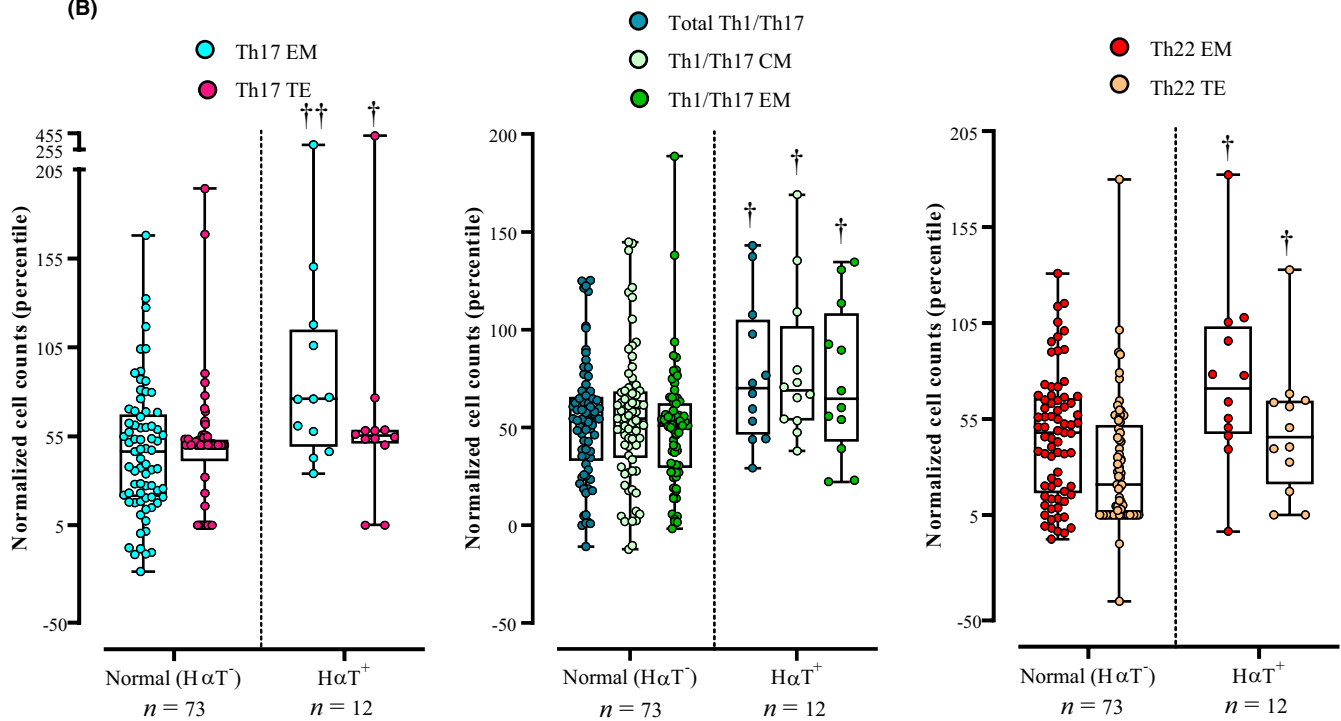
Functional populations of TCD4⁺ T cells

FIGURE 4 Distribution of different populations of TCD4⁺ cells in blood of systemic mastocytosis (SM) patients classified according to the presence of MC-restricted ($n=30$) versus multilineal ($n=37$) *KIT* mutation (A) and the presence versus absence of a hereditary alpha-tryptasemia (HαT⁺) genotype (B). Notched boxes correspond to normalized box plots based on 5th–95th percentile values observed among age-matched healthy donors (HD) which extend from the 25th to the 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analysed. *p*-values: * $<.05$, ** $<.010$ versus MC-restricted *KIT* mutation; † $<.05$, †† $<.010$ versus Non-HαT. CM, central memory; HαT, hereditary alpha-tryptasemia; TM, transitional memory; EM, effector memory; MC, mast cell; TE, terminal effector.

HVA (113.8 ± 150.6 KU/l) versus SM patients without symptoms (47.4 ± 128.6 KU/l, $p=.009$ and 56.3 ± 129.3 KU/l, $p<.001$, respectively). The overall distribution of Tregs and TFH cells in blood, and particularly of the naive TFH cell subset, were all strongly associated with the presence of bone disease among BMM cases. In addition, differences in other TFH and Treg populations, such as Treg-TFH (for osteopenia), Th1-like TFH and naive Tregs (for osteoporosis) and Th17-like Tregs (for osteopenia and osteoporosis), also contributed to a more in-depth discrimination among cases who had osteopenia and/or osteoporosis (Figure 5C). In turn, the naive TCD4⁺ cell count was the single variable which most contributed to identify patients with bone lesions (Figure 5C). Likewise, specific subsets of TFH and Tregs, together with total Th1, total Th2, naive TCD4⁺ and cytotoxic TCD4⁺ cells, were those T-cell populations which contributed the most to discriminate, among BMM, between cases with and without MC-release associated symptoms such as pruritus (Th1 TM, naive Treg, Th2-like Treg and naive TCD4⁺ cells), flushing (naive TCD4⁺, Th1 TM, naive Tregs and naive TFH) and GI symptoms (Th1 TM, TCD4⁺ TM, Th17-like TFH and Th2 CM) (Figure 5D).

Among ISM cases who had MC-restricted *KIT*^{D816V}, clearcut discrimination between patients presenting with or without anaphylaxis, HVA, bone disease and specific MC-release-associated symptoms was also attained based on their uniquely different immune T-cell profiles in blood. However, among ISM patients the TFH cell subsets weighted less than in BMM cases, except for the Treg-TFH cells which contributed to the unique immune profile of ISM patients who had HVA, osteopenia and osteoporosis. In turn, the Th1, and particularly the Th2 cell subsets, together with naive TCD4⁺ and Treg cells, were those cell populations that emerged as most relevant to identify ISM patients who had anaphylaxis (Th2 EM and CM, plus Th1 CM and TM cells), HVA (Th1 TM plus Th1/Th17 CM and Th17-like Tregs), osteopenia (naive Tregs, Th1 TE and CM), osteoporosis (Th2-like Tregs, Th1 TE and Th17-like Tregs), bone sclerosis (Th1 TE and CM, TCD4⁺ TE and naive TCD4⁺) and MC-release associated symptoms such as pruritus (Th1 CM, Th1 TM and Th2 CM in addition to naive TCD4⁺ cells), flushing (Th1 CM and TM, plus naive TCD4⁺ and Th2-like Tregs) and GI symptoms (Th2 CM, Th2 TE and Th1 TM in addition to Th2-like Tregs) (Figure 5A–D). Interestingly, increased levels of IL-17A alone ($p=.050$), or of IL-17A ($p=.031$) plus IL-17F ($p=.032$) and IL-2 ($p=.042$) (Figure S3A), together with increased plasma levels of IL-5 alone ($p=.044$) (Figure S3B) were also observed in patients who presented HVA, osteoporosis and bone sclerosis, respectively (Figures S3C and S4).

Of note, both in BMM patients and in ISM cases with MC-restricted *KIT*^{D816V}, Th2-like TFH and Th2 CM cells, together with

naive TFH and TCD4⁺ CM cells (in BMM cases only), and both Th17-like Tregs and Th22 TE cells (in both BMM and ISM patients) were those subsets contributing the most to discriminate between cases with vs without prior *H. Pylori* infection. In turn, TFH cells and their Th1/Th17-like and Th2-like subsets, Th1 TE cells and NK cells among BMM cases, or Th22 TE, Th1 TE, TCD4⁺ CM and Th2-like Tregs in patients with MC-restricted *KIT*^{D816V} were those subsets which most contributed to identify cases who had suffered from other (more severe) bacterial/viral infections (Figure 5E).

4 | DISCUSSION

KIT-mutated MC from SM patients are constitutively activated³³ with potential downstream effects on other (i.e., surrounding and distant) innate and adaptive immune cells.^{14–20} Thus, recent studies from our and other groups have reported an altered distribution of monocyte and DC populations in blood of SM patients, in association with an increased spontaneous ex vivo production and secretion of inflammatory cytokines, which support a broader activation of the innate immune response in mastocytosis, responsible for the increased serum levels of proinflammatory cytokines also found in these patients.^{21,22,24} In addition to these inflammatory cytokines, MC mediators such as histamine and tryptase are also elevated in SM and have been demonstrated in experimental models to alter the lymphocyte function.^{19,34,35} In this regard, Kulinski et al.,²² found significantly lower frequencies and absolute counts of circulating NK cells and TCD8⁺ cells, with an increased TCD4⁺/TCD8⁺ cell ratio, in a small cohort of 20 ISM patients among whom the altered TCD8 and NK-cell profiles were associated with specific clinical features such as osteoporosis and autoimmune diseases. Whether these alterations already emerge at the earlier stages of the disease and remain in AdvSM (e.g., ASM) patients, and/or whether they are related to a more profound, and eventually different, functional alteration of Th, TFH and Treg cells in non-advanced vs AdvSM still remains to be elucidated.

Here, we investigated in depth for the first time, the blood immune TCD4⁺ cell profile of a large series of SM patients, in parallel to the major B-, T-cytotoxic and NK-cell populations. Our major goal was to gain insight into the immune cell profile of patients with distinct diagnostic subtypes of SM, and its potential (modulatory) effect on the clinical manifestations of non-advanced and AdvSM, for a better understanding of the (potential) role of pivotal adaptive immune cells in the pathophysiology and clinical behaviour of the disease.

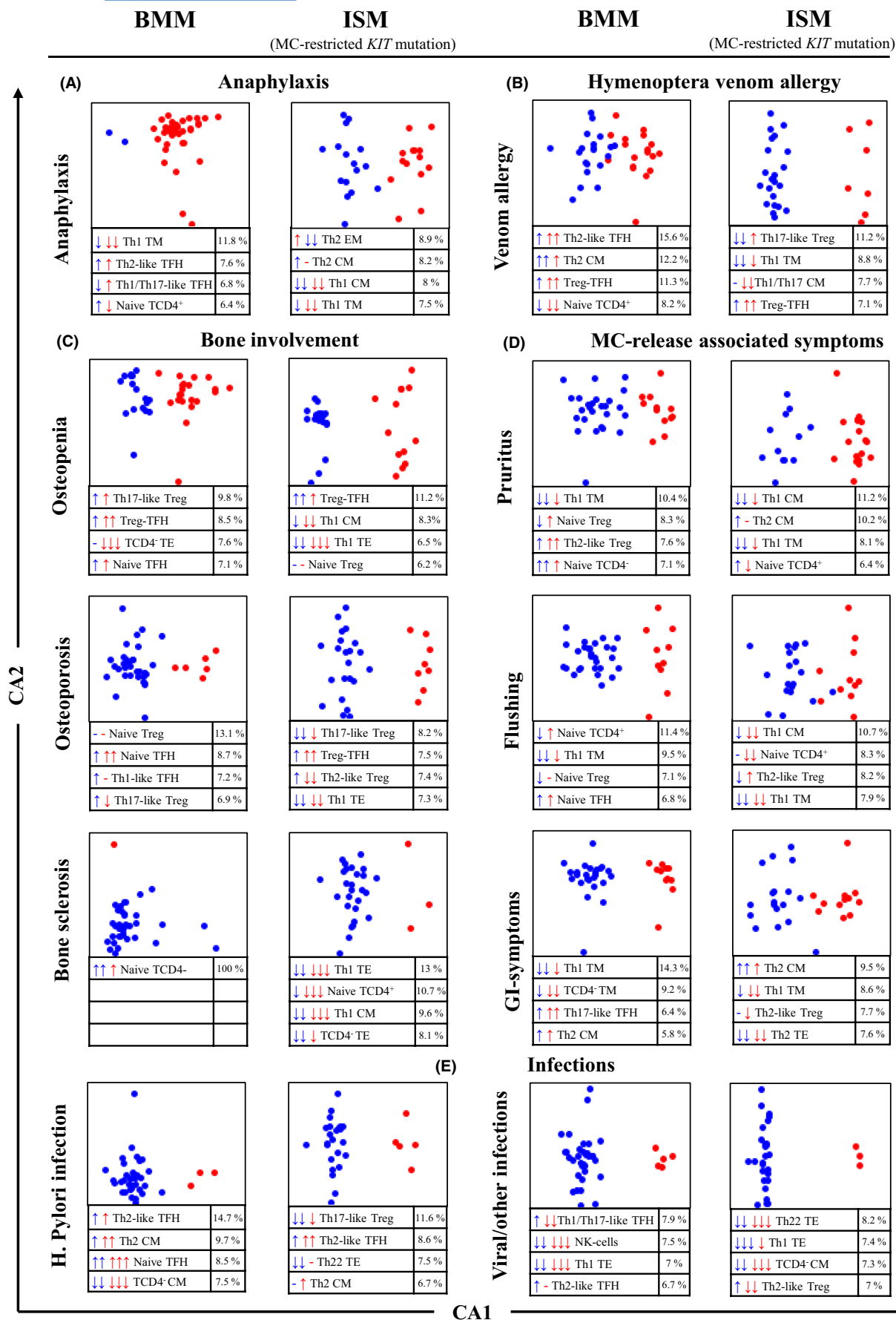


FIGURE 5 Canonical multivariate analyses (CA) of T-cell subsets in blood of systemic mastocytosis (SM) patients ($n=68$) and their distribution according to different clinical features of the disease. Panel (A) anaphylaxis; panel (B) Hymenoptera venom allergy; panel (C) bone involvement including osteopenia, osteoporosis and bone sclerosis; panel (D) mast cell release symptoms including pruritus, flushing and gastrointestinal symptoms and panel (E) prior history of *Helicobacter Pylori* infection and other bacterial/viral infections. Patients were grouped per diagnostic category of the disease into bone marrow mastocytosis (BMM; $n=38$) and indolent systemic mastocytosis (ISM) with MC-restricted *KIT* mutation ($n=30$). Results are shown as CA plots of 27 parameters that were statistically differently distributed ($p < .05$) in the univariate analysis and classified according to presence or absence of each disease feature. Red circles indicate the presence of individual disease features whereas blue circles indicate their absence. The CA1 axis (horizontal axis) highlights differences between the groups, while CA2 axis (vertical axis) displays intragroup heterogeneity. Each individual circle represents a single case expressed based on the distribution of all cell populations analysed in blood normalized against age-matched 5th–95th percentile values found among healthy donors. Color-coded arrows represent higher or lower values versus HD. The four most informative markers contributing to the best discrimination between individuals who showed the presence versus absence of each clinical specific disease feature are indicated below each plot. BMM, bone marrow mastocytosis; CA canonical multivariate analysis; CM, central memory; EE, early effector; EM, effector memory; ISM, indolent systemic mastocytosis; TE, terminal effector; TFH cells, T-follicular helper cells; TM, transitional memory; Tregs, T-regulatory cells.

Overall, our results confirm and extend on previous data²² about the existence of significantly decreased counts of both TCD4⁺ cytotoxic and NK cells in blood of SM patients compared to age-matched HD. Of note, the lower T-cytotoxic cell counts found in blood, affected all different memory and effector cell compartments (i.e., CM, TM, EE and TE cells) from BMM, ISM and ASM patients. Interestingly, such decrease in NK- and cytotoxic T-cell counts does not appear to be due to a lower BM or thymic output, because a parallel increased production and release of TCD4⁺ naive cells to blood associated with greater NK-cell numbers in the BM were observed. Altogether, these data suggest an increased migration of NK cells and of both memory and effector cytotoxic T cells from blood to other tissues, related to the broad innate immune cell activation previously described in SM patients.²¹

Likewise, detailed analysis of blood TCD4⁺ cells from SM patients revealed significantly decreased counts of multiple functional cell subsets, particularly of Th1 cells (and their CM, TM and TE cell compartments), in addition to Th2 EM, Th22 TE and Th1-like Treg cells. These findings contrasted with the counts of TFH cells which were elevated over normal values in blood of SM patients, at the expense of their naive, Th17-like TFH and Treg-TFH subsets. MC-released products, such as TNF α and histamine, are well-known to influence T-cell function, with the ability to modulate T-cell recruitment, activation and functionality.^{36–40} Activated MC can also secrete multiple chemokines, such as CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) and CCL5 (RANTES),^{41,42} that might enhance T-cell recruitment to sites of inflammation including the skin and the GI tract,^{43,44} and thereby, contribute to explain, at least in part, our findings.

Altogether, our data point out a skewed immune TCD4⁺ cell profile in blood of SM patients towards a proinflammatory pattern, associated with both an enhanced migration of Th1 and Th2 cells from blood to peripheral tissues and an increased recirculation of TFH cells from (e.g., lymphoid) tissues to blood. However, a more detailed analysis of these (and of other) TCD4⁺ cell subsets revealed unique profiles in BMM, ISM and particularly, in ASM patients. Thus, ASM patients displayed a unique immune profile defined by decreased counts in blood of virtually all functional subsets of memory and effector T cells. In contrast, a significant

overlap existed between the immune TCD4⁺ cell profiles of BMM and ISM cases, associated with significantly decreased counts of Th22 TE and other multiple Th2 and Th2-like cell populations in ISM vs BMM, such decrease being particularly significant among ISM with multilineage *KIT*^{D816V}. Interestingly, both groups also showed markedly elevated naive and Treg TFH cell counts in blood (vs both HD and ASM patients), similarly to what has been previously described in, for example, allergic asthma and solid tumours, where the increased frequency of circulating TFH cells has been associated with the total IgE serum levels⁴⁵ and a better patient outcome,^{46,47} respectively. Altogether, these uniquely different profiles suggest that despite progression of BMM to ISM and of ISM to ASM has been demonstrated,^{48,49} in a small fraction of patients, BMM, ISM and ASM might represent three different entities with a unique clinical behaviour and underlying immune profiles.

At present, it is well established that, despite there is a close association in SM between the presence of the *KIT* mutation and an activated MC phenotype, the *KIT*^{D816V} mutation on its own (as well as the overall MC tumour burden) does not explain the great heterogeneity of MCA-associated symptoms and other clinical manifestations of SM, as well as the different response profile observed as regard the control of MCA-associated symptoms in non-advanced versus AdvSM, following treatment with *KIT* inhibitors such as midostaurin and/or avapritinib.^{50,51} In order to gain further insight into the potential role of T cells and particularly, of the various functional subsets of TCD4⁺ cells, in modulating the MCA-associated clinical profiles of SM patients, we used multivariate CA to investigate the potential association between the distribution of different subsets of T cells in blood and several (relevant) MCA-associated clinical features of SM. Interestingly, increased blood counts of Th2 cells and their TM, EM and CM subsets emerged as critically relevant variables among ISM patients with MC-restricted *KIT*^{D816V} who presented with (vs. without) anaphylaxis. At the same time, these cell populations, together with Th2-like Treg cells, also contributed, to distinguish ISM cases with MC-restricted *KIT*^{D816V} from ISM patients with multilineage *KIT* mutation.⁵² Among BMM, elevated blood counts of Th2 CM further contributed to identify patients who had HVA. In line with these observations, dysregulation of the Th2 immune

response has been previously reported as a potential causal mechanism for anaphylaxis^{53,54} and MCA-episodes where massive release of Th2 cytokines is observed.⁵⁵ These findings, together with the greater IgE plasma levels observed here among patients who had HVA as well as anaphylaxis, would further support the existence of an underlying dysregulated Th2 immune response in these two groups of patients. Interestingly, our results also revealed an association between increased Th2 CM TCD4⁺ cell counts in BMM and ISM patients with MC-restricted *KIT*^{D816V} and a history of prior *H. Pylori* infection, in line with recent data which points out a skewed Th2 and Treg cell response associated with *H. pylori* bacteria persistence.⁵⁶ In turn, an association between higher Th1 TE and either decreased NK cells (among BMM cases), or lower Th22 TE cells (in ISM patients with MC-restricted *KIT*^{D816V}), was closely related to a past history of other bacterial/viral infections, in the absence of differences in total IgG, IgA, IgM and IgE levels in plasma (Figure S3). Altogether, these data point out the existence of different T-cell immune profiles in patients with prior *H. pylori* versus other bacterial/viral infections, pointing out the potential role of an increased, for example, mucosal permeability associated with chronic MC activation, in shaping the T-cell immune profile of both BMM and ISM patients. As mentioned above, the number of Th22 TE cells circulating in blood of SM patients also emerged as one of the most relevant TCD4⁺ cell populations in discriminating between BMM and both ISM and ASM, as well as between ISM and ASM patients. Despite Th22 cells are a subset of TCD4⁺ cells more recently identified, a large number of studies exist which demonstrate that Th22 cells play a critical role in the skin barrier and the pathogenesis of skin disease, via secretion of IL-22.^{57–59} Overall, our data showed a significant decrease in Th22 TE (and Th22-like Treg) cells in blood, associated with a tendency towards lower IL-22 levels in plasma of ISM cases who typically had skin involvement, while BMM cases (who systematically show no skin lesions) had normal Th22 counts and IL-22 plasma levels. Altogether, these results suggest that in ISM, but not in BMM, an increased recruitment of blood Th22 TE cells to tissues such as the skin, where activated clonal MC accumulate, might exist. Interestingly, a clear association between higher Th22 EM and Th22 TE cell counts and a HαT⁺ genotype was observed among our patients, suggesting that HαT could further act as a predisposing factor for Th22-associated skin involvement at least in a fraction of ISM patients. In this regard, HαT has been recently associated with skin involvement resulting in chronic or episodic urticaria, flushing and pruritus, at the same time it has been related to symptoms of other (underlying) inflammatory skin disorders, such as atopic dermatitis and psoriasis.⁶⁰ In addition, HαT⁺ SM patients also showed significantly increased Th17 (and their EM and TE subsets) and Th1/Th17 cells (and their CM and EM subsets), compared to HαT[−] SM patients.

Recent data suggest that an imbalance between Th17 and Treg cells might play a critical role in the pathogenesis of inflammatory bone disease.⁶¹ In line with these findings, our results revealed a decrease in Treg cell subsets such as naive, Th2-like and Th17-like Treg cells in blood of SM patients, such decreased numbers being significantly more pronounced among ASM cases. In addition,

increased IL-17A, IL-17F and IL-2 plasma levels were associated with the presence of osteoporosis among SM cases. At present, it is well-established that Th17 cells produce proinflammatory cytokines such as IL-17A, IL-17F, which act as potent inducers of osteoclastogenesis, a key pathogenic mechanism in osteoporosis.⁶¹ In turn, Tregs act as anti-inflammatory cells capable of maintaining tolerance to self-components through their inhibitory effect on other effector T cells.^{61–63} Thereby, decreased total Treg and/or Th17-like Treg cell counts, in parallel with the increased IL-17 plasma levels observed in our patients, might reflect the role of these cells in the development of osteoporosis. In this regard, sBT, IFN- γ , IL-1 β and IL-6 have been previously reported to play a potential role in the development of bone disease in SM patients, who have also been shown to display a distinct proinflammatory/osteoclastogenic and immunosuppressive cytokine profile in plasma/serum with low IFN- γ levels,⁶⁴ potentially due to the altered T- and NK-immune profiles here reported.

In summary, here we confirm and extend on previous observations about the existence of a profound dysregulation of TCD4⁺ and TCD4[−] cell subsets plus NK cells in SM, leading to uniquely altered immune cell profiles in blood of patients with distinct diagnostic subtypes of the disease. In addition, we also show for the first time, a close association between those T/NK-cell immune profiles and several MCA-associated clinical manifestations of the disease, particularly among BMM and ISM patients with MC-restricted *KIT*^{D816V}. Further investigations are needed to better understand the precise underlying pathophysiological mechanisms involved.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

APP performed experiments, analysed the data, interpreted the results, made the figures and wrote the paper; MJ-A performed experiments and analysed/interpreted the results; AH, IA-T and LS-M recruited and monitored the patients, recorded and retrieved clinical data and collected the samples; CC, JP, SM, TCS, PNN and OGL performed the experiments; ACG-M and VB critically reviewed the paper; QL, RF, CEP and CT provided support with statistical analysis of results and graphical representation of data; AM and AO designed the research, supervised the study and wrote the paper. All authors reviewed the paper and approved its final version.

ACKNOWLEDGEMENTS

We also thank the Biobank at the Hospital Virgen de la Salud (BioB-HVS) No. B.0000520, Toledo, Spain.

FUNDING INFORMATION

This study has been supported by the following grants: grant number PI19/01166 and PI22/01657 from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; Madrid, Spain); grant number CB16/12/00400 and from the Biomedical Research Networking Center Consortium [CIBERONC] programme (ISCIII, Madrid, Spain); co-funded by the 'European Union' (EQC2019-005419-P), within the Subprograma Estatal de Infraestructuras de Investigación y Equipamiento Científico Técnico de 2019 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. APP was supported by a grant from the Government of Castilla y

León (Orden EDU/556/2019; Valladolid, Spain) co-funded by the 'European Regional Development Fund' (FEDER BDNS, Identif.: 422058). CT is the recipient of an USAL4EXCELLENCE fellowship, co-funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No. 101034371 and the Junta de Castilla y León. PNN was supported by a grant from the Government of Castilla y León (Orden EDU/875/2021; Valladolid, Spain) co-funded by the European Social Fund (FEDER BDNS, Identif.: 540787). OGL was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PFIS: FI20/00116-AES 2017–2020, BOE 28/03/2019-Orden CNU/354/2019) co-funded by The European Union (FSE+). AM was supported by the Biomedical Research Networking Center Consortium on cancer (CIBERONC) (contract number PRF-2869).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Alba Pérez-Pons  <https://orcid.org/0000-0002-5805-1391>

Paula Navarro-Navarro  <https://orcid.org/0000-0002-3013-5497>

Oscar González-López  <https://orcid.org/0000-0002-4169-4294>

Andrea Mayado  <https://orcid.org/0000-0003-1498-7398>

Alberto Orfao  <https://orcid.org/0000-0002-0007-7230>

REFERENCES

- Horny HP, Sotlar K, Valent P, Hartmann K. Mastocytosis: a disease of the hematopoietic stem cell. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(40):686–692. doi:10.3238/arztebl.2008.0686
- Valent P, Akin C, Sperr WR, et al. New insights into the pathogenesis of Mastocytosis: emerging concepts in diagnosis and therapy. *Annu Rev Pathol*. 2023;18:361–386. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-031521-042618
- Zanotti R, Tanasi I, Crosera L, et al. Systemic Mastocytosis: multidisciplinary approach. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2021;13(1):e2021068. doi:10.4084/MJHID.2021.068
- Khoury JD, Solary E, Abla O, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of Haematolymphoid Tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703–1719. doi:10.1038/s41375-022-01613-1
- Valent P, Akin C, Hartmann K, et al. Updated diagnostic criteria and classification of mast cell disorders: a consensus proposal. *HemaSphere*. 2021;5(11):e646. doi:10.1097/HS9.0000000000000646
- Valent P, Horny HP, Escribano L, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001;25(7):603–625. doi:10.1016/s0145-2126(01)00038-8
- Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev*. 2009;228(1):149–169. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00742.x
- García-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. doi:10.1182/blood-2006-04-015545
- 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. doi:10.2165/11588890-000000000-00000
- Tefferi A, Pardanani A. Systemic mastocytosis: current concepts and treatment advances. *Curr Hematol Rep*. 2004;3(3):197–202.
- 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. doi:10.2174/187152806775269303
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99–118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2853–2868. doi:10.1371/journal.pbio.0060301
- da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):698–738. doi:10.1369/0022155414545334
- Elieh Ali Komi D, Grauwet K. Role of mast cells in regulation of T cell responses in experimental and clinical settings. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;54(3):432–445. doi:10.1007/s12016-017-8646-z
- Cardamone C, Parente R, Feo GD, Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol Lett*. 2016;178:10–14. doi:10.1016/j.imlet.2016.07.003
- Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol*. 2015;6:394. doi:10.3389/fimmu.2015.00394
- Woźniak E, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Psychological stress, mast cells, and psoriasis—is there any relationship? *Int J Mol Sci*. 2021;22(24):13252. doi:10.3390/ijms222413252
- Valitutti S, Espinosa E. Cognitive interactions between mast cells and helper T lymphocytes. *Self Nonself*. 2010;1(2):114–122. doi:10.4161/self.1.2.11795
- Noto CN, Hoft SG, DiPaolo RJ. Mast cells as important regulators in autoimmunity and cancer development. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:752350. doi:10.3389/fcell.2021.752350
- Pérez-Pons A, Jara-Acevedo M, Henriques A, et al. Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients. *Clin Transl Allergy*. 2022;12(6):e12167. doi:10.1002/ctt2.12167
- Kulinski JM, Eisch R, Young ML, et al. Skewed lymphocyte subpopulations and associated phenotypes in patients with Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(1):292–301.e2. doi:10.1016/j.jaip.2019.07.004
- van der Ploeg EK, Hermans MAW, van der Velden VHJ, Dik WA, van Daele PLA, Stadhouder R. Increased group 2 innate lymphoid cells in peripheral blood of adults with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:1490–1496.e2. doi:10.1016/j.jaci.2020.09.037
- Hermans MAW, Heeringa JJ, Swagemakers SGA, et al. Altered leukocyte subsets and immune proteome indicate proinflammatory mechanisms in mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2022;150(1):146–156.e10. doi:10.1016/j.jaci.2021.12.786
- Botafogo V, Pérez-Andrés M, Jara-Acevedo M, et al. Age distribution of multiple functionally relevant subsets of CD4+ T cells in human blood using a standardized and validated 14-color EuroFlow immune monitoring tube. *Front Immunol*. 2020;11:166. doi:10.3389/fimmu.2020.00166
- Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sánchez-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. doi:10.1038/modpathol.2015.72

27. 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. doi:[10.1016/S0002-9440\(10\)63870-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63870-9)
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45. doi:[10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45)
29. Lyons JJ, Yu X, Hughes JD, et al. Elevated basal serum tryptase identifies a multisystem disorder associated with increased TPSAB1 copy number. *Nat Genet.* 2016;48(12):1564-1569. doi:[10.1038/ng.3696](https://doi.org/10.1038/ng.3696)
30. Hernández-Hernández L, Sanz C, Marcos-Vadillo E, et al. Increased TPSAB1 copy number in a family with elevated basal serum levels of tryptase. *Front Med.* 2021;8:577081. doi:[10.3389/fmed.2021.577081](https://doi.org/10.3389/fmed.2021.577081)
31. Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, et al. Age- and Sex-Matched Normal Leukocyte Subset ranges in the general population defined with the euroflow lymphocyte screening tube (LST) for monoclonal b-cell lymphocytosis (MBL) vs. non-mbl subjects. *Cancer.* 2022;15(1):58. doi:[10.3390/cancers15010058](https://doi.org/10.3390/cancers15010058)
32. Saeed AI, Sharov V, White J, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 2003;34(2):374-378. doi:[10.2144/03342mt01](https://doi.org/10.2144/03342mt01)
33. El Hussein S, Chifotides HT, Khoury JD, Verstovsek S, Thakral B. Systemic Mastocytosis and other entities involving mast cells: a practical review and update. *Cancer.* 2022;14(14):3474. doi:[10.3390/cancers14143474](https://doi.org/10.3390/cancers14143474)
34. Mekori YA, Hershko AY, Frossi B, Mion F, Pucillo CE. Integrating innate and adaptive immune cells: mast cells as crossroads between regulatory and effector B and T cells. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:84-89. doi:[10.1016/j.ejphar.2015.03.087](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.087)
35. Gri G, Frossi B, D'Inca F, et al. Mast cell: an emerging partner in immune interaction. *Front Immunol.* 2012;3:120. doi:[10.3389/fimmu.2012.00120](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00120)
36. Nakae S, Suto H, Iikura M, et al. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol.* 2006;176(4):2238-2248. doi:[10.4049/jimmunol.176.4.2238](https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.4.2238)
37. Tartaglia LA, Goeddel DV, Reynolds C, et al. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Immunol.* 1993;151(9):4637-4641.
38. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1717-1725. doi:[10.1056/NEJM199606273342607](https://doi.org/10.1056/NEJM199606273342607)
39. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65. doi:[10.1038/sj.cdd.4401189](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189)
40. McLachlan JB, Hart JP, Pizzo SV, et al. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1199-1205. doi:[10.1038/ni1005](https://doi.org/10.1038/ni1005)
41. Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, et al. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcεpsilon receptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood.* 2002;100(12):3861-3868. doi:[10.1182/blood-2002-02-0602](https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0602)
42. Sayama K, Diehn M, Matsuda K, et al. Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(εpsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol.* 2002;3:5. doi:[10.1186/1471-2172-3-5](https://doi.org/10.1186/1471-2172-3-5)
43. Lavender N, Yang J, Chen SC, et al. The Yin/Yang of CCL2: a minor role in neutrophil anti-tumor activity in vitro but a major role on the outgrowth of metastatic breast cancer lesions in the lung in vivo. *BMC Cancer.* 2017;17(1):88. doi:[10.1186/s12885-017-3074-2](https://doi.org/10.1186/s12885-017-3074-2)
44. Li H, Wu M, Zhao X. Role of chemokine systems in cancer and inflammatory diseases. *MedComm.* 2022;3(2):e147. doi:[10.1002/mco2.147](https://doi.org/10.1002/mco2.147)
45. Ji T, Li H. T-helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma. *Front Immunol.* 2023;14:1149203. doi:[10.3389/fimmu.2023.1149203](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1149203)
46. Gutiérrez-Melo N, Baumjohann D. T follicular helper cells in cancer. *Trends Cancer.* 2023;9(4):309-325. doi:[10.1016/j.trecan.2022.12.007](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.12.007)
47. Yoshitomi H, Ueno H. Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):523-527. doi:[10.1038/s41423-020-00529-z](https://doi.org/10.1038/s41423-020-00529-z)
48. 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. doi:[10.1016/j.jaci.2009.05.003](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.003)
49. Muñoz-González JI, Álvarez-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. doi:[10.1182/blood.2018886507](https://doi.org/10.1182/blood.2018886507)
50. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, et al. Efficacy and safety of Midostaurin in advanced systemic Mastocytosis. *N Engl J Med.* 2016;374(26):2530-2541. doi:[10.1056/NEJMoa1513098](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513098)
51. Hartmann K, Gotlib J, Akin C, et al. Midostaurin improves quality of life and mediator-related symptoms in advanced systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(2):356-366.e4. doi:[10.1016/j.jaci.2020.03.044](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.03.044)
52. Alvarez-Twose I, Zanotti R, González-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. doi:[10.1016/j.jaci.2013.06.020](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.020)
53. Gurram RK, Zhu J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(3):225-235. doi:[10.1038/s41423-019-0210-8](https://doi.org/10.1038/s41423-019-0210-8)
54. Kubo M. T follicular helper and TH2 cells in allergic responses. *Allergol Int.* 2017;66(3):377-381. doi:[10.1016/j.alit.2017.04.006](https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.04.006)
55. Boehm T, Ristl R, Mühlbacher J, Valent P, Wahrmann M, Jilka B. Massive release of TH2 cytokines induced a cytokine storm during a severe mast cell activation event in a patient with indolent systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;150(2):406-414.e16. doi:[10.1016/j.jaci.2022.04.023](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.04.023)
56. Jafarzadeh A, Larussa T, Nemati M, Jalapour S. T cell subsets play an important role in the determination of the clinical outcome of helicobacter pylori infection. *Microb Pathog.* 2018;116:227-236. doi:[10.1016/j.micpath.2018.01.040](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.040)
57. Pan Y, Du D, Wang L, Wang X, He G, Jiang X. The role of T helper 22 cells in dermatological disorders. *Front Immunol.* 2022;13:911546. doi:[10.3389/fimmu.2022.911546](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.911546)
58. Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem.* 2011;353(1-2):41-46. doi:[10.1007/s11010-011-0772-y](https://doi.org/10.1007/s11010-011-0772-y)
59. Tamasauskienė L, Sitkauskienė B. Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: pro-inflammatory or anti-inflammatory effect? *Pediatr Neonatol.* 2018;59(4):339-344. doi:[10.1016/j.pedneo.2017.11.020](https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.11.020)
60. Kranyak A, Shuler M, Lee LW. Cutaneous manifestations in hereditary alpha Tryptasemia. *Cutis.* 2023;111(1):49-52. doi:[10.12788/cutis.0682](https://doi.org/10.12788/cutis.0682)
61. Wang M, Tian T, Yu S, He N, Ma D. Th17 and Treg cells in bone related diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:203705. doi:[10.1155/2013/203705](https://doi.org/10.1155/2013/203705)
62. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007;8(4):345-350. doi:[10.1038/ni0407-345](https://doi.org/10.1038/ni0407-345)
63. Cheru N, Hafler DA, Sumida TS. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1154575. doi:[10.3389/fimmu.2023.1154575](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154575)

64. Rama TA, Henriques AF, Matito A, et al. Bone and cytokine markers associated with bone disease in systemic Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023;11(5):1536-1547. doi:[10.1016/j.jaip.2023.02.007](https://doi.org/10.1016/j.jaip.2023.02.007)

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Pérez-Pons A, Teodosio C, Jara-Acevedo M, et al. T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: Association with disease features. *Allergy*. 2024;00:1-17. doi:[10.1111/all.16043](https://doi.org/10.1111/all.16043)

Artículo 3:

“Altered B-cell, plasma cell and antibody immune profiles in blood of systemic mastocytosis”.

Alba Pérez-Pons^{1,2,3}, Ana Henriques^{3,4}, Teresa Contreras-Sanfeliciano⁵, María Jara-Acevedo^{1,2,3,6}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,6}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3}, Iván Álvarez-Twose^{2,3,4}, Quentin Lecrevisse^{1,2}, Rafael Fluxa⁷, Laura Sánchez-Muñoz^{3,4}, Carolina Caldas^{1,2,3}, Julio Pozo^{1,2}, Óscar González-López^{1,3}, Martín Pérez-Andrés^{1,2}, Andrea Mayado^{*1,2,3}, Alberto Orfao^{*1,2,3}

¹Centro de Investigación del Cáncer (IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC); Departamento de Medicina y Servicio de Citometría (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, España.

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

³Red Española de MAstocitosis (REMA), Toledo y Salamanca, España.

⁴Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Hospital Virgen del Valle, Toledo, España.

⁵Departamento de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España.

⁶Servicio de Secuenciación (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

⁷Cytognos SL, Salamanca, España.

*AM y AO han contribuido de igual manera en este trabajo y ambos deben ser considerados como último autor del mismo.

*Journal of Allergy and Clinical Immunology **

(manuscrito enviado para publicación y en revisión por la revista)

* La información suplementaria correspondiente a este manuscrito está disponible en el Anexo I incluido al final de la presente memoria de tesis doctoral

Introducción: En la SM, la presencia de mutaciones activantes de *KIT* induce una activación constitutiva de los mastocitos patológicos con una liberación continuada y aumentada de sus mediadores, capaces de ejercer efectos pleiotrópicos sobre otras células del sistema inmunes, tanto a nivel local como sistémico.

Debido a su amplia distribución tisular y su localización perivascular, el mastocito cumple funciones inmunitarias efectoras e inmunomoduladoras únicas. Así, entre otras citoquinas, los mastocitos liberan IL-13 e IL-4 capaces de inducir el cambio de clase de Ig en los linfocitos B, hacia células B de memoria y PC productoras de IgE. Además, el mastocito es capaz de promover la proliferación y la diferenciación de células B hacia PC secretoras de IgE (e IgA) mediante la unión entre CD40L en el mastocito y CD40 en el linfocito B, junto a la liberación de IL-5, IL-6 y TGF β 1. Estas interacciones confieren al mastocito un papel importante en la respuesta alérgica mediada por IgE, así como en la homeostasis de bacterias comensales en el tracto gastrointestinal, donde un aumento de la liberación de mediadores mastocitarios a nivel local induce además, un incremento de la permeabilidad de la mucosa con el consiguiente aumento de la traslocación bacteriana y la activación local de la respuesta inmunitaria.

Estudios previos de nuestro grupo y de otros grupos han descrito la existencia de una respuesta inmunitaria innata alterada en pacientes con SM, asociada a una alteración del número de monocitos, células dendríticas y células ILC2 circulantes en sangre, y un descenso significativo del número de células NK y de linfocitos T citotóxicos (e.g., CD8⁺). Más recientemente, se ha descrito también la existencia de perfiles inmunes de células T CD4⁺ alterados en SM, asociados tanto a los distintos subtipos diagnósticos de SM, como a las manifestaciones clínicas de la enfermedad. No obstante, todo lo anteriormente descrito, hasta la fecha seguimos sin conocer el verdadero papel de la respuesta humoral en la fisiopatología y el comportamiento clínico de la SM.

Objetivo: En este apartado del trabajo doctoral nos propusimos analizar la distribución en sangre periférica de los linfocitos B y las PC, junto a los niveles de los distintos isotipos de Igs (e.g., anticuerpos) en el plasma de pacientes con SM, para profundizar en el conocimiento del papel que pueda jugar la respuesta humoral en el comportamiento clínico y biológico de la SM.

Material y métodos: En conjunto estudiamos un total de 108 pacientes diagnosticados de SM en los centros de referencia de la REMA (Hospital del Valle de Toledo y Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca), y que incluían 35 BMM, 64 ISM y 9 pacientes con ASM. Como grupo control analizamos en paralelo 117 donantes sanos del mismo rango de edad, que no presentaban antecedentes de alergia ni de otros trastornos inmunitarios. Del conjunto de pacientes, analizamos en 108 muestras de sangre, la distribución numérica de los linfocitos B, PC y sus respectivas subpoblaciones, empleando un panel de anticuerpos optimizado para la monitorización inmune de las poblaciones de células B que expresan diferentes isotipos de cadena pesada de las Igs propuesto por el consorcio EuroFlow para citometría de flujo espectral. La distribución de las distintas poblaciones celulares se normalizó por edad respecto al grupo control. En un subgrupo de 17 pacientes y 31 controles estudiamos además muestras de MO, con el objetivo de identificar de forma simultánea las células B y sus diferentes subpoblaciones madurativas identificables mediante el tubo LST descrito por el grupo EuroFlow para citometría de flujo multiparamétrica de alta sensibilidad. La determinación de los niveles de anticuerpos de isotipo IgA, IgG e IgM en plasma se realizó mediante técnica de nefelometría convencional, mientras que para la determinación cuantitativa de los niveles de IgD y de IgE empleamos el kit IgD Optilite (The Binding Site group Ltd) y el ensayo ImmunoCAP de IgE Total (ThermoFisher), respectivamente.

Resultados: En conjunto, los pacientes con SM mostraron cifras globales de células B totales dentro de los rangos de normalidad, tanto en sangre periférica como en MO. Sin embargo, un estudio más detallado de las distintas subpoblaciones reveló la existencia de un aumento significativo en sangre del compartimento de células B pre-centro germinal ($P=0.009$), a expensas de los linfocitos B inmaduros y de los linfocitos B naïve $CD5^+$ ($P<0.001$), incrementándose las cifras absolutas de los linfocitos inmaduros de forma progresiva desde la BMM a la ISM y a la ASM ($p<0.004$). De forma paralela al aumento de linfocitos B inmaduros en sangre, los pacientes con SM mostraban también un incremento en el porcentaje de linfocitos B inmaduros en MO ($P<0.031$), traduciéndose este aumento en un mayor cociente entre el número de linfocitos B inmaduros y el número de células mieloides, respecto a lo observado en MO normal. En cambio, los pacientes con SM mostraban un descenso significativo en las cifras de PC circulantes en sangre que afectaba prácticamente a todos los compartimentos de PC, definidos tanto por la expresión de distintos isotipos y subclases de las Igs expresadas, como de acuerdo a su estadio madurativo ($P<0.001$), afectando este descenso a todos los subtipos diagnósticos de la enfermedad analizados. Mientras tanto, el compartimento de células B de memoria sólo mostró valores disminuidos para las células B $IgMD^+$ ($P=0.037$), junto a cifras significativamente incrementadas de células IgD^+ ($P\leq 0.001$). La única excepción la constituían los pacientes con ASM que presentaban valores disminuidos de células B de memoria circulantes en sangre con isotipos $IgMD^+$, IgG_2^+ , IgA_1^+ e IgA_2^+ ($P<0.038$), siendo este descenso significativo tanto respecto al grupo control, como a los demás subtipos diagnósticos de la enfermedad (e.g., ISM y ASM).

A pesar de que la cantidad total de Igs en plasma se encontraba dentro del rango de la normalidad, un análisis más detallado por isotipos mostró un incremento de IgM, (específicamente entre los pacientes con ISM y ASM) e IgD (a expensas de los pacientes con BMM y ISM) en plasma ($P<0.027$). Además, los pacientes con BMM mostraron un perfil

característico incluyendo niveles anormalmente bajos de IgG ($P=0.008$) junto a niveles significativamente incrementados de IgE en plasma, tanto cuando comparados con el grupo control como con el resto (ISM y ASM) de los pacientes ($P<0.001$). Un análisis multivariante confirmó la existencia de distintos perfiles inmunes B en sangre de pacientes con distintos subtipos diagnóstico de SM (BMM, ISM y ASM) debidos a la existencia de un aumento progresivo de la producción de células B en MO asociado a una mayor liberación de linfocitos B inmaduros a sangre, al descenso progresivamente superior del recuento de células B de memoria IgMD⁺ y de PC circulantes, y los distintos perfiles de anticuerpos de diferente isotipo a nivel plasmático descritos anteriormente para la BMM, la ISM y la ASM.

Merece destacar además la asociación observada entre el aumento del recuento de linfocitos B inmaduros en sangre de pacientes con SM y el comportamiento clínico de la enfermedad reflejado en una mayor frecuencia de osteoporosis, organomegalias (hepatomegalia y linfadenopatías) y antecedentes de infección por *Helicobacter pylori* ($P<0.024$). Por otro lado, el descenso de diferentes subpoblaciones de PC en sangre se relacionó con una mayor prevalencia de síntomas de liberación de mediadores mastocitarios como flushing o prurito, además de una mayor frecuencia de infecciones recurrentes y organomegalias ($P<0.044$). Finalmente, entre los pacientes con SM, la existencia de valores incrementados de IgE en plasma se correlacionó con una mayor frecuencia de anafilaxia y alergia a veneno de insectos, y una menor prevalencia de esclerosis ósea ($P<0.005$).

Conclusiones: Los pacientes con SM muestran perfiles claramente definidos de alteración en sangre de los compartimentos de células B y de PC. Estos perfiles reflejan un aumento de la producción en MO y la liberación a sangre de linfocitos B inmaduros, junto a cifras significativamente descendidas de PC circulantes posiblemente debidos a una mayor migración de linfocitos B naïve (CD5⁻) y producción de anticuerpos en los tejidos

periféricos, responsables de los distintos perfiles plasmáticos de anticuerpos observados en los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad. Esta diversidad de perfiles de alteración de la inmunidad humoral podría estar relacionada con la existencia de distintos patrones de respuesta a una mayor estimulación antigénica inducida por el incremento de la permeabilidad de las mucosas asociada a la activación constitutiva de los mastocitos patológicos y el mayor tráfico de antígenos a nivel local con consecuencias sistémicas.

Altered B-cell, plasma cell and antibody immune profiles in blood of systemic mastocytosis

Alba Pérez-Pons^{1,2,3}, Ana Henriques^{3,4}, Teresa Contreras-Sanfeliciano⁵, María Jara-Acevedo^{1,2,3,6}, Paula Navarro-Navarro^{1,2,3,6}, Andrés C. García-Montero^{1,2,3}, Iván Álvarez-Twose^{2,3,4}, Quentin Leclercq^{1,2}, Rafael Fluxa⁷, Laura Sánchez-Muñoz^{3,4}, Carolina Caldas^{1,2,3}, Julio Pozo^{1,2}, Óscar González-López^{1,3}, Martín Pérez-Andrés^{1,2}, Andrea Mayado^{*1,2,3}, Alberto Orfao^{*1,2,3}

¹Cancer Research Center (IBMCC, USAL-CSIC), Department of Medicine and Cytometry Service (NUCLEUS), University of Salamanca (<https://ror.org/02f40zc51>), Salamanca, Spain; and Biomedical Research Institute of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain;

²Biomedical Research Networking Center Consortium (CIBERONC; CB16/12/00400), Madrid, Spain

³Spanish Network on Mastocytosis (REMA), Toledo and Salamanca, Spain;

⁴Instituto de Estudios de Mastocitosis de Castilla La Mancha (CLMast), Virgen del Valle Hospital, Toledo, Spain, Madrid, Spain;

⁵Department of Biochemistry, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain;

⁶Sequencing Service (NUCLEUS), University of Salamanca (<https://ror.org/02f40zc51>), Salamanca, Spain;

⁷Cytognos SL, Salamanca, Spain.

* AM and AO have equally contributed to this work and should be considered as joint senior authors.

* Correspondence:

Professor Alberto Orfao, MD, PhD.

orfao@usal.es

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ABSTRACT:

Background: Systemic mastocytosis (SM) is a heterogeneous disease characterised by an expansion of *KIT*-mutated constitutively activated mast cells (MC) which release MC mediators that might act on the tumour microenvironment including other immune cells.

Objective: Here we investigated the blood distribution of B-cell, plasma cell (PC) and antibody-isotype compartments in SM.

Methods: we used spectral flow cytometry and the EuroFlow Immunomonitoring panel and Lymphocyte Screening Tube to quantify B-cells, PC and their subsets in blood of 108 SM patients - 35 bone marrow mastocytosis (BMM), 64 indolent SM (ISM), 9 aggressive SM (ASM)- vs 117 age-matched healthy donors (HD) and paired bone marrow (BM) samples of 31 SM vs 17 controls, respectively. In parallel, the immunoglobulin (Ig) plasma levels of IgM, IgD, IgG, IgA and IgE were measured.

Results: Compared to HD, SM patients showed an increased immature B-cell production in BM ($P=0.003$) associated with a greater release of pre-germinal center immature ($P<0.001$) and naive $CD5^+$ B-lymphocytes ($P<0.001$) to blood, but a pronounced decrease in PC counts of all different IgH-isotypes and subclasses ($P\leq 0.001$) together with overall increased IgM ($P=0.001$) and IgD ($P<0.001$) plasma levels. Of note, different immune profiles were found per diagnostic subtype of the disease with progressively greater counts in blood of immature B-lymphocytes together with decreased MD^+ , IgG_2^+ , IgA_1^+ and IgA_2^+ MBC ($P\leq 0.032$) and elevated IgM ($P=0.017$) plasma levels in ASM cases, increased IgM ($P=0.001$) and IgD ($P=0.001$) plasma levels in ISM patients and exacerbated IgE ($P<0.001$) with decreased IgG ($P=0.008$) plasma levels in BMM cases.

Conclusion: Our results reveal a significant dysregulation of the B-cell and PC compartments in blood of SM patients, consistent with distinctly altered antibody-isotype profiles in plasma of BMM vs ISM vs ASM patients.

KEY MESSAGE:

- SM patients show a significant dysregulation of blood circulating B-cell and PC compartments together with distinctly altered Ig-isotype profiles in plasma.
- Different immune B-cell, PC and Ig-isotype profiles were found among patients with BMM, ISM and ASM consistent with allergen vs microbial antigen-driven immune responses potentially triggered by an increased mucosal permeability.

CAPSULE SUMMARY: SM patients display signs of an increased B-cell production and migration to tissues associated with a lower PC counts in blood but increased IgM, IgD or IgE antibody, leading to uniquely altered humoral immune response profiles in BMM vs ISM vs ASM patients.

KEY WORDS: B-lymphocyte, immunoglobulin, mast cell, plasma cell, systemic mastocytosis

ABBREVIATIONS:

AdvSM: advanced systemic mastocytosis

ASM: aggressive systemic mastocytosis

ASOqPCR: allele-specific oligonucleotide quantitative polymerase chain reaction

BCP: B-cell precursor

BD: Becton/Dickinson Biosciences

BM: bone marrow

BMM: bone marrow mastocytosis

β 2M: beta2-microglobulin

DC: dendritic cell

GI: gastrointestinal

HaT: hereditary α -tryptasemia

HD: healthy donor

HVA: hymenoptera venom allergy

ICAM: intercellular adhesion molecule

IFN γ : interferon- γ

Ig: immunoglobulin

IL: interleukin

ILC2: type-II innate lymphoid cells

ISM: indolent systemic mastocytosis

LDH: lactate dehydrogenase

MAB: monoclonal antibody

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue

MBC: memory B-cell

MC: mast cell

MCL: mast cell leukemia

PB: peripheral blood

PC: plasma cell

PNA: peptide nucleic acid

qPCR: quantitative real time digital polymerase chain reaction.

REMA: Red Española de MASTocitosis (Spanish network on mastocytosis)

sAP: serum alkaline phosphatase

sBT: serum baseline tryptase

SD: standard deviation

Sm: surface membrane

SM: systemic mastocytosis

SM-AHN: systemic mastocytosis associated with another hematological neoplasm

SOP: standard operating procedure

SSM: smoldering systemic mastocytosis

TGF- β : transforming growth factor β

TNF α : tumour necrosis factor- α

WHO: World Health Organization

INTRODUCTION

Systemic mastocytosis (SM) comprises a heterogeneous group of disorders that result from the clonal expansion of morphologically and immunophenotypically aberrant mast cells (MC) that accumulate in one or more organ systems, such as the skin, bone marrow (BM) and the gastrointestinal (GI) tract (1, 2, 3). Based on the World Health Organization (WHO) 2022 classification, SM is subdivided into BM mastocytosis (BMM), indolent SM (ISM), smoldering SM (SSM), and three subtypes of advanced SM (AdvSM), comprising aggressive SM (ASM), SM with an associated hematological neoplasm (SM-AHN) and mast cell leukemia (MCL) (4, 5, 6). Despite their great clinical-biological heterogeneity, the majority (>90%) of SM patients display the gain-of-function *KIT*^{D816V} mutation, in addition to other *KIT* mutations identified in ≈1-4% of patients (7). Those *KIT* mutations lead to constitutive activation of the *KIT* receptor, and ultimately, of the mutated mast cells (MC), with an increased release of MC mediators and inflammatory cytokines to the extracellular MC microenvironment, with pleiotropic effects on e.g., epithelial cells and other innate and adaptive immune cells (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Despite blood circulating MC go undetected in physiological conditions (15), their broad tissue distribution and strategic (perivascular) localization, confers MC unique immune functions in almost all human organs and tissues (16). Those functions are exerted via both the release of MC mediators (17, 18) and direct cell-cell interactions, particularly with epithelial and endothelial cells, smooth muscle cells and surrounding immune cells (19). Thus, activation of MC induces vasodilation with increased vascular and mucosal permeability (20, 21), local recruitment and activation of inflammatory cells and lymphocytes (22), associated with the release of a wide repertoire of cytokines, chemokines and growth factors such as interleukin (IL)-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, GM-CSF, TGF- β , TNF- α , CCL2 and CCL5 (23). Of note, MC might express a broad range of surface and

cytoplasmic receptors (e.g., CD43, CD80, CD86, and CD40L) and cell-to-cell adhesion molecules -e.g., intercell adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-3- which also enable them to directly interact with both T- and B-lymphocytes (18, 24). Thus, MC can release IL-13 and IL-4 and induce B-cells to undergo class-switching towards IgE-producing memory B-cells (MBC) and plasma cells (PC) (16, 18, 22), at the same time MC can promote B-cell proliferation and differentiation to IgA-secreting PC through direct CD40L-CD40 binding and the release of IL-5, IL-6 and TGF β 1 (16). Altogether, these interactions confer MC an important role in IgE-mediated allergic responses -through IgE binding to the high-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI), and subsequent triggering of MC degranulation-, as well as in the homeostasis of commensal bacteria in e.g., the GI tract, where MC mediators also induce an increased permeability (21, 25)

In this regard, previous studies have reported altered innate immune responses in SM, associated with increased numbers of blood circulating activated (but functionally exhausted) monocytes and dendritic cells (DC), (26) and type-II innate lymphoid cells (ILC2) (27), together with decreased natural killer (NK) cell and TCD8 cytotoxic lymphocyte counts (28, 29). More recently, uniquely altered TCD4⁺ cell immune profiles have also been described in SM, which consist of decreased numbers of Th1 and (specific subsets of) Th2, Th22 and Th1-like regulatory cells (Tregs) together with abnormally high T-follicular helper (TFH) cell counts (29). Interestingly, those altered TCD4 cell immune profiles were closely associated with both the diagnostic subtype of SM and specific clinical manifestations of the disease -i.e, anaphylaxis, Hymenoptera-venom allergy (HVA), bone disease, pruritus, flushing and GI-symptoms- (29). Despite these findings, few studies have been reported so far which focused on the analysis of the B-cell compartment in blood of SM patients (29). This might be due to the fact that both normal serum immunoglobulin (Ig)/antibody levels and normal PB and BM B-cell counts have been previously found in most SM patients (28, 29, 30).

Here, we investigated in detail for the first time, the distribution of different subsets of blood circulating B-lymphocytes, PC and antibody-isotype plasma cells of a large cohort of SM patients with distinct diagnostic subtypes of the disease, with the aim of identifying uniquely altered B-cell, PC and antibody-isotype profiles associated with SM, and gain further insight into the potential role of the humoral response in the pathophysiology and clinical behaviour of the disease.

MATERIAL AND METHODS

Patients, controls and samples. A total of 108 consecutive adult SM patients – 64 women and 44 men; median age of 55 years (range: 27-77 years)- diagnosed and (retrospectively) classified according to the WHO 2022 criteria (4, 5, 6) at the reference centres of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA; Mast Cell Unit, Hospital Virgen del Valle, Toledo; and Cancer Research Centre, Salamanca, Spain), were studied. Those included 35 BMM patients, 64 ISM and 9 ASM cases. In parallel, 117 age-matched (median: 43 years; range: 19-78 years) adult healthy donors (HD) who had no past or present history of allergy or other immune disorders, were studied in parallel as controls. Clinical data on individual patients were retrospectively collected from the patients' medical records as detailed in Supplementary Table 1. Prior to entering the study, each patient and HD gave his/her written informed consent to participate, according to the Declaration of Helsinki; the study was approved by the local Ethics Committees (approval codes: PI-2022-03-997 and PI-2019-03-260).

Flow cytometry identification and quantification of B-cells, plasma cells and their subsets in blood and bone marrow. Blood and bone marrow (BM) samples were separately collected in tubes containing (K3) EDTA as anticoagulant. Blood samples were stained fresh (<24 hours after collection) with the 14-color Euroflow-Immune monitoring (IMM) IgH-isotype-B-cell tube, whereas fresh BM samples were stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) (Supplementary Table 2), following the EuroFlow bulk-lysis standard operating procedure (SOP) available at www.euroflow.org. In every blood sample, the Ig heavy chain (IgH) isotypes and subclasses were assessed using a cell surface membrane plus cytoplasmatic staining, as described elsewhere (31). Stained blood samples were measured in a 3-laser Aurora flow cytometer (Cytek® Biosciences, Fremont, CA) equipped with the SpectroFlo® software (Cytek), while for BM samples a FACSCanto II

flow cytometer -Becton/Dickinson Biosciences (BD), San Jose, CA- equipped with the FACSDiva™ software (BD), was used. For flow cytometry data analysis of both types of data files, the Infinicyt™ software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) was employed, with the gating strategies for the individual cell population detailed in Supplementary methods and Supplementary Figures 1 and 2.

Quantification of immunoglobulin levels in plasma. Soluble IgA, IgG and IgM were measured using conventional nephelometry (Dimension Vista; Siemens Healthcare, Erlanger, Germany), while for IgD and for IgE the IgD Optilite kit (The Binding Site group Ltd, Birmingham; UK) and the ImmunoCAP Total IgE (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) assay were employed, respectively.

Statistical methods. The statistical significance of differences observed among groups was assessed by the Mann-Whitney U test (for continuous variables) or the chi-square and Fisher exact tests (for categorical variables). The threshold for statistical significance was set at P-values <.05, with a false discovery rate (FDR) correction for multiple comparisons of <10%. For all statistical analyses the IBM-SPSS software (v28.0.0.0; IBM, Armonk, NY) and the MIDAS (Massive Information Data Analysis) software (v2.0.5.d; Cytognos SL) were used; figures were plotted using MIDAS (v2.0.5.d) and GraphPad Prism (v8.0.2). Normalization of leukocyte values by age was performed with the MIDAS software, as previously described (32).

RESULTS

Distribution of B-cells and their subsets in blood and BM of SM patients. Overall, SM patients showed normal total B-cell counts in blood (vs HD) and BM (vs normal BM). Despite this, detailed dissection of the B-cell compartment in blood of SM patients revealed significantly increased numbers (normalized per age) of pre-germinal center (pre-GC) B-

lymphocytes ($P=0.009$) at the expense of both immature B-cells ($P<0.001$) and naive $CD5^+$ B-cells ($P<0.001$), but not (the more mature and more represented) naive $CD5^-$ B-lymphocytes (Figure 1A). Of note, progressively greater immature B-lymphocyte counts (increased over normal values) were observed in blood of ISM ($p<0.001$ vs HD; $p=0.032$ vs BMM) and ASM patients ($p<0.001$ vs HD; $p<0.001$ vs BMM; $p=0.004$ vs ISM) (Figure 2A and Supplementary Table 3), while the increase of naive $CD5^+$ B-cells counts in blood over normal values was restricted to ISM ($P=0.002$) (Figure 2A).

In line with the increased blood counts of pre-GC B-lymphocytes in SM, significantly higher percentages of both immature-I ($P=0.031$) and immature-II ($P=0.003$) B-lymphocytes (vs normal BM) were found in BM of SM patients (Figure 3A). Such increased percentage of immature B-lymphocytes in BM translated into a significantly higher immature B-lymphocyte/myeloid cell ratio in SM ($P=0.017$) vs normal BM, particularly among ISM cases ($P=0.017$) (Figure 3B), in the absence of significant differences for the other BCP and mature B-lymphocyte and PC subsets (Figure 3A-B).

In contrast to immature and $CD5^+$ naive B-cells, a pronounced decrease in total PC counts was observed in blood of SM patients vs HD (Figure 1A), such decrease comprised all different IgH-isotype and subclass subsets of PC (i.e., IgM^+ , IgD^+ , IgG_1^+ , IgG_2^+ , IgG_3^+ , IgG_4^+ , IgA_1^+ and IgA_2^+ PC) ($P<0.001$) (Figure 1C and Supplementary Table 3) and their maturation-associated populations of $CD20^+ CD138^-$, $CD20^- CD138^-$ and $CD20^- CD138^+$ PC ($P<0.001$) (Figure 1D). These findings contrasted with MBC and their subsets, which showed normal levels in SM, except for decreased counts (vs HD) of unswitched $smlgMD^+$ MBC ($P=0.037$) and increased $smlgD^+$ -only MBC numbers in blood ($P\leq 0.001$) (Figure 1B).

Likewise, all diagnostic subgroups of SM patients showed significantly decreased numbers of most PC subsets (i.e., IgM^+ , IgG_1^+ , IgG_2^+ , IgG_4^+ , IgA_1^+ and IgA_2^+ PC; $P\leq 0.008$) in blood, such decrease being significantly more pronounced among ASM cases (Figure 2A

and Supplementary Table 3), except for IgG₃⁺ PC and IgD⁺-only PC, which were specifically decreased (vs HD) in BMM (P=0.001) and ISM (P=0.005), and in ISM (P=0.001) patients (P<0.001), respectively (Figure 2A). In addition, significantly lower IgG₂⁺ PC counts were found in blood of ASM patients compared to BMM (P=0.025) and ISM (P=0.017) cases, while the IgD⁺-only PC numbers in blood were significantly lower in ISM vs BMM patients (P=0.049) (Figure 2A). Despite the distribution of MBC in blood was frequently within the normal range, smlgMD⁺ and smlgG₂⁺ MBC shared a similarly altered pattern with significantly decreased blood counts in ASM compared to HD (P=0.038 and P=0.017, respectively), BMM (P=0.038 and P=0.021, respectively) and for smlgG₂⁺ MBC, also ISM (P=0.021) patients (Figure 2A).

Likewise, despite overall normal smlgA₁⁺ and smlgA₂⁺ MBC counts were observed in blood of SM, ASM cases displayed significantly lower numbers of smlgA₁⁺ and smlgA₂⁺ MBC compared to HD (P=0.032 and P=0.015, respectively), BMM cases (P=0.032 and P=0.015, respectively), and for smlgA₂⁺ MBC also, to ISM cases (P=0.019) (Figure 2A). Conversely, smlgD⁺-only MBC showed increased counts in blood over normal HD values in BMM (P=0.002) and ISM (P=0.006) (but not ASM) patients (Figure 2A and Supplementary Table 3).

Soluble immunoglobulin levels in plasma of SM patients. Overall, normal total Ig levels were found in plasma of SM patients (Figure 4A). However, more detailed analysis per Ig-isotype revealed increased (vs HD) IgM (P=0.001) and IgD (P<0.001) (but not IgE, IgA or IgG) antibody levels in plasma of SM (Figure 4A). Of note, the higher IgM plasma levels observed in SM patients, were due to their increase in plasma (vs HD) in ISM (P=0.001) and ASM (P=0.017) cases, but not BMM patients, whereas greater IgD serum levels (vs HD) were restricted to BMM (P=0.027) and ISM (P=0.001) (Figure 4A). In addition, BMM patients displayed abnormally low IgG (P=0.008 vs HD) together with significantly increased IgE plasma levels compared to HD (P<0.001), ISM (P<0.001) and ASM (P<0.001) patients (Figure

4A). Of note, no significantly altered IgA antibody levels in plasma were found in SM (Figure 4A). Altogether, the above alterations translated into significantly increased IgE/IgG and IgE/IgA ratios in plasma of BMM ($P=0.001$ and $P=0.012$, respectively), ISM ($P<0.001$ for both ratios) and ASM ($P=0.005$ and $P=0.006$, respectively) patients, compared to HD (Figure 4B). Meanwhile, a decreased IgG+IgA/IgM ratio was found in SM patients ($P=0.001$), specifically among ISM cases ($P=0.001$) (Figure 4B).

Immune B-cell, plasma cell and soluble immunoglobulin profiles in blood of SM.

Multivariate canonical analysis (CA) confirmed the existence of unique humoral and immune B-cell and PC profiles in blood of BMM vs ISM vs ASM (Figure 2B). Those included the existence of a progressively increased BM production associated with a greater release of immature (pre-GC) B-cells to blood, but a marked decrease in blood of both smlgMD⁺ MBC counts and circulating PC (of virtually all isotypes, subclasses and maturation stages) numbers, from BMM to ISM and particularly, in ASM cases, in parallel to uniquely altered plasma Ig-isotype patterns in the different diagnostic subtypes of SM (Figure 2A).

Association between the immune B-cell, PC and immunoglobulin profiles in blood and

the clinical manifestations of SM. SM patients who referred prior history of *H. Pylori* infection ($P=0.024$), lymphadenopathy ($P=0.011$) osteoporosis ($P=0.004$) and hepatomegaly ($P=0.005$) showed greater counts of immature B-lymphocytes in blood, compared to SM cases who did not present these clinical features (Figure 5A). In turn, a more pronounced decrease in (total and/or subset) PC counts was observed among SM patients who presented with several other (specific) features of the disease: i) patients who had pruritus showed lower IgM⁺ ($P=0.022$), IgG₂⁺ ($P=0.024$), IgG₃⁺ ($P=0.016$) and IgA₁⁺ PC ($P=0.039$) numbers in blood; ii) those who had flushing had lower IgM⁺ ($P=0.032$) and IgG₁⁺ PC ($P=0.019$) counts ; iii) lower IgG₂⁺ PC ($P=0.033$) and IgA₁⁺ PC ($P=0.017$) values were found in patients presenting with (vs without) splenomegaly, iv) decreased IgD⁺-only PC ($P=0.044$)

and lower IgA₂⁺ PC (P=0.036) counts were associated with (vs without) hepatomegaly; and, lower IgG₁⁺ PC numbers (P=0.013) existed among patients who referred *H. Pylori* infection (Figure 5B). Similarly, patients who referred prior relevant (recurrent and/or severe) viral/bacterial infection other than *H. pylori* also showed lower IgG₁⁺ (P=0.012), IgG₂⁺ (P=0.021) and IgM⁺ (P=0.019) PC counts in blood (Figure 5B). As expected, IgE plasma levels were significantly more elevated among patients who had anaphylaxis (P=0.002), HVA (P=0.005) and bone sclerosis (P=0.002) (Figure 5C).

DISCUSSION

MC from SM harbour *KIT* mutations, mostly *KIT*^{D816V} (5). Such mutations have shown to induce constitutive activation of MC (33, 34) and the release of MC mediators to the extracellular environment where they exert effects on other innate and adaptive immune cells, in addition to epithelial cells and other tissue-resident cells (35, 36, 37). Thus, constitutive activation of MC in SM has long been associated with variable MC mediator release-associated symptoms (e.g., pruritus, diarrhea, flushing and anaphylaxis) (3, 38), and parallel (local and systemic) direct and indirect (e.g., via increased mucosal permeability) immune dysregulation (27, 28, 29, 30). In this regard, recent studies from our and other groups have reported increased counts of (constitutively activated but exhausted) blood circulating monocytes (26) and type-II innate lymphoid cells (ILC2) (27), together with decreased NK cell and TCD8 cytotoxic (memory and effector) lymphocyte counts (28, 29) and, uniquely altered TCD4⁺ lymphocyte subset immune profiles in BMM, ISM and ASM patients. These later alterations consist of decreased counts of Th1 TCD4⁺ lymphocytes and specific subsets of Th2 (EM), Th22 (TE) and Th1-like regulatory cells (Tregs), together with abnormally high T-follicular helper (TFH) cell numbers and emerged as being closely associated with several specific clinical manifestations of the disease (29).

Despite these innate cell and T-cell alterations, overall normal serum immunoglobulin levels and normal total B-cell counts have been recurrently found in blood and BM of SM patients (28, 29, 30), limited data existing on the distribution of blood B-cell and PC subsets in SM. Altogether, this points out the need for a more in-depth analysis of the different maturation-and functional/effector B-cell populations, for better understanding immune dysregulation in SM, and its relationship with the clinical manifestations of the disease.

Here we investigated in depth for the first time, the distribution of different B-cell and PC subsets in blood in parallel to Ig-isotype plasma levels, in a large cohort of SM patients, aiming at better understanding the role of B-cells and the humoral response in the pathophysiology and clinical behaviour of SM. Overall, our results confirm previous data (28, 29, 30) which showed normal (total) B-cell counts in blood and BM, and overall normal Ig levels in plasma of SM patients (vs HD). However, more detailed analysis of the different B-lymphocyte and PC subsets revealed uniquely altered profiles, associated with different diagnostic subtypes of the disease. Thus, a progressively higher increase of both immature and naive CD5⁺ B-lymphocyte counts, in parallel to a more marked decrease in PC counts (of all Ig heavy chain (IgH) subclasses and maturation subsets) was found in SM, from BMM to ISM and ASM. These findings suggest the existence of an increased BM production and release to blood of immature and early-naive (i.e., CD5⁺) B-lymphocytes in SM, which is progressively more prominent among ISM and ASM (vs BMM) cases. Of note, such increased production of immature B-lymphocytes was confirmed in BM of SM patients supporting their release in greater numbers to blood, particularly among ASM cases. This increased B-cell production also translated into an elevated ratio between the number of immature B-lymphocytes and myeloid cells produced in the BM, which is in contrast with the decreased B-cell production previously reported for (other) myeloproliferative disorders (39, 40).

Despite the aforementioned increased production and release of immature and naïve CD5⁺ B-lymphocytes to blood, this did not translate into a greater number in blood of the more mature (and major) population of CD5⁻ naïve B-lymphocytes. These findings suggest that the increased B-lymphocyte production here reported, might be associated with either a greater naïve B-lymphocyte turnover, or an increased migration of naïve B-cells into lymphoid tissues. In line with this latter hypothesis, SM patients presenting with organomegalies (e.g., lymphadenopathy and hepatomegaly) and peripheral tissue disorders (e.g., *H. Pylori* and other severe/current infections) showed significantly greater levels in blood of pre-germinal center immature and CD5⁺ naïve, (but not CD5⁻ naïve) B-lymphocytes, supporting an increased migration of the more mature CD5⁻ naïve B-cells to secondary lymphoid organs, including peripheral (lymphoid) tissues such as the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT).

In contrast to pre-GC B-lymphocytes, decreased PC counts in blood was a hallmark of SM of any diagnostic subtype, not mirrored in BM where normal percentages of PC were found. It is well-established that PC which are recently produced in lymphoid tissues, such as lymph nodes, migrate (via blood) to the BM and other peripheral tissues where they secrete antibodies of different isotypes that can be detected in plasma and other body secretions/fluids (41, 42). However, whereas IgG-PC predominantly migrate to inflammatory sites and the BM, IgA PC are primarily located in widespread mucosal regions (where they respond to a broad spectrum of antigens present in e.g., the GI and the respiratory tracts) (41, 42). Altogether, our results suggest that the (deeply) decreased counts of blood circulating PC in SM, might not be directly linked to the migration of these cells as long-lived PC to the BM, but also to an increased migration and/or generation of PC in MALT (e.g., the GI and respiratory mucosa and/or the skin). In this regard, significantly lower counts of blood circulating PC of specific isotypes were found among patients presenting with specific MC-mediator release-related symptoms (i.e., pruritus and flushing

were associated with lower IgM⁺, IgG₁₋₃⁺ and IgA₁⁺ PC), organomegalies (patients with splenomegaly and hepatomegaly had lower IgG₂⁺, IgA₁₋₂⁺ and IgD⁺ PC) and recurrent bacterial/viral infections (*H. Pylori* and other severe/recurrent infections were specifically associated with lower IgM⁺, IgG₁₋₂⁺ PC counts), compared to SM patients who presented without those clinical features. These findings, together with the presence of overall normal (total) Ig plasma levels suggest the existence of an increased migration of recently-produced PC of all isotypes to BM and peripheral tissues (e.g., MALT), potentially associated with a locally increased PC production, in line also with the (potentially) increased tissue migration of pre-germinal center B-lymphocytes, discussed above.

Emerging evidence indicate that although MC infiltration of peripheral tissues, such as the skin and the GI tract, is a frequent finding in SM, there is not a direct correlation between its levels (as reflected by the presence of the *KIT*^{D816V} mutation, serum tryptase levels or the histologic findings in GI biopsies) and the frequency and severity of e.g., GI symptoms (43). Altogether, these data further support the notion that decreased PC counts in blood of SM patients with involvement of other organs (e.g., skin and GI tract) could be due to an increased migration and/or local production of PC in peripheral tissues, triggered by an increased mucosal permeability and the greater microbial/allergen exposure induced by the locally increased release of mediators by *KIT*-mutated infiltrating MC. This could lead to a locally increased antibody production with overall normal plasma Ig levels. In line with these findings, an expansion of IgH class-switched MBC has been reported in gut tissues of individuals with a HaT⁺ genotype, which is known to be more prevalent among SM (44).

In-depth analysis of antibody levels in plasma in SM also revealed an altered profile with elevated amounts of IgM and IgD, particularly among BMM and ISM cases. The existence of increased IgM plasma levels further support the hypothesis an increased encountering of new antigens and primary B-cell responses in SM, while the potential

mechanisms underlying the greater IgD plasma levels deserve further investigations. Interestingly, however, increased IgM and IgD plasma levels were associated with uniquely different profiles for the other Ig isotypes in BMM vs ISM and ASM patients. Thus, BMM patients displayed significantly increased IgE levels together with decreased amounts of IgG and normal IgA, which translated into elevated IgE/IgG and IgE/IgA ratio compared to HD, ISM and ASM. In contrast, ISM patients showed normal IgE and IgG plasma levels, in parallel to the elevated IgM and IgD values, leading to a decreased IgG+IgA/IgM ratio, while ASM cases displayed lower IgE plasma levels together with increased IgM values. Altogether, these data point out an increase in IgE type II immune responses, (with decreased IgG levels) in BMM, consistent with the greater frequency of allergic responses - $\approx 90\%$ had anaphylaxis associated in half of the cases with IgE-mediated HVA as diagnostic trigger-, observed in this diagnostic subtype of SM (44, 45, 46). Meanwhile, ISM patients, particularly ASM cases, displayed a shift towards IgM/IgG, but not IgE, type I antibody immune responses against newly encountered e.g., commensal bacteria and other microbes (Figure 6). Independently of the cause of these different immune response profiles, our data support the notion that the heterogeneity of MC-mediator release-associated symptoms cannot be solely explained by the presence of variable numbers of *KIT*^{D816V} mutated MC and the MC tumor burden (43, 47), supporting a key role for other (bystander) immune cells and the (local or systemic) immune response profiles, in determining and modulating such symptoms, as previously indicated by others (29).

Recent studies have demonstrated an increase in multiple markers that reflect an abnormal (e.g., GI) mucosal permeability in ISM, in close association with specific clinical findings (48). Of note, disruption of the normal (e.g., GI) mucosal barrier induced by specific MC mediators (e.g., TNF α , IFN or IL-1 β) and locally produced cytokines increased in SM (26, 49) have also been reported to enhance mucosal permeability (e.g., in the GI tract) (26, 49). In turn, may substantially affect antigen trafficking, and modulate the close interaction

between the gut microbiome (shaped mostly by IgA⁺ PC) and the local vs systemic immune responses (50, 51). Our data suggest that the different immune profiles observed among the distinct diagnostic subtypes of SM, might result from different antigen trafficking at the MALT and mucosal tissues, potentially triggered by chronic activation of tissue-infiltrating *KIT*-mutated MC, associated with the local release of MC (epithelial and other immune cell) mediators, this might ultimately lead to a greater local increased recruitment of naive B-cells and the production of Ab-secreting PC of different isotypes, depending on the predominance of allergen vs commensal microbial antigen stimuli, the oxidative (e.g., DUOX1 vs DUOX2 oxidase and signaling) potential of epithelial cells and the induction of type I vs type II immune responses (52). Further investigations focused on the study of the local mucosal immune responses in SM are critical to understand the role of the mucosal barrier in SM and to confirm our hypothesis (Figure 6).

In summary, here we report for the first time a significant dysregulation of the B-cell and PC compartments in blood of SM patients, in association with distinctly altered antibody-isotype profiles in plasma of patients with distinct diagnostic subtypes of SM. Further investigations are needed to better understand the precise underlying pathophysiological mechanisms involved in the alteration of the B-cell compartment in SM and its contribution to the variable clinical behaviour of the disease.

Author contributions:

AP-P performed experiments, analysed the data, interpreted the results, made the figures and wrote the paper; AH, IA-T and LS-M recruited and monitored the patients, recorded and retrieved clinical data and collected the samples; TC-S, MJ-A, PN-N, CC and OG-L performed experiments; ACG-M and MP-A critically reviewed the paper; QL and RF provided support with statistical analysis of results and graphical representation of data; AM and AO designed the research, supervised the study and wrote the paper. All authors reviewed the paper and approved its final version.

Funding:

This study has been supported by the following grants: grant number PI19/01166 and PI22/01657 from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII; Madrid, Spain); grant number CB16/12/00400 and from the Biomedical Research Networking Center Consortium [CIBERONC] programme (ISCIII, Madrid, Spain); co-funded by the “European Union” (EQC2019-005419-P), within the Subprograma Estatal de Infraestructuras de Investigación y Equipamiento Científico Técnico de 2019 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. AP-P was supported by a grant from the Government of Castilla y León (Orden EDU/556/2019; Valladolid, Spain) co-funded by the “European Regional Development Fund” (FEDER BDNS, Identif.:422058). PN-N was supported by a grant from the Government of Castilla y León (Orden EDU/875/2021; Valladolid, Spain) co-funded by the European Social Fund (FEDER BDNS, Identif.: 540787). OG-L was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PFIS: FI20/00116-AES 2017-2020, BOE 28/03/2019-Orden CNU/354/2019) co-funded by The European Union (FSE+). AM was supported by the Biomedical Research Networking Center Consortium on cancer (CIBERONC) (contract number PRF-2869).

Acknowledgments

We thank the support of the Spanish National DNA Bank Carlos III (www.bancoadn.org; biobank IDB.0000716; supported by ISCIII and co-founded by EU [grant number PT20/00085]) and the Biobank at the Hospital Universitario de Toledo (BioB-HUT) No. B.0000520, Toledo, Spain for providing plasma samples.

REFERENCES

1. Horny HP, Sotlar K, Valent P, Hartmann K. Mastocytosis: a disease of the hematopoietic stem cell. *Dtsch Arztebl Int*. 2008 Oct;105(40):686-92. doi: 10.3238/arztebl.2008.0686.
2. Valent P, Akin C, Sperr WR, Horny HP, Arock M, Metcalfe DD, Galli SJ. New Insights into the Pathogenesis of Mastocytosis: Emerging Concepts in Diagnosis and Therapy. *Annu Rev Pathol*. 2023 Jan 24; 18:361-386. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-031521-042618.
3. Zanotti R, Tanasi I, Crosera L, Bonifacio M, Schena D, Orsolini G, et al. Systemic Mastocytosis: Multidisciplinary Approach. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2021 Nov 1;13(1):e2021068. doi: 10.4084/MJHID.2021.068.
4. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703-1719. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1.
5. Valent P, Akin C, Hartmann K, Alvarez-Twose I, Brockow K, Hermine O et al. Updated Diagnostic Criteria and Classification of Mast Cell Disorders: A Consensus Proposal. *HemaSphere*. 2021 Oct 13;5(11): e646. doi: 10.1097/HS9.0000000000000646.
6. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001 Jul;25(7):603-25. doi: 10.1016/s0145-2126(01)00038-8.
7. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A 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 Oct 1;108(7):2366-72. doi: 10.1182/blood-2006-04-015545.
8. Castells M, Metcalfe DD, Escribano L. Diagnosis and treatment of cutaneous mastocytosis in children: practical recommendations. *Am J Clin Dermatol*. 2011 Aug 1;12(4):259-70. doi: 10.2165/11588890-000000000-00000.
9. Tefferi A, Pardanani A. Systemic mastocytosis: current concepts and treatment advances. *Curr Hematol Rep*. 2004 May;3(3):197-202.
10. 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 Jan;5(1):61-77. doi: 10.2174/187152806775269303.

11. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
12. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008 Dec 2;6(12):2853-68. doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
13. Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol.* 2009 Jul;31(2):185-205. doi: 10.1007/s00281-009-0165-4.
14. Zhao XO, Sommerhoff CP, Paivandy A, Pejler G. Mast cell chymase regulates extracellular matrix remodeling-related events in primary human small airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Dec;150(6):1534-1544. doi: 10.1016/j.jaci.2022.05.028.
15. Henriques A, Muñoz-González JI, Sánchez-Muñoz L, Matito A, Torres-Rivera L, Jara-Acevedo M et al. Frequency and prognostic impact of blood-circulating tumor mast cells in mastocytosis. *Blood.* 2022 Jan 27;139(4):572-583. doi: 10.1182/blood.2021012694.
16. da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem.* 2014 Oct;62(10):698-738. doi: 10.1369/0022155414545334.
17. Li JY, Ryder CB, Zhang H, Cockey SG, Hyjek E, Moscinski LC et al. Review and Updates on Systemic Mastocytosis and Related Entities. *Cancers (Basel).* 2023 Nov 28;15(23):5626. doi: 10.3390/cancers15235626.
18. Dileepan KN, Raveendran VV, Sharma R, Abraham H, Barua R, Singh V, et al. Mast cell-mediated immune regulation in health and disease. *Front Med (Lausanne).* 2023 Aug 17;10:1213320. doi: 10.3389/fmed.2023.1213320.
19. Elieh Ali Komi D, Grauwet K. Role of Mast Cells in Regulation of T Cell Responses in Experimental and Clinical Settings. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018 Jun;54(3):432-445. doi: 10.1007/s12016-017-8646-z.
20. Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, Omori K, Kobayashi K, Hori M et al. Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PLoS One.* 2015 Jul 9;10(7):e0132367. doi: 10.1371/journal.pone.0132367.
21. Albert-Bayo M, Paracuellos I, González-Castro AM, Rodríguez-Urrutia A, Rodríguez-Lagunas MJ, Alonso-Cotoner C et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells.* 2019 Feb 8;8(2):135. doi: 10.3390/cells8020135.

22. Elieh Ali Komi D, Wöhrle S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020 Jun;58(3):342-365. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2.
23. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):984-1010. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033.
24. Woźniak E, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Psychological Stress, Mast Cells, and Psoriasis-Is There Any Relationship? *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 9;22(24):13252. doi: 10.3390/ijms222413252.
25. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol*. 2016 Jan 6;6:620. doi: 10.3389/fimmu.2015.00620.
26. Pérez-Pons A, Jara-Acevedo M, Henriques A, Navarro-Navarro P, García-Montero AC, Álvarez-Twose I, et al. Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients. *Clin Transl Allergy*. 2022 Jun 14;12(6):e12167. doi: 10.1002/ctlt.2.12167.
27. van der Ploeg EK, Hermans MAW, van der Velden VHJ, Dik WA, van Daele PLA, Stadhouders R. Increased group 2 innate lymphoid cells in peripheral blood of adults with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Apr;147(4):1490-1496.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2020.09.037.
28. Kulinski JM, Eisch R, Young ML, Rampertaap S, Stoddard J, Monsale J et al. Skewed Lymphocyte Subpopulations and Associated Phenotypes in Patients with Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020 Jan;8(1):292-301.e2. doi: 10.1016/j.jaip.2019.07.004.
29. Pérez-Pons A, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Henriques A, Navarro-Navarro P, García-Montero AC, et al. T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: Association with disease features. *Allergy*. 2024 Feb 1. doi: 10.1111/all.16043.
30. Makovoz A, Cousins KL, Dominguez Aldama LN, Bolan H, Metcalfe DD, Komarow HD et al. Assessment of low immunoglobulin levels and clinical manifestations in patients with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Glob*. 2023 Feb;2(1):105-110. doi: 10.1016/j.jacig.2022.08.005.
31. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jun;141(6):2208-2219.e16. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.017.
32. Criado I, Nieto WG, Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Teodosio C, Lecrevisse Q et al. The Primary Health Care Group Of Salamanca For The Study Of MBL. Age- and Sex-Matched Normal Leukocyte Subset Ranges in the General Population Defined

- with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST) for Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL) vs. Non-MBL Subjects. *Cancers*. 2022 Dec 22;15(1):58. doi: 10.3390/cancers15010058.
33. Rajan V, Prykhodzhiy SV, Pandey A, Cohen AM, Rainey JK, Berman JN. KIT D816V is dimerization-independent and activates downstream pathways frequently perturbed in mastocytosis. *Br J Haematol*. 2023 Sep;202(5):960-970. doi: 10.1111/bjh.18116.
 34. Raghav PK, Singh AK, Gangenahalli G. A change in structural integrity of c-Kit mutant D816V causes constitutive signaling. *Mutat Res*. 2018 Mar;808:28-38. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2018.02.001.
 35. Yu Y, Blokhuis BR, Garssen J, Redegeld FA. Non-IgE mediated mast cell activation. *Eur J Pharmacol*. 2016 May 5;778:33-43. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.07.017.
 36. Gri G, Frossi B, D'Inca F, Danelli L, Betto E, Mion F et al. Mast cell: an emerging partner in immune interaction. *Front Immunol*. 2012 May 25;3:120. doi: 10.3389/fimmu.2012.00120.
 37. Cardamone C, Parente R, Feo GD, Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol Lett*. 2016 Oct;178:10-4. doi: 10.1016/j.imlet.2016.07.003.
 38. Li JY, Ryder CB, Zhang H, et al. Review and Updates on Systemic Mastocytosis and Related Entities. *Cancers*. 2023 Nov 2023;15(23):5626. doi:10.3390/cancers15235626
 39. Benjamin D, Shohat B, Pinkhas J, Joshua H. B- and T-lymphocyte subpopulations in polycythemia vera. A study of 100 patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1979 Aug;13(4):378-82. doi: 10.1016/0090-1229(79)90078-3.
 40. Sørensen AL, Bjørn ME, Riley CH, Holmstrøm M, Andersen MH, Svane IM et al. B-cell frequencies and immunoregulatory phenotypes in myeloproliferative neoplasms: Influence of ruxolitinib, interferon- α 2, or combination treatment. *Eur J Haematol*. 2019 Oct;103(4):351-361. doi: 10.1111/ejh.13292.
 41. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):822-9. doi: 10.1038/nri1203.
 42. Husband AJ, Gowans JL. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med*. 1978 Nov 1;148(5):1146-60. doi: 10.1084/jem.148.5.1146.
 43. Hsieh FH. Gastrointestinal Involvement in Mast Cell Activation Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018 Aug;38(3):429-441. doi: 10.1016/j.iac.2018.04.008.

44. Konnikova L, Robinson TO, Owings AH, Shirley JF, Davis E, Tang Y et al. Small intestinal immunopathology and GI-associated antibody formation in hereditary alpha-tryptasemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2021 Sep;148(3):813-821.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2021.04.004.
45. Jackson CW, Pratt CM, Rupprecht CP, Pattanaik D, Krishnaswamy G. Mastocytosis and Mast Cell Activation Disorders: Clearing the Air. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 19;22(20):11270. doi: 10.3390/ijms222011270.
46. Zanotti R, Tanasi I, Bernardelli A, Orsolini G, Bonadonna P. Bone Marrow Mastocytosis: A Diagnostic Challenge. *J Clin Med.* 2021 Apr 1;10(7):1420. doi: 10.3390/jcm10071420.
47. Sokol H, Georgin-Lavialle S, Canioni D, Barete S, Damaj G, Soucie E et al. Gastrointestinal manifestations in mastocytosis: a study of 83 patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Oct;132(4):866-73.e1-3. doi: 10.1016/j.jaci.2013.05.026.
48. Komarow HD, Brenchley JM, Eisch AR, Young ML, Scott LM, Kulinski JM et al. A study of microbial translocation markers in mastocytosis. *Clin Exp Allergy.* 2021 Feb;51(2):369-372. doi: 10.1111/cea.13798.
49. Meyer F, Wendling D, Demougeot C, Prati C, Verhoeven F. Cytokines and intestinal epithelial permeability: A systematic review. *Autoimmun Rev.* 2023 Jun;22(6):103331. doi: 10.1016/j.autrev.2023.103331.
50. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Res.* 2020 Jan 31;9:F1000 Faculty Rev-69. doi: 10.12688/f1000research.20510.1.
51. Zogorean R, Wirtz S. The yin and yang of B cells in a constant state of battle: intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *Front Immunol.* 2023 Oct 2;14:1260266. doi: 10.3389/fimmu.2023.1260266.
52. van der Vliet A, Danyal K, Heppner DE. Dual oxidase: a novel therapeutic target in allergic disease. *Br J Pharmacol.* 2018 May;175(9):1401-1418. doi: 10.1111/bph.14158.

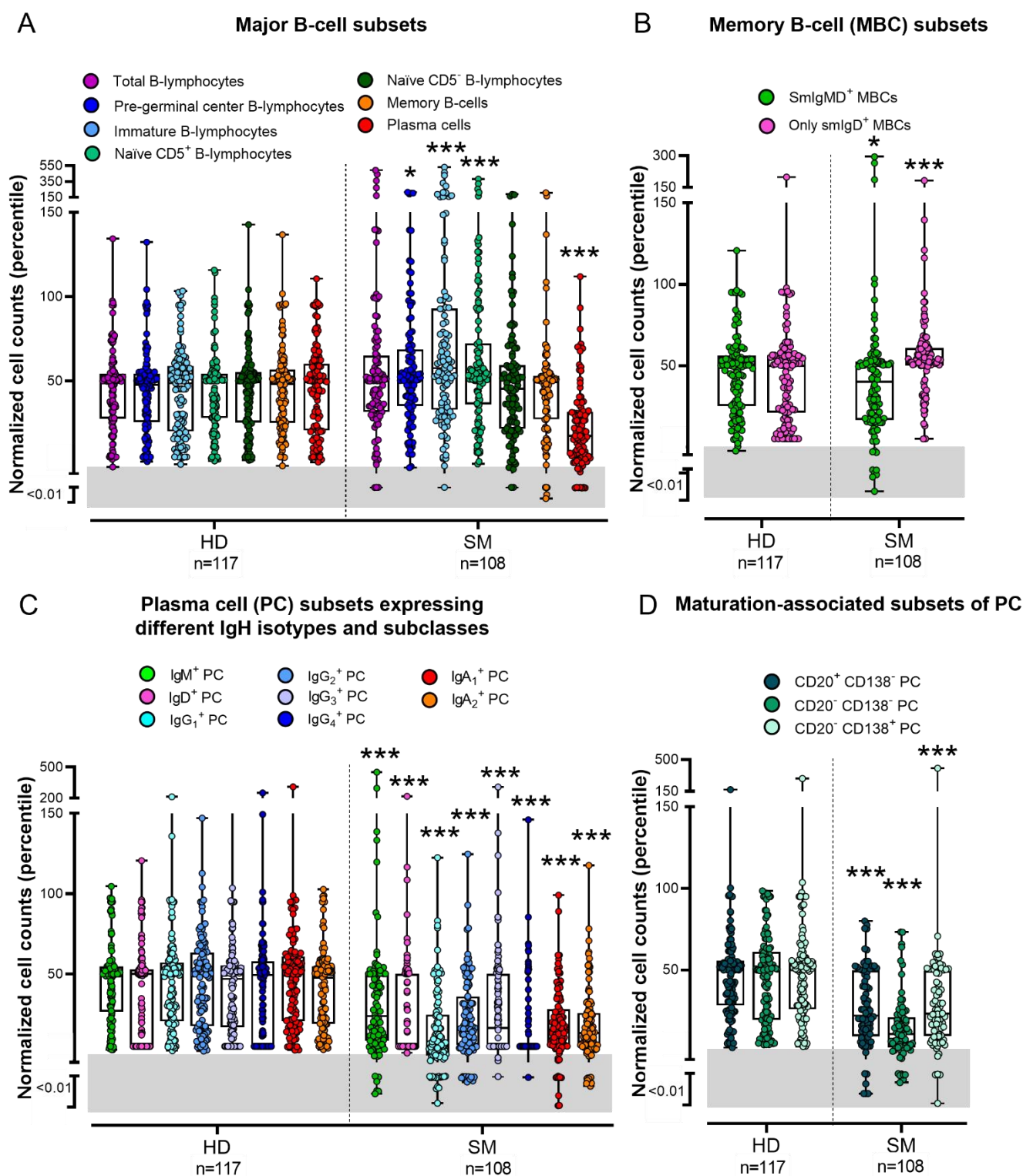


Figure 1. Distribution of different maturation-associated and IgH-isotype and subclass-related subsets of B-lymphocytes and PC in blood of systemic mastocytosis (SM) patients (n=108) vs HD (n=117). A, major subsets of B-lymphocytes including total B-lymphocytes, pre-germinal center B-lymphocytes (i.e immature B-lymphocytes, naive CD5⁺ and naive CD5⁻ B-lymphocytes), memory B-cells (MBC) and plasma cells (PC); B, smlgMD⁺ and smlgD⁺ MBC; C, PC subsets expressing distinct IgH-isotypes and subclasses: IgM⁺-only, IgD⁺-only, IgG1⁺, IgG2⁺, IgG3⁺, IgG4⁺, IgA1⁺ and IgA2⁺; and D,

maturation-associated subsets of PC defined based on their CD138 and CD20 expression profile. Notched-boxes correspond to normalized box-plots based on the median (5th - 95th) percentile values observed among age-matched healthy donors (HD), that extend from the 25th to the 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. The grey area represents data below the HD 99.9th percentile values. P-values: * <.05, ** <.010, *** < .001. HD, healthy donor; MBC, memory B-cell; PC, plasma cell; SM, systemic mastocytosis; sm, surface membrane.

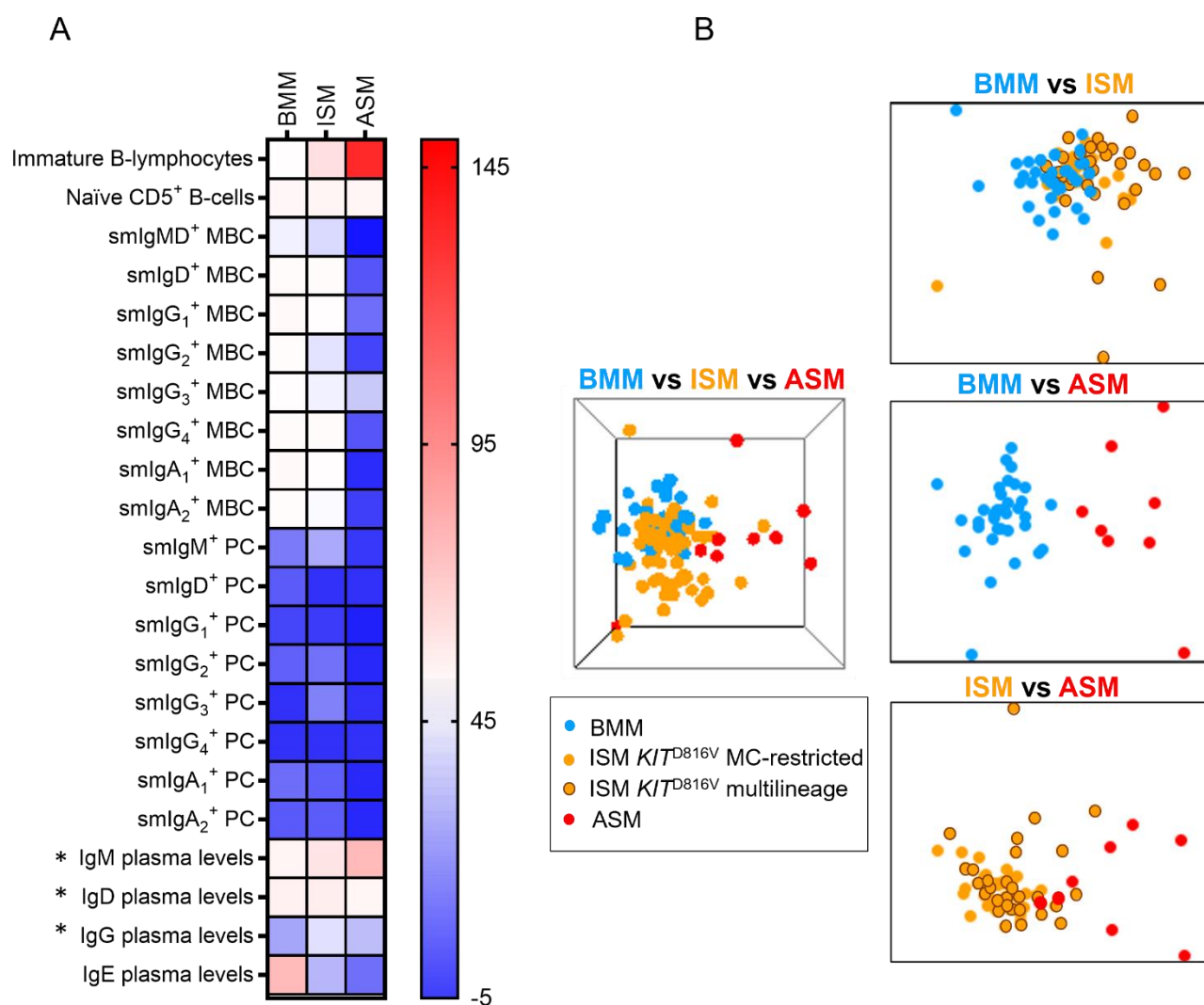
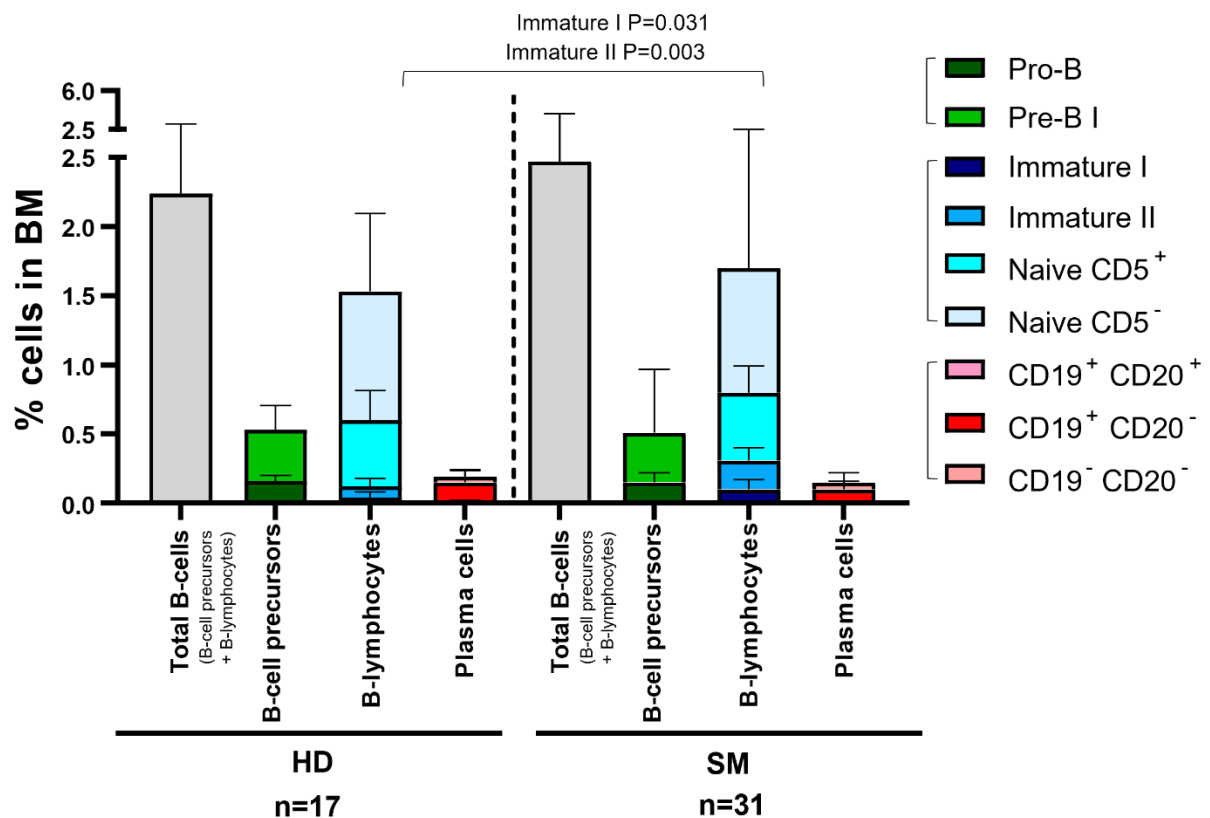


Figure 2. Overall plasma Ig and blood B-cell immune profile of systemic mastocytosis (SM; n=108) patients distributed according to the distinct diagnostic subtypes of the disease based on multivariate canonical analyses (CA). A, heatmap showing color-coded squares based on percentile values normalized against age-matched HD. B, three-dimensional and two-dimensional plot representations of multivariate canonical analyses of BMM vs ISM vs ASM where each individual circle represents a single case expressed as age normalized percentile values found among healthy donors. Data on CA plots is based on multivariate CA analyses of those 15 different cellular parameters that showed statistically significant differences between the groups in the univariate analysis plus antibody plasma levels; variables not included are depicted with *. ASM is depicted in red; BMM is shown in blue and ISM is displayed in orange with or without a dark surrounding circle in cases showing multilineage or MC-restricted *KIT*^{D816V}, respectively. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; HD, healthy donor; ISM, indolent systemic mastocytosis; CA, canonical multivariate analysis.

Panel A



Panel B

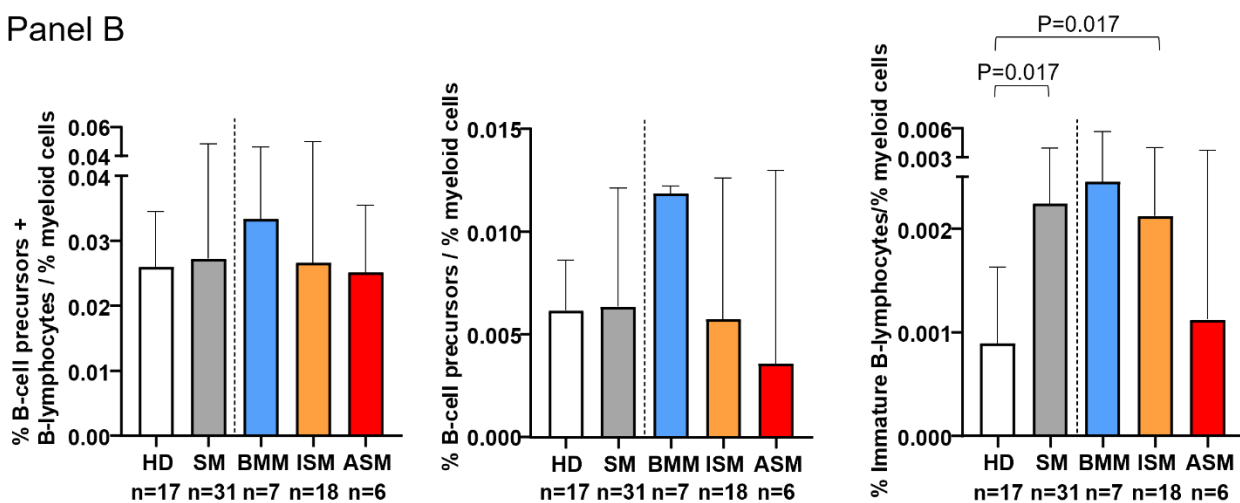
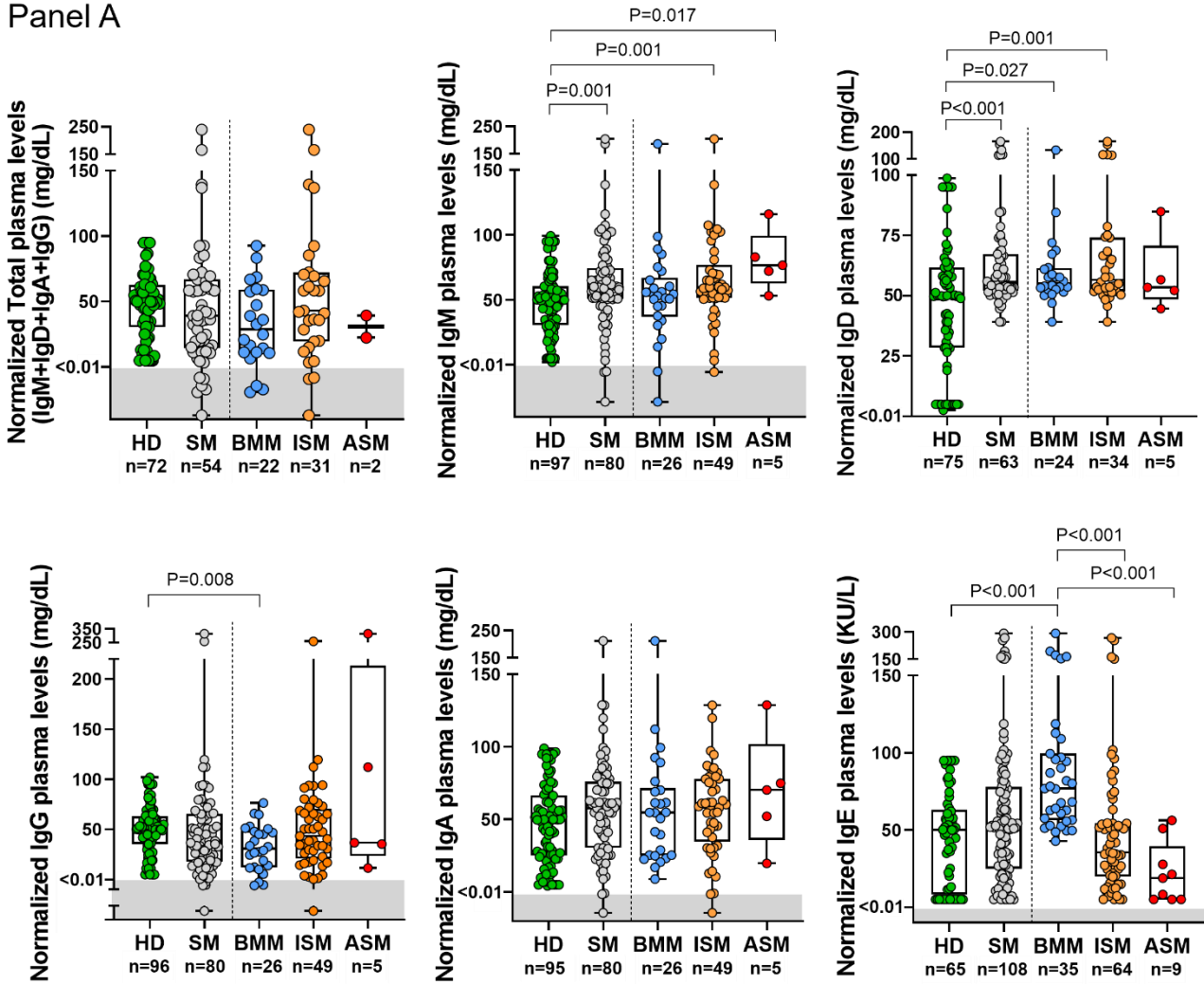


Figure 3. Distribution of the major populations of B-cell precursors, maturing and mature B-lymphocytes and PC in the bone marrow (BM) of systemic mastocytosis (SM) patients (n=31) compared to healthy donors (HD) (n=17). In panel A, the relative distribution of total B-cells and their subsets, including (Pro-B and Pre-B) B-cell precursors, smIg⁺ (immature-I, immature-II, naive CD5⁺ and naive CD5⁻) B-lymphocytes and plasma cells (classified into different maturation stages according to the pattern of expression of CD19 and CD20) are shown. In panel B, the ratio between the percentage of total B-cells (B-cell precursors plus B-lymphocytes), B-cell precursors or immature B-lymphocytes divided by the percentage of myeloid cells in the BM, are displayed. Percentage data are represented using median values and interquartile range. HD, healthy donor; SM, systemic mastocytosis.

Panel A



Panel B

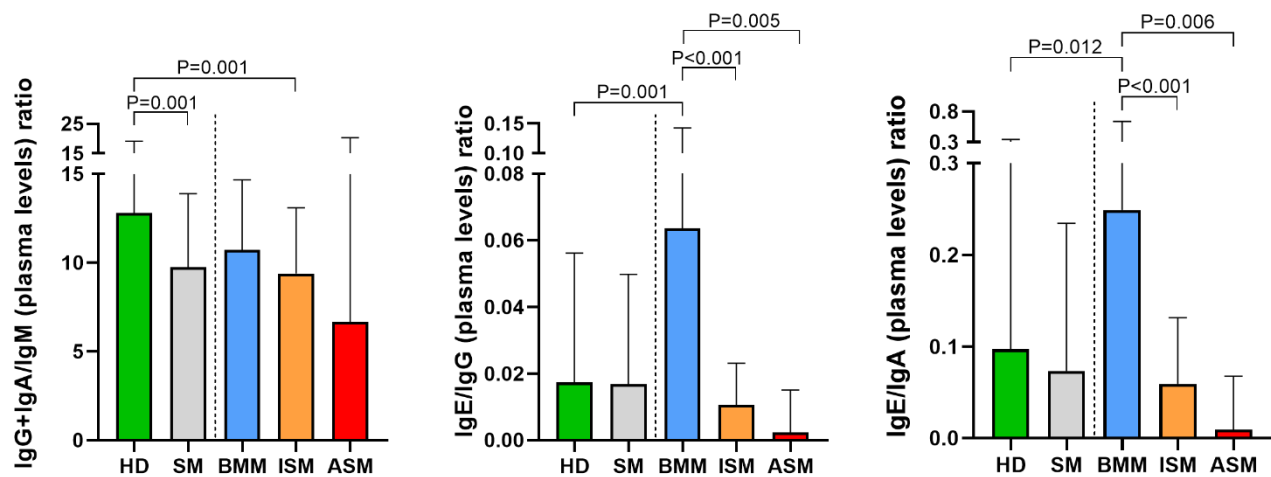
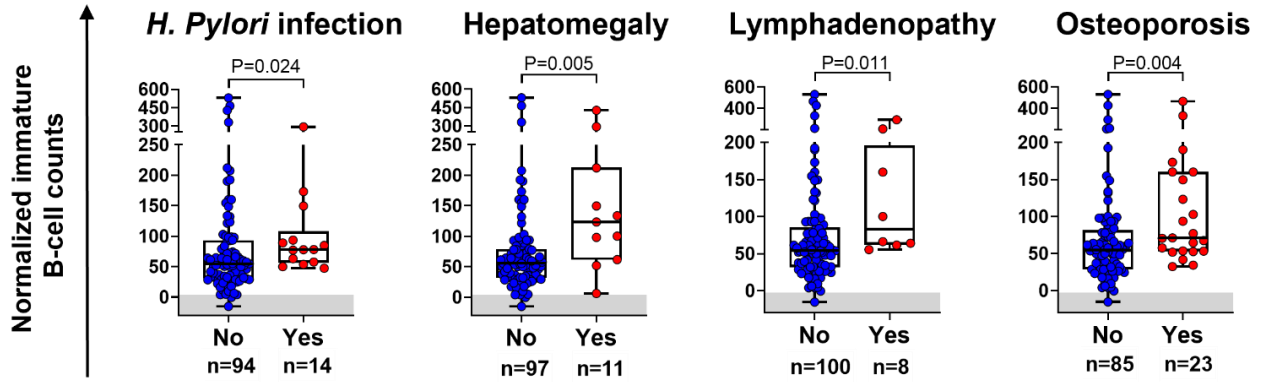


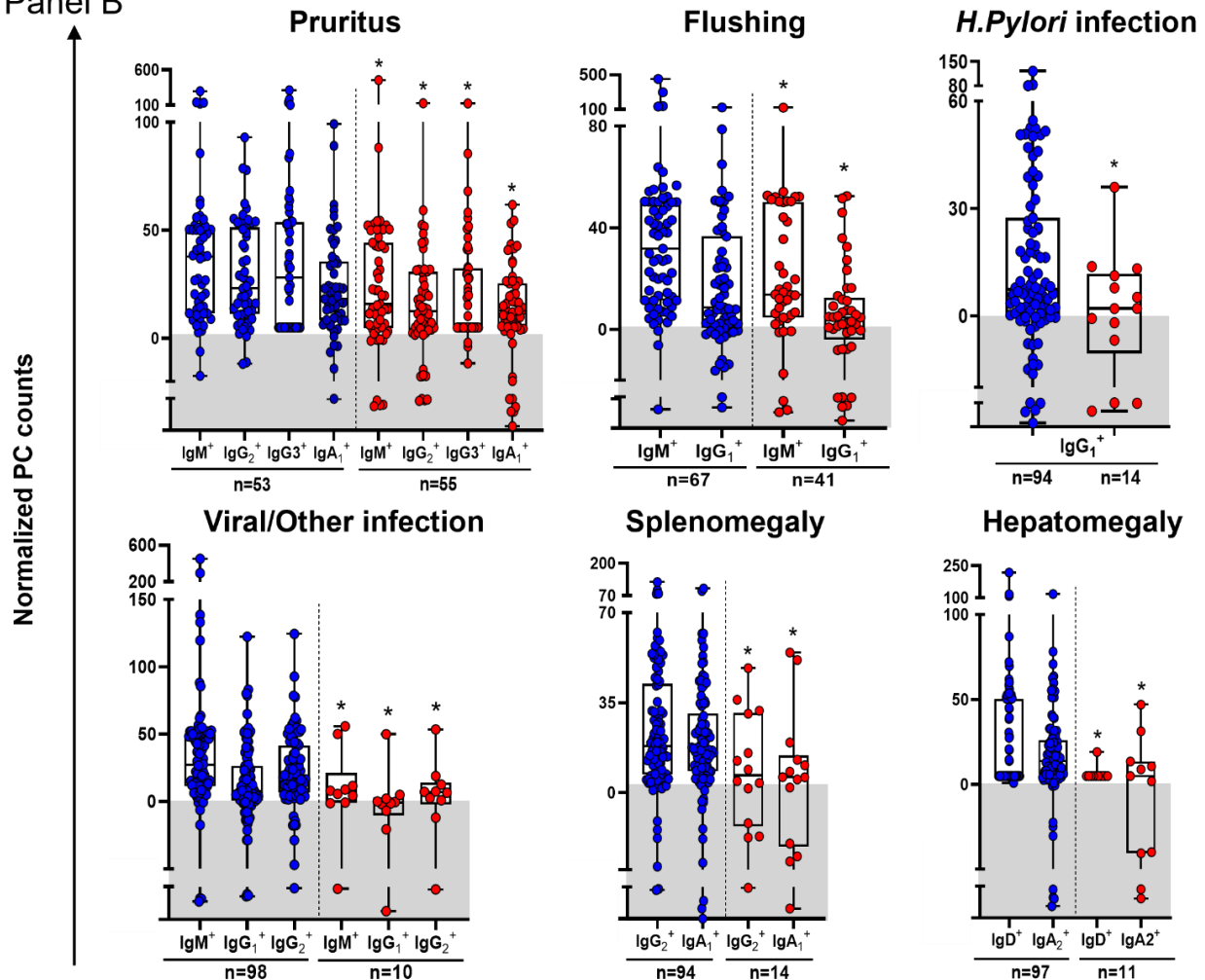
Figure 4. Soluble IgM, IgD, IgG, IgA (mg/dL) and IgE (KU/L) levels in plasma of HD and SM patients classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease. In panel A, total Igs and the plasma levels of their IgM, IgD, IgA IgG and IgE isotypes, are shown. In panel B, the ratio between the IgA+IgG/IgM, IgE/IgG and IgE/IgA levels in plasma is displayed. Notched-boxes correspond to normalized box-plots based on median (5th - 95th)

percentile values observed among age-matched healthy donors (HD), and they extend from the 25th to the 75th percentile values; the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed color-coded according to the different diagnostic subtypes of SM (SM, grey; BMM, blue; ISM, orange; ASM, red) vs HD (green). The grey area represents data below the HD 99.9th percentile values. Data on the IgA+IgG/IgM, IgE/IgG and IgE/IgA plasma levels ratios, are represented using median and interquartile range values. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; HD, healthy donor; ISM, indolent systemic mastocytosis.

Panel A



Panel B



Panel C

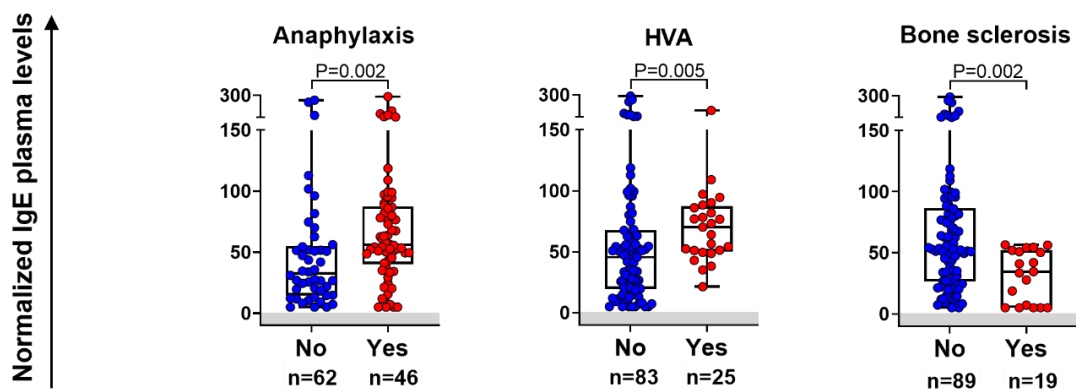


Figure 5. Distribution of immature B-lymphocyte numbers (panel A) and PC subset counts (panel B) in blood and IgE plasma levels (panel C) in systemic mastocytosis (SM) patients (n=108) classified according to the presence vs absence of different (clinical) features of the disease. Notched-boxes extend from the 25th to the 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed color-coded according to the absence (blue) vs presence (red) of each individual clinical feature. The grey area represents data below HD values. GI, gastrointestinal; HVA, hymenoptera venom allergy; PC, plasma cell.

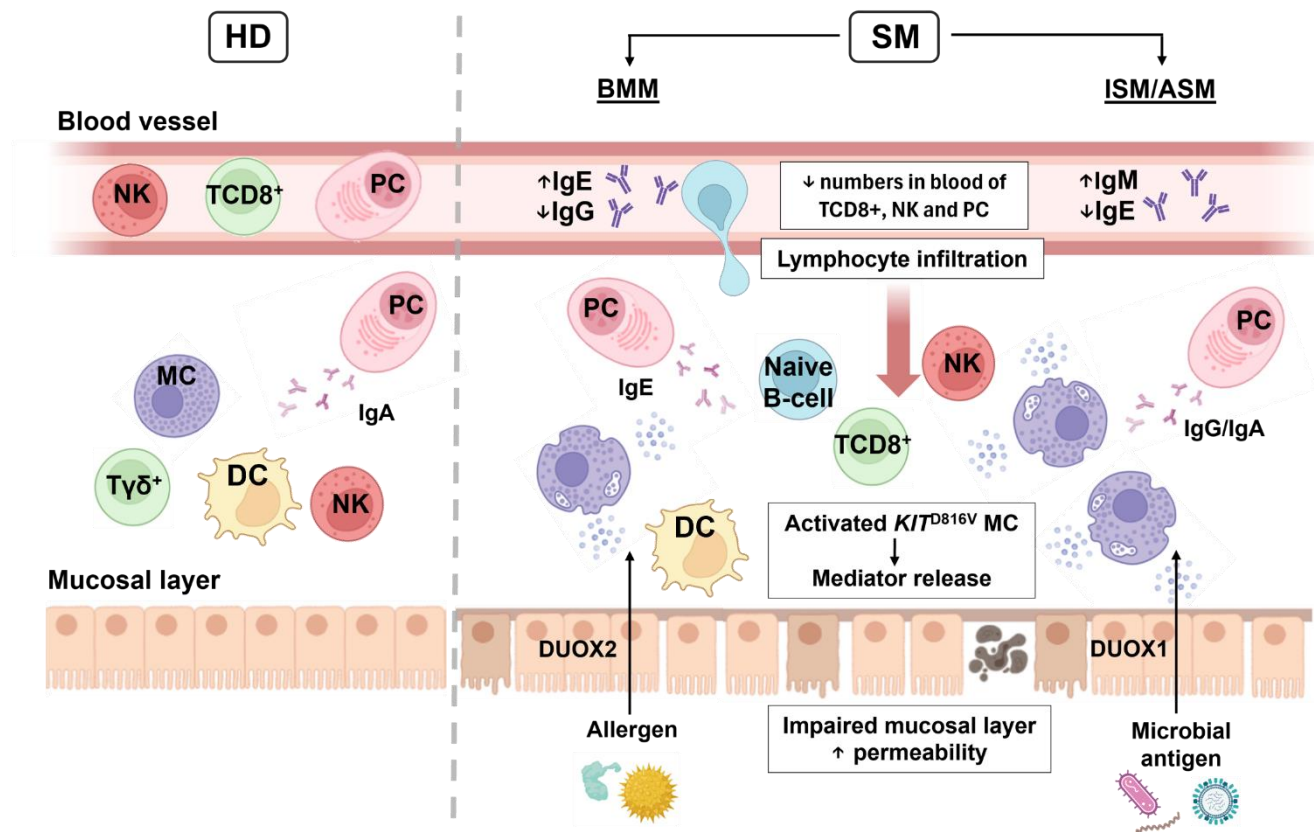
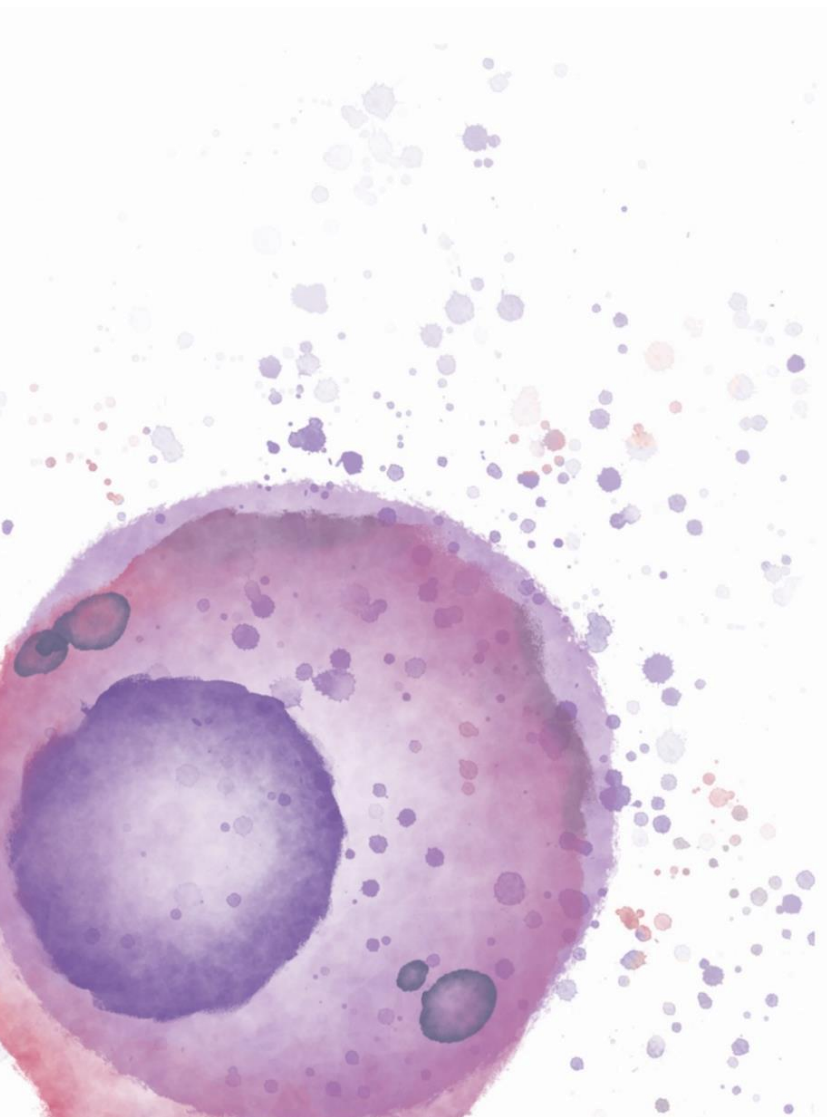


Figure 6. Schematic representation of the dysregulated the B-cell, PC and antibody-isotype compartments observed in blood and plasma of patients with different diagnostic subtypes of SM. In SM patients, a chronic activation of (e.g., mucosal) tissues infiltrated by *KIT*-mutated MC associated with the local release of MC mediators might cause an increased mucosal permeability and ultimately, distinctly dysregulated of mucosal antigen trafficking. Depending on the predominance of allergen vs (commensal) microbial antigen stimuli and the induction of type I vs type II immune responses, different subsets of blood circulating immune cells are recruited locally, such as NK, CD8⁺ T-cells, naive B-cells and PC, which might lead to the dysregulated humoral response and to the different B-cell, PC and antibody-isotype immune profiles observed in our cohort among the distinct diagnostic subtypes of SM.

Discusión



La SM integra un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por presentar en más del 90% de los casos mutaciones con ganancia de función en el gen *KIT*, asociadas a una expansión de mastocitos clonales aberrantes y constitutivamente activados¹⁵³⁻¹⁵⁶. Sin embargo, la presencia de exactamente la misma mutación de *KIT* (*KIT*^{D816V}) en la práctica totalidad de los pacientes, independientemente del subtipo diagnóstico de la enfermedad, no puede explicar, por sí sola, la heterogeneidad clínica y biológica que caracteriza a esta enfermedad. Según estudios recientes, esta heterogeneidad clínica, a nivel local (o sistémico) tampoco depende enteramente de la presencia o no de infiltrados de mastocitos clonales en los distintos tejidos, como se ha observado, por ejemplo, en biopsias del tracto GI en las que el número de mastocitos en el infiltrado no explica la sintomatología tan variable que se observa entre distintos pacientes²⁴⁵. En la actualidad existe un número creciente de evidencias que apuntan a que los pacientes con SM puedan presentar un sistema inmunitario desregulado con cambios en la distribución de los diferentes compartimentos funcionales de células de la inmunidad innata, asociados a un incremento de la producción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios como la IL-6^{226,227,231}. Ante estos antecedentes y el importante papel inmunomodulador que realiza en condiciones normales el mastocito, en esta tesis doctoral nos planteamos la hipótesis de que la activación constitutiva de los mastocitos portadores de la mutación *KIT*^{D816V} de pacientes con SM, como consecuencia de una liberación incrementada de mediadores al micromedioambiente tumoral, pudieran ejercer efectos importantes (directos o indirectos) sobre la función y la distribución tisular de otras células inmunes, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, que a su vez, pudieran condicionar el comportamiento clínico heterogéneo de la enfermedad, dependiente o no del subtipo diagnóstico concreto de la misma.

Así, como primer objetivo de esta tesis doctoral nos propusimos evaluar en una amplia cohorte de pacientes diagnosticados con diferentes subtipos diagnósticos de SM,

el número y el estado funcional del compartimento de células de la inmunidad innata circulantes en la sangre de estos pacientes, poniendo un foco especial en los distintos subtipos de monocitos y DC, como células candidatas a constituir una de las principales fuentes de producción de las citoquinas inflamatorias que, como la IL-6, se encuentran elevadas en el plasma de pacientes con SM²³¹.

Una vez establecida la existencia de una respuesta inmunitaria innata alterada y de un perfil inmune claramente activado en los pacientes con SM, altamente sugestivo de la implicación adicional de la inmunidad adaptativa en general, y de los linfocitos T CD4⁺ en particular, consideramos determinar en una cohorte amplia de pacientes si esta desregulación se extendía además a la inmunidad adaptativa, y principalmente al compartimento de células T y sus distintos subpoblaciones funcionales y madurativas. Por este motivo, el segundo objetivo de este trabajo se centró en ahondar en el perfil de los linfocitos T CD4⁺ y T CD4⁻ en sangre de pacientes con SM, con la finalidad de identificar patrones característicos de alteración de la respuesta inmunitaria que pudieran ser típicos de los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad y contribuir a explicar al menos en parte, la gran heterogeneidad clínica de estos pacientes.

Finalmente, partiendo de esa misma hipótesis que apunta a que existiría una desregulación de la inmunidad adaptativa en pacientes con SM, reflejada en alteraciones estructurales del compartimento de linfocitos T circulantes en sangre, planteamos que dichos cambios pudieran afectar también de forma generalizada y diferencial, la distribución de distintas subpoblaciones de células B y de PC productoras de anticuerpos de pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de SM. Además, si tenemos en cuenta el predominio de sintomatología asociada a la liberación de mediadores mastocitarios¹⁸², junto con la elevada prevalencia de alergia a venenos de insectos mediada por IgE, sobre todo en los pacientes con BMM²⁵³, consideramos también analizar los niveles de los

distintos isotipos de inmunoglobulinas en plasma, para poder conocer el posible impacto de las alteraciones de la respuesta humoral en el comportamiento clínico de la enfermedad, explorando la relación potencialmente existente entre los niveles séricos de Ig y las manifestaciones clínicas derivadas de la activación mastocitaria (combinada) por *KIT^{D816V}* y *FCεRI*.

A continuación, abordaremos de forma secuencial la discusión de los resultados obtenidos en relación con cada uno de los tres objetivos específicos planteados en el trabajo, y recogidos en los tres artículos científicos derivados del mismo, incluidos en el apartado de resultados de esta tesis doctoral.

1. Distribución y estado funcional de las diferentes subpoblaciones de monocitos y DC de sangre de pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de SM.

En la actualidad existen numerosas evidencias que demuestran el importante papel inmunomodulador del mastocito, tanto en condiciones fisiológicas como en distintas patologías, al ejercer efectos directos e indirectos sobre otras células del sistema inmune, incluyendo otras células mieloides de la inmunidad innata^{12,53,123,134,143,147,254,255}. A modo de ejemplo, la triptasa-α secretada de forma basal y tras activación por el mastocito puede activar otras células inmunitarias como los monocitos, los macrófagos y las DC, al inducir en ellas la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias como TNFα, IL-1β e IL-6, en ausencia de citoquinas directamente relacionadas con la polarización de linfocitos T de tipo Th1 o Th2, como la IL-12 o la IL-4²⁵⁶. En ese sentido, estudios previos han demostrado que los pacientes con SM presentan con frecuencia niveles anormalmente elevados en suero de citoquinas inflamatorias²³¹. Sin embargo, estos niveles elevados de citoquinas inflamatorias se han atribuido a una producción incrementada de los mismos por parte de los mastocitos patológicos²³³, lo cual contrasta con estudios de expresión

génica realizados a nivel de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de mastocitos primarios purificados de MO de pacientes con SM en los que no se observó un incremento de la expresión de TNF α , IL-1 β , IL-6 u otras citoquinas inflamatorias²⁰⁹. Ante estos y otros hallazgos recientes que demuestran una regulación al alza de proteínas asociadas a las vías de señalización de IL6, TNF α e IFN en pDC y monocitos de sangre periférica de pacientes con ISM, asociada a cambios en su distribución numérica²²⁷, cabría la posibilidad de que, más que el propio mastocito patológico, fueran otras células del sistema inmune (e.g., monocitos y macrófagos), la principal fuente productora de estas citocinas y por lo tanto, las responsables del incremento en los niveles plasmáticos de las mismas, debido a un estado de activación inmune mantenido de forma prolongada en pacientes con SM.

En términos generales, nuestros resultados confirman la existencia de niveles plasmáticos elevados de diferentes citoquinas inflamatorias en pacientes con SM, incluyendo niveles elevados de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α y en menor medida también, de IL-10, independientemente del subtipo diagnóstico de la enfermedad (e.g., BMM, ISM, ASM). En cambio, no se observaron niveles elevados de IL-12, IL-13 o TGF β ; además, estudios *ex vivo* demostraron la existencia de una producción espontánea de esas citoquinas por parte de los monocitos circulantes de pacientes con SM significativamente aumentada, correlacionándose el porcentaje de monocitos productores de IL-6, IL-1 β y el TNF α con los niveles plasmáticos de esas citoquinas en plasma observados en cada paciente. En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de una alteración funcional de los monocitos circulantes en la SM, independientemente del subtipo diagnóstico de la enfermedad, la carga mastocitaria, o la presencia de la mutación *KIT*^{D816V} en dichos monocitos, pudiendo dicha alteración ser eventualmente secundaria a la activación subyacente de los mastocitos patológicos, a nivel tisular.

En este sentido, hoy es ampliamente conocido que la SM se asocia con un incremento de los niveles de triptasa sérica, y que ésta puede activar células que, como los monocitos, expresen en su membrana los receptores EMR_2 y PAR_2 ²⁴⁸. Dado que ésta podría constituir una de las vías de activación directa de los monocitos en pacientes con SM, en este trabajo analizamos los niveles plasmáticos y de expresión en la membrana citoplasmática de monocitos de pacientes con SM, de ambos receptores. Nuestros resultados muestran la ausencia de una asociación directa entre carga mastocitaria, niveles de sBT y la expresión celular y soluble en plasma de EMR_2 y PAR_2 por un lado, o la activación de los monocitos, por otra parte. De acuerdo con estos resultados, tampoco observamos una asociación directa entre los niveles alterados de citoquinas inflamatorias o de sBT y la presencia de un genotipo HaT. Con el fin de descartar que la activación *in vivo* de los monocitos estuviera directamente relacionada con un ambiente inmunosenescente tumoral, analizamos en paralelo los niveles plasmáticos de marcadores de senescencia como CXCR2, SAA1 y TLR2, encontrando también valores normales para cada uno de ellos. En su conjunto, estos hallazgos sugieren que la activación masiva de los monocitos circulantes en sangre en pacientes con SM proviene de un mecanismo inflamatorio no relacionado con un posible estado de senescencia inmune, y aparentemente independiente de la señalización directa entre el mastocito y el monocito por la vía triptasa- EMR_2/PAR_2 .

Aunque no pudimos determinar el mecanismo concreto que lleva a la activación masiva de los monocitos circulantes en la SM, estudios de estimulación *in vitro* con LPS e IFN γ demostraron que dichos monocitos, a pesar de mostrar una producción espontánea de citoquinas inflamatorias significativa incrementada, estaban funcionalmente exhaustos. No obstante, dado que el LPS y el IFN γ inducen una activación convencional polarizando a los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio de tipo M1, serían necesarios estudios de activación *in vitro* adicionales con otros estímulos inductores de

diferenciación monocito/macrófago de tipo M2 (como por ejemplo, con IL-4 e IL-13), para confirmar nuestra hipótesis y comprender mejor la importancia biológica y las bases fisiopatológicas de esta activación asociada al agotamiento funcional de los monocitos de SP de pacientes con SM²⁵⁷⁻²⁶⁰.

Ante estos datos, nuestro interés se centró a continuación en conocer si la alteración funcional de los monocitos podría deberse, o estar asociada, a cambios en la distribución de sus subpoblaciones principales en sangre. En este sentido, nuestros resultados demostraron una alteración importante en la distribución y recuento de estas poblaciones de células inmunes innatas en la SM, consistentes en valores significativamente disminuidos de monocitos, a expensas principalmente de las subpoblaciones de iMo y de ncMo con fenotipo maduro $\text{Slan}^+\text{CD36}^-$ y, asociado a diferencias adicionales según el subtipo diagnóstico de enfermedad. Así, los pacientes con ASM mostraron cifras de cMo en sangre significativamente superiores a las de los sujetos sanos y pacientes diagnosticados de ISM, mientras que el descenso de ncMo en sangre era más pronunciado en la ASM vs ISM. En conjunto, estos datos sugieren la posible existencia de un reclutamiento de iMo y ncMo (y sobre todo de las subpoblaciones más diferenciadas ncMo Slan^+) a tejidos donde se acumulan los mastocitos patológicos (constitutivamente) activados. De acuerdo con esta posibilidad, estudios previos han demostrado que la línea celular de mastocitos HMC1 produce niveles elevados de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 o CCL2; abreviado del inglés, “monocyte chemoattractant protein-1”), y que los mastocitos activados *in vitro* son capaces de reclutar monocitos e inducirles a producir citocinas inflamatorias, como $\text{TNF}\alpha$ ²⁶¹. De acuerdo con estos resultados, en este trabajo observamos un incremento de los niveles de CCR2 (CD192) expresados en la membrana de los monocitos de pacientes con SM junto a niveles significativamente disminuidos de CCL2 en plasma.

Además del efecto de reclutamiento tisular ejercido por MCP-1/CCL2 sobre poblaciones de células monocíticas de sangre, hoy se conoce que las proteasas liberadas por el mastocito en los tejidos pueden inducir la activación de células epiteliales y con ello, la secreción de CCL19, una molécula quimioatrayente de cDC y pDC²²⁷. Por ello nos planteamos estudiar si al igual que ocurría con el compartimento monocítico, las DC también mostraban una alteración en la distribución de sus subpoblaciones en la sangre de pacientes con SM. En este sentido, observamos un descenso en el recuento de pDC y mDC circulantes, que afectaba de forma especial entre los pacientes con SM, a las subpoblaciones de mDC CD1c⁺, CD1c⁺CD14⁺CD5⁻ y CD141⁺ que paralelamente mostraban además, mayores niveles de expresión de CD192 en su membrana. Estos hallazgos sugieren que, al igual que los iMo y los ncMo, las DC podrían experimentar también un aumento de la migración a tejidos periféricos donde se acumulan los mastocitos patológicos activados.

En conjunto, estos resultados confirman y amplían observaciones previas que indican que los mastocitos clonales, mediante la liberación de proteasas y otros mediadores, podrían inducir alteraciones en el micromedioambiente tumoral en aquellos tejidos donde se acumulan de forma preferente en la SM, como por ejemplo, en la piel o el tracto GI. A nivel cutáneo, los mastocitos patológicos podrían activar los queratinocitos para que éstos produzcan CCL19, además de MCP-1/CCL2, con el consiguiente reclutamiento de distintas poblaciones de monocitos y DC. Curiosamente, entre los pacientes analizados en este trabajo, la disminución del recuento de DC totales, y de sus poblaciones de pDC y mDC era más pronunciada en la ISM y la ASM, respecto a la BMM, mientras que la subpoblación minoritaria de DC Axl identificada recientemente, se encontraba incrementada en sangre, específicamente en este último grupo de pacientes. Aunque en la actualidad, nuestro conocimiento sobre las DC Axl sigue siendo limitado, estudios recientes sugieren que se trata de una población de DC capaz de promover la

proliferación de células T, que se ve incrementada de forma significativa en el foco inflamatorio en tejidos como el pulmón y la piel^{262–265}. De forma global, estos datos junto con nuestros hallazgos, sugieren que las DC Axl podrían desempeñar un papel relevante en pacientes con SM que presentan síntomas graves asociados a activación mastocitaria, manifestaciones clínicas que son características de los pacientes con BMM, asociándose dentro de los pacientes diagnosticados con SM, recuentos más elevados de DC Axl (así como de prácticamente todas las subpoblaciones de DC y monocitos) en sangre, con la existencia de anafilaxia.

En resumen, los resultados relacionados con el primer objetivo de esta tesis doctoral confirman y amplían observaciones previas en la SM, revelando la existencia de una distribución alterada de múltiples subpoblaciones de monocitos y DC circulantes, asociadas a una activación (*in vivo*) de monocitos funcionalmente agotados, que conduciría a un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias en el plasma de estos pacientes. Estos hallazgos apuntan a la existencia de una activación generalizada y mantenida en el tiempo de la inmunidad innata en la SM, aunque con perfiles claramente diferentes en los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad, que podría condicionar el comportamiento clínico de la misma, y contribuir a conocer mejor los mecanismos fisiopatológicos específicos implicados en la heterogeneidad clínica y biológica de la SM.

2. Distribución de las diferentes subpoblaciones de células T, y en especial de las células T CD4⁺, en sangre de pacientes con SM y su posible asociación con el comportamiento clínico de la enfermedad.

Dado que al abordar el primer objetivo que integra esta tesis doctoral, identificamos perfiles alterados en el compartimento de células inmunes innatas de pacientes con SM, que apuntan hacia la existencia de una activación masiva de la respuesta inmunitaria, y teniendo en cuenta el amplio papel inmunomodulador que

ostenta el mastocito^{72,123,134,249,255,266,267}, nuestro siguiente objetivo se centró en determinar si dichas alteraciones inmunitarias se extienden también a la respuesta adaptativa. En ese sentido, hoy sabemos que algunos mediadores mastocitarios que se encuentran elevados en la SM, como la histamina y la triptasa, tienen la capacidad de alterar la función de los linfocitos T en modelos experimentales^{12,267,268}. Además, recientemente se ha descrito la existencia de alteraciones numéricas en células linfoides asociadas a un descenso significativo en sangre del número de células NK y de linfocitos T CD8⁺ circulantes²²⁸. Aunque estos hallazgos están basados en una pequeña cohorte de 20 pacientes con ISM, cabe destacar que la alteración de estas células NK y T CD8⁺ se asociaba además, con manifestaciones clínicas concretas características de pacientes con SM como la existencia de osteoporosis y enfermedades autoinmunes²²⁸. Sin embargo, al limitarse estos estudios exclusivamente a cohortes de pacientes con ISM, sin llegar a profundizar en las distintas subpoblaciones celulares responsables de la alteración global del compartimento de linfocitos T CD8⁺ y NK, queda por dilucidar si, por ejemplo, dichas alteraciones surgen ya en las primeras fases de la enfermedad, si además se mantienen en las formas avanzadas de SM y/o si están relacionadas con una alteración funcional más profunda (y distinta) entre pacientes con formas avanzadas vs no avanzadas de SM.

Con este propósito, nuestro segundo objetivo se centró en el análisis del perfil inmune de células T CD4⁺ en sangre de una serie más amplia aún de pacientes con distintos subtipos diagnósticos de SM, con un foco especial en las subpoblaciones funcionales y madurativas de linfocitos T CD4⁺, en paralelo con las principales poblaciones de linfocitos B, T-citotóxicos y NK. Además, dado que los distintos componentes celulares del sistema inmune tienen un comportamiento dinámico a lo largo de la vida, con el fin de poder corregir diferencias que fueran debidas a la edad, ajustamos los resultados obtenidos en relación con la distribución numérica de las distintas poblaciones celulares detectadas en sangre en valores absolutos (número de células/ μ L), con respecto a la edad

de controles sanos sin antecedentes de alergia, siguiendo estrategias de normalización descritas previamente en la bibliografía²⁶⁹.

Tal como se ha descrito previamente por otros grupos^{227,228}, nuestros resultados confirman la existencia de un descenso significativo del número de células citotóxicas T CD4⁺ y NK en la sangre de pacientes con SM, respecto a adultos sanos de la misma edad. Además, observamos que los recuentos disminuidos de células T citotóxicas encontrados en sangre de pacientes con BMM, ISM y ASM, afectaban a los diferentes compartimentos de células efectoras y de memoria, incluyendo las células de memoria central (CM; abreviado del inglés, “central memory”), memoria transicional (TM; abreviado del inglés, “transitional memory”), las células efectoras tempranas (EE; abreviado del inglés, “early effector”) y TE. No obstante, merece destacar que esta disminución del recuento de células T citotóxicas no parece deberse a una menor producción tímica o medular, ya que en paralelo observamos un aumento de células T CD4⁺ naïve en sangre, asociado a un número anormalmente elevado de células NK en la MO de estos mismos pacientes. En conjunto, estos datos sugieren la existencia de un aumento de la producción y de la migración de células NK y de células T citotóxicas efectoras y de memoria desde la sangre a otros tejidos, que podría estar a su vez relacionado con la activación de las células inmunitarias innatas, descrita previamente en pacientes con SM y discutida ampliamente de forma previa en esta tesis doctoral.

Paralelamente al descenso observado en las células T citotóxicas y NK, el número global de linfocitos T CD4⁺ en sangre de los pacientes con SM estudiados en nuestro trabajo se situaba en el rango de normalidad para su edad. No obstante, un análisis más detallado de las distintas poblaciones funcionales y madurativas de linfocitos T CD4⁺ mostró la existencia de alteraciones importantes en múltiples subpoblaciones funcionales de estas células, reflejadas en un descenso significativo de los linfocitos TCD4⁺ circulantes con fenotipo Th1 (y sus compartimentos de células de CM, TM y TE), Th2 EM y Th22 TE, junto a

cifras anormalmente bajas también de células Tregs de tipo Th1. Estos hallazgos contrastaban con un aumento en sangre del número de células TFH por encima de valores normales, a expensas fundamentalmente de las subpoblaciones de linfocitos TFH naïve, TFH de tipo Treg y TFH tipo Th17.

En conjunto, estos resultados apoyarían la existencia de un mayor reclutamiento de las subpoblaciones de células T CD4⁺ efectoras de tipo Th1, Th2 y Th22 a tejidos periféricos. Dicho reclutamiento podría estar mediado por los niveles incrementados de histamina y de citocinas en plasma/suero²³¹ producidas por los mastocitos y monocitos activados en esos tejidos, y que se ha descrito pueden modular el reclutamiento, activación y funcionalidad de células T^{270–273} y cuyos niveles séricos se encuentran elevados en SM, tal como hemos comentado previamente. Además, se ha descrito que los mastocitos activados pueden secretar múltiples quimiocinas, como CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β) y CCL5 (RANTES), que podrían potenciar, aún más si cabe, el reclutamiento de linfocitos T a los focos de inflamación generados en torno a los mastocitos patológicos activados localmente, por ejemplo, en la piel y/o el tracto gastrointestinal^{274–277}, lo cual contribuiría también a explicar, al menos en parte, nuestros resultados.

Globalmente, nuestros hallazgos apoyarían la existencia en la SM de una alteración, no sólo de la inmunidad innata, sino también de la inmunidad adaptativa, que afectaría tanto a las células T citotóxicas como a los linfocitos T CD4⁺, asociada probablemente a una mayor migración de células Th1 y Th2 desde la sangre a los tejidos periféricos, y a una recirculación incrementada de células TFH de posible origen tisular (e.g. del tejido linfoide) a la sangre. Ante esta posibilidad, nos planteamos a continuación evaluar si estos perfiles de alteración de los linfocitos T eran comunes o no, a pacientes con diferentes subtipos diagnósticos de SM. Con este objetivo, realizamos un análisis multivariante supervisado (análisis canónico) que demostró la existencia de perfiles únicos

de alteración en los pacientes diagnosticados de BMM, ISM y particularmente, de ASM. Así, los pacientes con ASM mostraron un perfil altamente característico, definido por la disminución del recuento en sangre de prácticamente todas las distintas subpoblaciones funcionales de células T efectoras y de memoria analizadas, mientras que en la BMM y la ISM existía un solapamiento significativo entre los perfiles inmunitarios de células T CD4⁺, sólo diferenciables por la existencia de recuentos anormalmente más bajos de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th22 TE y otras poblaciones de células con fenotipo Th2 (o de tipo Th2), entre los pacientes diagnosticados de ISM que presentaban mutación multilineal de *KIT*^{D816V}. Cabe señalar que ambos grupos de pacientes (BMM e ISM con la mutación restringida a mastocitos) mostraron recuentos de células TFH naive y TFH Treg marcadamente elevados en sangre y significativamente más elevados que los observados tanto en sujetos sanos de la misma edad, como en pacientes con ASM. Aunque el verdadero significado e implicaciones de estos hallazgos queda aún por determinar, llama la atención que los perfiles observados entre los pacientes con BMM e ISM son en gran medida similares a los descritos previamente en el asma alérgico o en tumores sólidos, en los que se ha referido la existencia de un aumento selectivo de células TFH en sangre asociado a niveles séricos de IgE total más elevados y un mejor pronóstico, respectivamente^{278–280}. Asimismo, en su conjunto, nuestros resultados sugieren que a pesar de que se hayan descrito progresiones desde BMM a ISM y de ISM a ASM en un pequeño porcentaje de los pacientes^{201,216}, la existencia de estos perfiles inmunes únicos y diferenciales entre pacientes con BMM, ISM y ASM apuntan a que estos podrían representar (tres) entidades distintas con un comportamiento clínico diferente y distintos perfiles de alteraciones inmunitarias subyacentes.

En este sentido, aunque la mutación *KIT*^{D816V} está presente en todos los subgrupos diagnósticos de SM estudiados²⁸¹, y existe de una estrecha relación entre la presencia de la mutación y un fenotipo de mastocito activado²⁸², ni la mutación *KIT*^{D816V} por sí sola, ni la

carga tumoral mastocitaria, explican la gran heterogeneidad de los síntomas y las manifestaciones clínicas observadas en la SM, incluso dentro de un mismo subgrupo diagnóstico. Esta heterogeneidad se ha visto reflejada también más recientemente en la diferente respuesta de los síntomas asociados a la activación mastocitaria (MCA; abreviado del inglés, “mast cell activation”) al tratamiento, (y en especial a fármacos dirigidos a *KIT*^{D816V}, como por ejemplo, midostaurina o avapritinib, en aquellos pacientes con SM indolente vs SM avanzada^{225,283}.

Ante estos hallazgos, nos planteamos además en este trabajo, determinar si los distintos perfiles inmunes de células T encontrados en los pacientes con SM se correlacionaban con los síntomas y otras manifestaciones clínicas de la enfermedad, con un foco especial en aquellos o aquellas manifestaciones que se asocian a MCA. Para ello llevamos a cabo un nuevo análisis multivariante donde correlacionamos la distribución de las distintas subpoblaciones T, y en particular de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, con la presencia vs ausencia de síntomas y de otras manifestaciones clínicas características de la enfermedad.

Entre los resultados derivados de este análisis, llama particularmente la atención la estrecha asociación observada entre un mayor número de linfocitos de tipo Th2 (y sus subpoblaciones CM, TM y EM) y entre los pacientes con ISM y mutación *KIT*^{D816V} restringida al mastocito, en los que presentaban anafilaxia. Además, estas subpoblaciones Th2, junto con las células Tregs de tipo Th2, también contribuían a distinguir, dentro de la ISM aquellos pacientes que presentaban mutación restringida al mastocito y los que mostraban afectación multilineal. Finalmente, entre los pacientes con BMM, la existencia de cifras más elevadas de linfocitos Th2 de CM (vs controles) contribuían a identificar pacientes con historia previa de alergia a veneno de himenóptero (HVA; abreviado del inglés, “hymenoptera venom allergy”). En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de una desregulación de la respuesta inmunitaria de tipo Th2, en la fisiopatología de la anafilaxia y

de otros episodios severos de MCA intensa, tal como descrito previamente por otros autores²⁸⁴⁻²⁸⁶. Así mismo, estos datos, junto con la existencia de niveles plasmáticos elevados de IgE entre aquellos pacientes que presentaban HVA y anafilaxia, apoyarían aún más si cabe, la existencia de una respuesta inmunitaria de tipo Th2 desregulada subyacente a ambos grupos de pacientes. Curiosamente, nuestros resultados muestran además, la existencia de una asociación entre el aumento del recuento de células Th2 CM en pacientes con BMM y ISM con *KIT*^{D816V} restringida al mastocito y la presencia de antecedentes de infección previa por *H. pylori*, en línea con hallazgos recientes de otros autores²⁸⁷ que demuestran una respuesta sesgada de tipo Th2 y Treg, asociada a la persistencia de *H. pylori*. En cambio, aquellos pacientes que presentaban antecedentes de otras infecciones bacterianas/virales, tenían valores relativamente más disminuidos de células Th1 TE, asociados a un mayor descenso de células NK (entre los casos de BMM) o un menor número de linfocitos Th22 ET (en pacientes con ISM con *KIT*^{D816V} restringido al mastocito), lo que apoyaría la existencia de diferentes perfiles inmunitarios T en pacientes con infecciones previas por *H. pylori* vs otras infecciones bacterianas/virales recurrentes o graves. En ambos casos, estos hallazgos podrían estar relacionados con el aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa descrito en pacientes con ISM²⁴³, debido a la activación crónica a nivel local de los mastocitos patológicos, que afectaría en última instancia de forma indirecta también, al micromedioambiente tumoral y a los distintos componentes de la inmunidad adaptativa.

Mención especial merece la subpoblación de células Th22 TE presente en la sangre de pacientes con SM, ya que en nuestra serie constituía una de las poblaciones de células T CD4⁺ más relevantes a la hora de discriminar entre BMM y los demás subtipos diagnósticos de la enfermedad, y entre pacientes con ISM y ASM. Aunque las células Th22 constituyen una subpoblación de células T CD4⁺ identificada de forma relativamente reciente, en la actualidad existe un gran número de estudios que demuestran que estas

células desempeñan un papel fundamental en la barrera cutánea y en la patogénesis de enfermedades de la piel, sobre todo a través de la secreción de IL-22²⁸⁸⁻²⁹⁰. En este sentido, nuestros resultados mostraron una disminución significativa de las células Th22 TE (y Treg con fenotipo Th22) circulantes en sangre (asociada a una tendencia hacia niveles más bajos de IL-22 en plasma) entre los pacientes diagnosticados de ISM, que de forma casi universal presentan afectación cutánea, contrariamente a lo observado entre la BMM, en la que habitualmente los pacientes no presentan afectación de la piel, y en los que el recuento de linfocitos Th22 y los niveles plasmáticos de IL-22 eran normales. Estos hallazgos sugieren que a diferencia de lo que ocurre en la BMM, en la ISM podría existir un mayor reclutamiento de células Th22 TE desde la sangre a tejidos como la piel, donde se acumulan mastocitos patológicos y activados. En este contexto, cabe mencionar que entre nuestros pacientes diagnosticados de SM que tenían genotipo HaT⁺, observamos también un mayor recuento de células Th22 EM y Th22 ET en sangre con respecto a aquellos que eran HaT⁻, sugiriendo que el número de copias del gen de la triptasa, y por ende los niveles de sBT, podrían actuar como un factor protector de la afectación cutánea asociada a la migración tisular de linfocitos Th22, al menos entre pacientes con formas indolentes de SM. De acuerdo con esta hipótesis, estudios recientes han descrito una mayor frecuencia del genotipo HaT⁺ en pacientes con BMM (22%) vs ISM (16%)¹⁶⁵, aunque el genotipo HaT⁺ se ha asociado también con una mayor frecuencia por ejemplo, de urticaria crónica o episódica, flushing, prurito o síntomas de otros trastornos cutáneos inflamatorios subyacentes, como la dermatitis atópica y la psoriasis²⁹¹. Independientemente de la posible asociación existente entre el genotipo HaT⁺, el número de linfocitos Th22 en sangre y las manifestaciones y síntomas cutáneos antes referidos, cabe señalar que entre los pacientes con SM de nuestra serie, la presencia de HaT⁺ se relacionó también con cifras más elevadas de células Th17 (y sus subpoblaciones de células EM y TE) y de linfocitos T Th1/Th17 (y sus subpoblaciones de células de CM y EM), respecto a las observadas en

pacientes H α T⁻, lo cual reforzaría la posible implicación de H α T⁺, y por ende de la triptasa- α , en la polarización de linfocitos T hacia un perfil inflamatorio de tipo Th17 y Th22.

Por otra parte, la existencia de un desequilibrio numérico entre las células Th17 y Tregs, podría tener un papel relevante también en la patogénesis de la enfermedad (inflamatoria) ósea²⁹² que se observa preferencialmente en las formas iniciales de SM. En consonancia con esta hipótesis, nuestros resultados revelaron una disminución en sangre de diferentes subpoblaciones de células Tregs tales como las células Tregs naive y Tregs tipo Th2 y tipo Th17, entre pacientes con SM, particularmente entre los que presentaban ASM. Además, el aumento de los niveles plasmáticos de IL-17A, IL-17F e IL-2 observados en este trabajo se asociaron de forma específica en la SM con la presencia de osteoporosis. En la actualidad, es bien conocido que las células Th17 producen citoquinas proinflamatorias que, como IL-17^a y la IL-17F, actúan como potentes inductores de la generación y activación de los osteoclastos, un mecanismo patogénico clave en la osteoporosis²⁹². A su vez, las células Tregs actúan como células antiinflamatorias capaces de mantener la tolerancia a autoantígenos, a través de su efecto inhibitor sobre otras células T efectoras²⁹²⁻²⁹⁴. Si trasladamos estos hallazgos a la interpretación de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, y que reflejan una disminución del recuento total de células Tregs y/o Th17-like Tregs, en paralelo con el aumento de los niveles plasmáticos de IL-17, podríamos considerar la posible implicación de estas células T en el desarrollo de la osteoporosis en pacientes con SM. En ese sentido, se ha descrito previamente que la triptasa soluble y determinadas citocinas como el IFN- γ , la IL-1 β y la IL-6, podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedad ósea en pacientes con SM, los cuales muestran a su vez, perfiles diferenciales de citoquinas proinflamatorias/osteoclastogénicas e inmunosupresoras en plasma, con niveles más bajos de IFN- γ , potencialmente relacionados con la alteración de los perfiles inmunitarios T y NK descritos en este trabajo¹⁸⁷.

En resumen, el análisis de la distribución de las diferentes subpoblaciones de células T y NK en sangre de pacientes con SM confirma y amplía hallazgos previos que apuntan hacia la existencia de una profunda desregulación de los compartimentos celulares T CD4⁺, T CD4⁻ y NK en estos pacientes, asociada a diferentes perfiles de alteración inmunitaria en los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad. Además, en este trabajo apuntamos por primera vez la posibilidad de que exista una estrecha asociación entre esos perfiles inmunes de células T/NK alterados de forma característica en los distintos subtipos diagnósticos de SM, y las manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad, especialmente aquellas que se asocian a MCA, particularmente entre pacientes diagnosticados de BMM y ISM con la mutación de *KIT*^{D816V} restringida al mastocito.

3. Distribución de linfocitos B, PC y niveles plasmáticos de anticuerpos en la SM y perfiles de alteración de la respuesta humoral en los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad.

Ante la demostración en nuestro trabajo de la existencia de alteraciones tanto en las células de la inmunidad innata, como en los linfocitos T y NK de pacientes con SM, junto a la asociación existente entre los perfiles alterados de linfocitos T CD4⁺ y distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad, como tercer objetivo de este trabajo, decidimos evaluar la distribución en sangre de pacientes con SM de las distintas subpoblaciones de linfocitos B y de PC productoras de anticuerpos, así como de los niveles plasmáticos de anticuerpos de diferentes isotipos presentes en estos enfermos. Nuestro interés se centraba en poder determinar la posible existencia también de distintos perfiles inmunes humorales alterados en pacientes con distintos subtipos diagnósticos de la SM.

De forma global, tanto en los estudios previos como en este trabajo doctoral, se ha demostrado que, el número total de células B circulantes en sangre y presentes en la

MO de pacientes con SM se sitúa en niveles normales, al igual que ocurre con los niveles globales de inmunoglobulinas en plasma^{228,229}. Aun así, con base en las evidencias descritas anteriormente en relación con las alteraciones de las células T presentes en estos pacientes, decidimos profundizar en este tercer objetivo, en el estudio de los distintos compartimentos madurativos y de células efectoras B, incluidas las PC circulantes.

En conjunto, nuestros resultados confirman datos previos que demuestran la existencia de cifras normales de linfocitos B en sangre y MO de pacientes con SM, junto a niveles normales (globales) de Ig en plasma, respecto a adultos sanos del mismo rango de edad. Sin embargo, un análisis más detallado de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B y PC circulantes mostró perfiles alterados, asociados de forma característica a diferentes subtipos diagnósticos de la enfermedad. Así, observamos un aumento progresivo del recuento, tanto de linfocitos B inmaduros como de linfocitos B naive CD5⁺, en paralelo con una disminución muy marcada del número de PC -incluyendo las PC que expresaban todas las subclases de cadenas pesadas de Ig (IgH) y en todos los estadios madurativos- desde los pacientes con BMM hasta la ISM y la ASM. En conjunto, estos hallazgos sugieren la existencia en la SM, de una mayor producción (y liberación a la sangre desde MO) de linfocitos B inmaduros, así como de los estadios más tempranos de linfocitos B naive (CD5⁺), que sería progresivamente más prominente, en la ISM y la ASM, respecto a la BMM. De acuerdo con esta hipótesis, el análisis del compartimento de células B de MO, confirmó el aumento de la producción de linfocitos B inmaduros a nivel medular en pacientes con SM. Además, este incremento de la producción de linfocitos B a nivel medular se vio reflejado también, en un aumento de la ratio entre el número de linfocitos B inmaduros y el de células mieloides producidas en la MO, lo que resulta cuanto poco sorprendente, si tenemos en cuenta que contrasta con la disminución de la producción de linfocitos B observada en otros trastornos mieloproliferativos como la leucemia mieloide

crónica o la leucemia mielomonocítica crónica, los síndromes mielodisplásicos y la leucemia mieloblástica aguda²⁹⁵⁻²⁹⁸.

A pesar de esta mayor producción y liberación a sangre de linfocitos B inmaduros observada en nuestra serie, esto no se traducía en un mayor número en sangre de linfocitos B naive en sus estadios madurativos más avanzados, caracterizados por la ausencia de la expresión de la molécula CD5⁻, lo que sugiere la existencia de una tasa más acelerada de migración de los linfocitos B recién producidos a los tejidos (por ejemplo, linfoides). En consonancia con esta última posibilidad, los pacientes de nuestra cohorte que presentaban SM asociada a organomegalias como por ejemplo, linfadenopatías y hepatomegalia, o que mostraban afectación de tejidos periféricos por ejemplo debido a infección por *H. Pylori* u otras infecciones graves/recurrentes, tenían cifras significativamente más elevadas en sangre de linfocitos B inmaduros y naive CD5⁺ con cifras normales de los linfocitos B naive más maduros CD5⁻, reflejo probablemente de una mayor producción de células B en MO asociada a una mayor migración (y acumulación) de estos últimos a órganos linfoides secundarios, incluyendo el tejido periférico linfoide asociado a mucosas (MALT; abreviado del inglés, “mucosa-associated lymphoid tissue”).

En contraposición con el incremento observado en las poblaciones de células B pre-centro germinal, el recuento global de PC totales en sangre y de sus distintos subtipos, constituyó una característica distintiva de la SM, independiente del subtipo diagnóstico de la misma, sin que esta disminución se reflejara en MO, donde el porcentaje de PC se situaba en valores normales. Actualmente sabemos que las PC recién producidas en los tejidos linfoides, como los ganglios linfáticos, migran a través de la sangre a la MO y a otros tejidos periféricos, donde llevarán a cabo su función como células productoras y secretoras de anticuerpos de diferentes isotipos²⁹⁹. Estos anticuerpos vuelven en parte a la circulación sanguínea siendo detectables y cuantificables en el plasma (y otros líquidos corporales como el líquido cefalorraquídeo), o son eliminados en diferentes secreciones

corporales^{300,301}. Sin embargo, hoy sabemos que mientras la mayoría de las PC generadas en los ganglios linfáticos o en el bazo son PC productoras de anticuerpos de tipo IgG y migran predominantemente a la MO, en el tejido linfoide asociado a mucosas predomina la producción de IgA en respuesta a un amplio espectro de antígenos presentes, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal y respiratorio, sin que la mayoría de estas últimas PC del MALT recirculen por vía sanguínea^{300,301}. Teniendo en cuenta estos hallazgos, nuestros resultados sugieren que la disminución del número de PC circulantes en sangre de pacientes con SM podría no estar directamente relacionada con una mayor tasa de migración de estas PC a la MO, sino más bien con una redistribución de la producción de las mismas hacia los tejidos periféricos (e.g., MALT). Esto sería debido a la migración incrementada de los linfocitos B naive a esos tejidos y una mayor producción de PC en los mismos inducida, por ejemplo, por el incremento de la permeabilidad de la mucosa gastrointestinal asociada a la activación de mastocitos patológicos a nivel local, capaz aun así, de mantener los niveles globales de anticuerpos en el plasma dentro de valores normales. De acuerdo con esta hipótesis, aquellos pacientes de nuestra cohorte que presentaban síntomas típicos de la enfermedad asociados con la liberación de mediadores del mastocito, como por ejemplo prurito y flushing, mostraban niveles significativamente inferiores de PC productoras de IgM⁺, IgG₁₋₃⁺ e IgA₁⁺ en sangre. De forma similar, los pacientes con SM que presentaban organomegalias (esplenomegalia y hepatomegalia) e infecciones bacterianas/virales recurrentes, incluida la infección por *H. Pylori*, mostraban niveles inferiores de PC productoras de IgD⁺, IgG₂⁺ e IgA₁₋₂⁺ y de IgM⁺ e IgG₁₋₂⁺, respectivamente, sugiriendo una menor tasa de respuestas primarias y secundarias en estos subgrupos de pacientes, respecto a aquellos sujetos que no presentaban estas características clínicas. En su conjunto, estos datos, unidos a la constatación de la existencia de niveles plasmáticos normales de Igs totales, podrían apoyar la existencia en estos pacientes de un desplazamiento de la respuesta inmune humoral, desde los órganos

linfoides centrales a los tejidos periféricos (e.g., MALT), asociado a un incremento a nivel local de la producción de anticuerpos por parte de las PC, capaz de mantener niveles normales de Igs en plasma, aunque probablemente a expensas de un perfil isotópico distinto de esas mismas Igs, tal como ocurría en nuestros pacientes, y discutimos más adelante en mayor detalle.

En línea con esta hipótesis, recientemente se ha puesto de manifiesto que, aunque la infiltración de mastocitos en tejidos periféricos como la piel y el tracto gastrointestinal es un hallazgo frecuente en la SM, no existe una correlación directa entre sus niveles (reflejados por ejemplo en la VAF de la mutación *KIT*^{D816V} a nivel local, los niveles séricos de triptasa o la carga mastocitaria observada a nivel histológico en biopsias gastrointestinales) y la frecuencia y gravedad de los síntomas gastrointestinales²⁴⁵. En conjunto, estos datos apoyarían con más fuerza aún, la noción de que la disminución del recuento de PC en la sangre de pacientes con SM que presentan afectación de otros órganos (por ejemplo de la piel y/o del tracto gastrointestinal) podría deberse a un aumento de la migración y/o de la producción local de PC en esos tejidos, debida al incremento de la permeabilidad de la barrera cutánea o mucosa, asociada a una mayor exposición a agentes microbianos/alérgenos inducida a nivel local por una liberación incrementada de mediadores por parte de los mastocitos patológicos que han infiltrado ese tejido. Si esta hipótesis fuera cierta, podría producirse un aumento local de la producción de anticuerpos aunque seguramente con sesgos isotípicos, mientras los niveles de Ig en plasma se mantendría, globalmente, en valores normales.

De acuerdo con esta posibilidad, y a pesar de que los valores totales de Ig plasmática en pacientes con SM eran comparables a los observados en el grupo control, encontramos un perfil isotópico alterado con aumento global de los anticuerpos de tipo IgM e IgD, particularmente entre los pacientes diagnosticados de ISM y ASM por un lado, y de BMM por otra parte, respectivamente. La constatación de la existencia de niveles

plasmáticos elevados de IgM, y en menor medida también de IgD, apoyarían la existencia de un incremento de la tasa de respuestas primarias de células B a nuevos antígenos (a nivel periférico) en la SM, que podría estar relacionado con el referido incremento de la permeabilidad de las barreras mucosas a antígenos externos y alérgenos y una mayor activación de la respuesta adaptativa humoral en la SM. Sin embargo, cabe señalar que el aumento de los niveles plasmáticos de IgM e IgD circulantes en la ISM y la BMM, respectivamente, se asociaron con perfiles distintos para los niveles plasmáticos de Igs de los demás isotipos. Así, los pacientes con BMM mostraban niveles plasmáticos de IgE significativamente elevados, junto con cifras reducidas de IgG, e IgA normal, lo cual se traducía en cocientes IgE/IgG e IgE/IgA incrementados respecto a sujetos sanos y a los demás grupos de pacientes. En contraposición, los pacientes con ISM mostraban niveles plasmáticos normales de IgE e IgG, paralelamente a valores elevados de IgM e IgD, traduciendo estos hallazgos en una ratio IgG+IgA/IgM disminuida, mientras que en la ASM se observó una tendencia hacia un descenso de los niveles plasmáticos de IgE junto con valores elevados de IgM, y cifras normales de IgG e IgA. Estos hallazgos parecen apuntar a un aumento de las respuestas inmunitarias IgE de tipo II en la BMM, en consonancia con la mayor frecuencia de reacciones de hipersensibilidad observadas en este grupo de pacientes, de los que aproximadamente el 90% presentaban anafilaxia asociada en la mitad de los casos, con HVA mediada por IgE^{191,302}. Mientras tanto, los pacientes con ISM, y especialmente los diagnosticados de ASM, mostraban una tendencia hacia respuestas inmunitarias tipo I asociadas a la producción de anticuerpos de tipo IgM/IgG, pero no IgE, típicamente observadas frente a bacterias comensales y otros microbios capaces de sobrevivir y penetrar las barreras mucosas³⁰³. Independientemente del origen de estos diferentes perfiles de respuesta humoral observados en pacientes con distintos subtipos diagnósticos de SM, nuestros resultados sugieren que la heterogeneidad de los síntomas asociados a la liberación de mediadores mastocitarios en pacientes con

SM, no puede explicarse exclusivamente por la presencia de mastocitos mutados *KIT*^{D816V}-positivos, ni por la carga mastocitaria asociada a los mismos^{245,304}, apuntando hacia un papel muy relevante de otras células inmunitarias, asociado a distintos perfiles de respuesta inmunitaria T y humoral a nivel sistémico, y que probablemente deriven de los distintos perfiles de la respuesta inmune local a nivel periférico

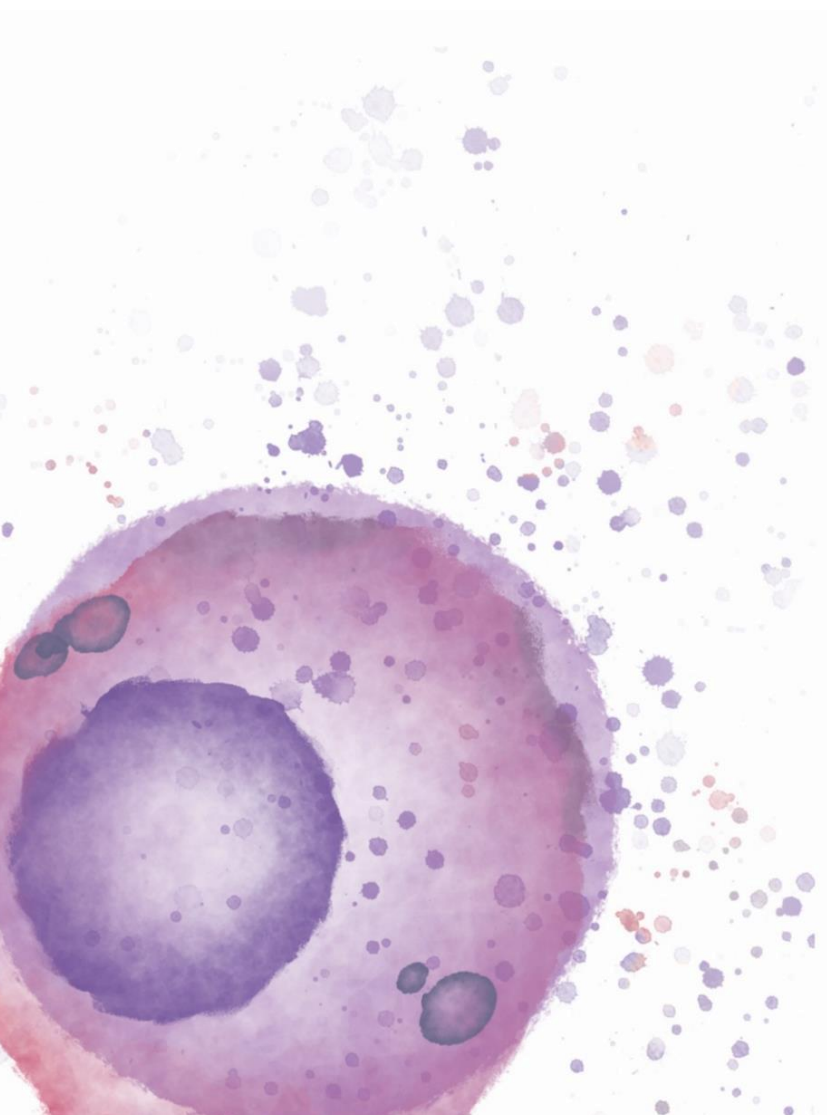
De acuerdo con esta hipótesis y con nuestros resultados, estudios recientes han demostrado un aumento a nivel sérico/plasmático de múltiples marcadores que reflejan una permeabilidad alterada de las mucosas en pacientes con SM, que además se asocian también con algunas manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad²⁴³. Cabe señalar también que, mediadores liberados por el mastocito como la histamina, TNF α , IFN γ o la IL-1 β y otras citoquinas producidas a nivel local, han demostrado tener la capacidad de alterar notablemente la barrera mucosa normal, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal, induciendo un aumento de la permeabilidad de la misma²⁴⁴. Esta alteración de la permeabilidad mucosa puede afectar sustancialmente el tráfico de antígenos a nivel local, modulando a su vez, las estrechas interacciones desarrolladas entre el microbioma intestinal y las respuestas inmunitarias locales (formado principalmente por linfocitos citotóxicos y PC IgA⁺) y sistémicas^{305,306}.

Aunque nuestros resultados en su conjunto sugieren que los diferentes perfiles inmunes observados en los distintos subtipos diagnósticos de SM, podrían ser debidos a una alteración del tráfico de antígenos a nivel de las mucosas en general, y del tejido MALT en particular, potencialmente desencadenado por una activación crónica del mastocito mutado que infiltra esos tejidos asociada a la liberación local de mediadores mastocitarios, estos podrían verse modulados también por la actuación de otras células del sistema inmune y por las propias células epiteliales. En cualquier caso, estas alteraciones podrían conducir en última instancia a un mayor reclutamiento local de linfocitos T efectores y de linfocitos B naïve, asociado a una mayor producción local de PC

secretoras de anticuerpos de diferentes isotipos dependiente del predominio de estímulos antigénicos frente a alérgenos vs microbios, y del potencial oxidativo por parte de las células epiteliales (e.g. vía DUOX1 o DUOX2) de dichos antígenos, a la hora de inducir respuestas inmunitarias de tipo I vs o de tipo II³⁰⁷. Para conocer mejor los mecanismos concretos implicados en la inmunidad a nivel de las mucosas en la SM, son necesarios nuevos estudios *in vitro*, en modelos animales y/o en pacientes en los que se disponga de muestras de esos tejidos.

A modo de resumen, podríamos concluir en relación con el tercer objetivo de esta tesis doctoral que, nuestros resultados confirman la existencia de una importante alteración tanto de los compartimentos de células B y de PC presentes en la sangre de pacientes con SM, como de los perfiles de anticuerpos detectables en plasma, con distintos perfiles que varían según el subtipo diagnóstico de la enfermedad, si bien de momento, seguimos sin conocer los mecanismos fisiopatológicos subyacentes implicados en las alteraciones de la inmunidad humoral descritas en gran medida por primera vez en esta tesis doctoral.

Conclusiones



En relación con el primer objetivo de este trabajo doctoral, centrado en conocer la distribución y el estado funcional de las diferentes subpoblaciones de monocitos y células dendríticas presentes en sangre de pacientes con SM, con el fin de definir posibles patrones de alteración de las células mieloides innatas en los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad:

1. Los monocitos circulantes de pacientes con SM están constitutivamente activados y funcionalmente agotados contribuyendo al menos en parte, al aumento de los niveles en plasma de una amplia variedad de citoquinas inflamatorias con efectos pleiotrópicos sobre otras células y tejidos del micromedioambiente tumoral. En conjunto, estos hallazgos ponen de manifiesto la existencia de una activación crónica de la inmunidad innata en la SM, que sería transversal a los distintos subtipos diagnósticos de la enfermedad.
2. La alteración funcional de los monocitos circulantes en sangre de pacientes con SM se asocia a una redistribución de sus subpoblaciones, consistente en una disminución de los monocitos intermedios y las subpoblaciones más maduras de monocitos no clásicos en la SM en general, y a un mayor recuento de monocitos recién producidos CD62L⁺ en la ASM en particular, lo cual podría reflejar una migración incrementada de las subpoblaciones de monocitos más diferenciadas desde la sangre a los tejidos periféricos, asociada a una mayor producción medular de cMo en las formas más avanzadas de la enfermedad.
3. Los pacientes con SM muestran además, perfiles distintos de alteración de la distribución de los diferentes compartimentos de células dendríticas circulantes, asociados a un incremento del número de DC Axl⁺ en la BMM y un descenso progresivamente más acentuado de las pDC y de distintas subpoblaciones de mDC, desde la BMM a la ISM y la ASM. Estos hallazgos confirman la existencia en la SM de alteraciones estructurales importantes en la inmunidad innata,

sugiriendo que estas puedan afectar además a la respuesta adaptativa, y en especial al compartimento de linfocitos T, con posibles implicaciones clínicas.

En relación con el segundo objetivo dirigido a analizar la distribución de las diferentes subpoblaciones de células T circulantes en sangre de pacientes con SM, con especial énfasis en las células T CD4⁺, y su impacto en el comportamiento y las manifestaciones clínicas de la enfermedad:

4. Los pacientes con SM presentan una disminución significativa del número de células T CD8⁺ citotóxicas y NK en sangre, asociada a un descenso de algunas subpoblaciones efectoras de linfocitos T CD4⁺ de tipo Th1, Th2 y Tregs Th1, y un aumento significativo de células naive T CD4⁺ y linfocitos T CD4⁺ TFH. Estos hallazgos parecen reflejar una mayor producción de linfocitos T, asociada a una mayor migración desde la sangre a tejidos periféricos de algunos de los compartimentos de células T citotóxicas, NK, y T CD4⁺ efectoras, presumiblemente debidos a una mayor permeabilidad de las barreras cutánea y/o mucosa.
5. Los pacientes con ASM mostraron una disminución generalizada de múltiples subpoblaciones de células T, asociada a un ligero aumento de linfocitos naive TCD4⁺, mientras de los pacientes con BMM e ISM exhibían un aumento de distintas subpoblaciones de linfocitos TFH, incluidas las células TFH naive, reflejando la existencia de diferentes perfiles de respuesta inmunitaria adaptativa en los distintos subtipos diagnósticos de SM.
6. La asociación de un genotipo HLA-B*57:01 con SM se correlacionó con un aumento del recuento en sangre de células T proinflamatorias Th17, Th1/Th17 y Th22, sugiriendo por primera vez, la posible implicación de este rasgo genético asociado

a niveles más elevados de sBT, en los perfiles de alteración inmune característicos de esta enfermedad, con posibles implicaciones clínicas.

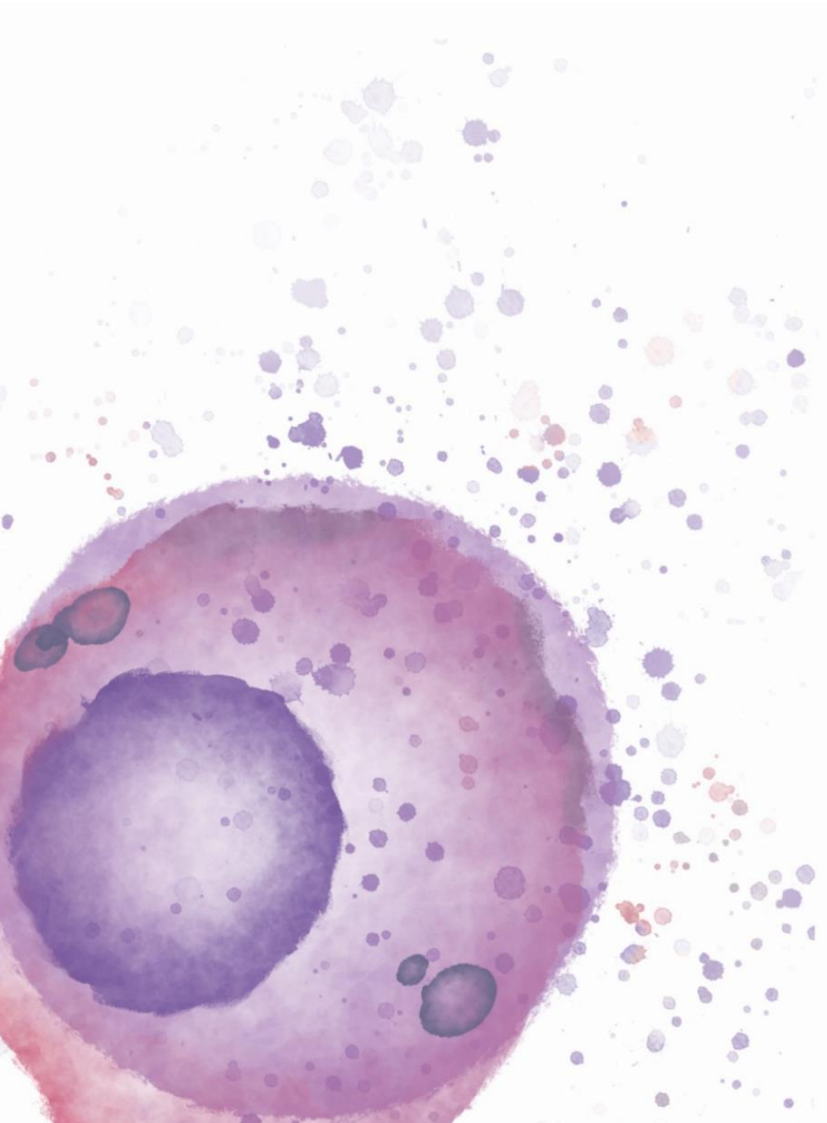
7. Al contrario de lo que ocurría en la ASM, el patrón de distribución de las distintas subpoblaciones de células T circulantes en sangre de pacientes con BMM e ISM con la mutación de *KIT*^{D816V} restringida al mastocito, se asoció con distintos perfiles de síntomas y manifestaciones clínicas de la enfermedad, como son la presencia de anafilaxia, HVA, alteraciones óseas y síntomas asociados a la liberación de mediadores mastocitarios. Estos resultados ponen de manifiesto el posible papel de la inmunidad adaptativa como modulador del comportamiento clínico de la enfermedad, en las formas iniciales y de menor carga tumoral de SM.

En relación con el tercer objetivo de esta tesis doctoral, relacionado con el estudio de la distribución de los linfocitos B, las PC y los niveles plasmáticos de los distintos isotipos de anticuerpos, en pacientes con distintos subtipos diagnósticos de SM:

8. Los pacientes con SM muestran un incremento de la producción en MO y de la liberación a sangre, de linfocitos B inmaduros y linfocitos B naive CD5⁺, asociado a un descenso generalizado y muy pronunciado de múltiples subpoblaciones de PC circulantes, y valores normales de Igs totales en plasma, lo cual sugiere una migración incrementada de linfocitos B naive a tejidos periféricos, asociado a un desplazamiento de la respuesta humoral desde los órganos linfoides centrales a dichos tejidos.
9. El perfil de alteración de la respuesta humoral en los pacientes con SM difiere según el subtipo diagnóstico de la enfermedad, observándose un aumento de los niveles de IgE e IgD, junto a un descenso en los niveles de IgG en plasma en la

BMM, que contrasta con el aumento de los valores plasmáticos de IgM de forma aislada o junto a la IgD en los pacientes diagnosticados de ASM e ISM, respectivamente. En su conjunto, estos resultados podrían reflejar la existencia de una desregulación en el tráfico de antígenos asociado a un aumento de la permeabilidad a nivel de las mucosas, potencialmente relacionados con una mayor liberación de mediadores asociados a la activación constitutiva de mastocitos patológicos a nivel local; quedan por conocer los mecanismos concretos responsables de estos perfiles diferenciales de la respuesta humoral observados en la BMM vs ISM vs ASM.

Referencias bibliográficas



1. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol*. 2003;123(1):19-21.
2. Yong LCJ. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Exp Toxicol Pathol*. 1997;49(6):409-424.
3. Kitamura Y, Go A, Hatanaka K. Decrease of Mast Cells in W/W^v Mice and Their Increase by Bone Marrow Transplantation. *Blood*. 1978;52(2):447-452.
4. Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;58(3):342-365.
5. Escribano L, Garcia Montero AC, Núñez 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.
6. Hallgren J, Gurish MF. Mast cell progenitor trafficking and maturation. *Adv Exp Med Biol*. 2011;716:14-28.
7. da Silva EZM, Jamur MC, Oliver C. Mast Cell Function: A New Vision of an old Cell. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):698-738.
8. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast cell: A multi-functional master cell. *Front Immunol*. 2016;6:620.
9. Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol*. 2011;32(10):478-485.
10. Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, et al. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci*. 2001;6: D1109-D1127.
11. Kanagaratham C, El Ansari YS, Lewis OL, Oettgen HC. IgE and IgG Antibodies as Regulators of Mast Cell and Basophil Functions in Food Allergy. *Front Immunol*. 2020;11.
12. Gri G, Frossi B, D'Inca F, et al. Mast cell: An emerging partner in immune interaction. *Front Immunol*. 2012;3:120
13. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):478-494.
14. Vukman K V., Försonits A, Oszvald Á, Tóth E, Buzás EI. Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;67:65-73.
15. Castells M. Mast Cell Mediators in Allergic Inflammation and Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):465-485.
16. Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 2011;31(6):475-530.
17. Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB. Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;303(1):300-307.

-
18. Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(2):615-620.
 19. Atiakshin D, Buchwalow I, Tiemann M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. *Histochem Cell Biol.* 2019;152(4):253-269.
 20. Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol.* 1987;138(8):2611-2615.
 21. Pejler G, Åbrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast Cell Proteases. *Adv Immunol.* 2007;95:167-255.
 22. Pallaoro M, Fejzo MS, Shayesteh L, Blount JL, Caughey GH. Characterization of Genes Encoding Known and Novel Human Mast Cell Tryptases on Chromosome 16p13.3. *J Biol Chem.* 1999; 274(6):3355-3362.
 23. Miller JS, Westin EH, Schwartz LB. Cloning and characterization of complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1188-1195.
 24. Caughey GH, Raymond WW, Blount JL, et al. Characterization of Human γ -Tryptases, Novel Members of the Chromosome 16p Mast Cell Tryptase and Proctasin Gene Families. *J Immunol.* 2000;164(12):6566-6575.
 25. Miller JS, Moxley G, Schwartz LB. Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest.* 1990;86(3):864-870.
 26. Lyons JJ. Hereditary Alpha Trypsinemia: Genotyping and Associated Clinical Features. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2018;38(3):483-495.
 27. Sommerhoff C, Schaschke N. Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story. *Curr Pharm Des.* 2007;13(3):313-332.
 28. Cairns JA. Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for the treatment of asthma and inflammatory disorders. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(1):55-66.
 29. Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase: An inflammatory mediator. *FEBS J.* 2006;273(9):1871-1895.
 30. Caughey GH. Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(6):1411-1414.
 31. Hellman L, Akula S, Fu Z, Wernersson S. Mast Cell and Basophil Granule Proteases - In Vivo Targets and Function. *Front Immunol.* 2022;13:918305.
 32. Suárez Vázquez TA, López López N, Salinas Carmona MC. MASTER cell: chief immune modulator and inducer of antimicrobial immune response. *Front Immunol.* 2024; 15:1360296.
 33. McNeil HP, Adachi R, Stevens RL. Mast cell-restricted tryptases: Structure and function in inflammation and pathogen defense. *J Biol Chem.* 2007;282(29):20785-20789.
 34. McLachlan JB, Shelburne CP, Hart JP, et al. Mast cell activators: A new class of highly effective vaccine adjuvants. *Nat Med.* 2008;14(5):536-541.

35. Heutinck KM, ten Berge IJM, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol*. 2010;47(11-12):1943-1955.
36. Froogh G, Pinto JT, Le Y, et al. Chymase-dependent production of angiotensin II: an old enzyme in old hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(2):H223-H231.
37. Urata H, Hoffmann S, Ganten D. Tissue angiotensin II system in the human heart. *Eur Heart J*. 1994;15(SUPPL. D):68-78.
38. Pejler G, Knight SD, Henningsson F, Wernersson S. Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A. *Trends Immunol*. 2009;30(8):401-408.
39. Ahmad S, Wright KN, Sun X, Groban L, Ferrario CM. Mast cell peptidases (carboxypeptidase A and chymase)-mediated hydrolysis of human angiotensin-(1-12) substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;518(4):651-656.
40. Cole KR, Kumar S, Le Trong H, Woodbury RG, Walsh KA, Neurath H. Rat mast cell carboxypeptidase: amino acid sequence and evidence of enzyme activity within mast cell granules. *Biochemistry*. 1991;30(3):648-655.
41. Woolhiser MR, Brockow K, Metcalfe DD. Activation of human mast cells by aggregated IgG through FcγRI: Additive effects of C3a. *Clin Immunol*. 2004;110(2):172-180.
42. Humphries DE, Wong GW, Friend DS, et al. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*. 1999;400(6746):769-772.
43. Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost*. 2020;18(12):3142-3153.
44. Nugent MA, Iozzo R V. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32(2):115-120.
45. Berenbaum F, Humbert L, Bereziat G, Thirion S. Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(16):13680-13687.
46. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001;294(5548):1871-1875.
47. Weller CL, Collington SJ, Hartnell A, et al. Chemotactic action of prostaglandin E2 on mouse mast cells acting via the PGE2 receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11712-11717.
48. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2005;6(2):135-142.
49. Malaviya R, Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol*. 2000;67(6):841-846.
50. Carlos D, Machado ER, de Paula L, et al. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(4):319-326.
51. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282(1):121-150.

-
52. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):787-799.
 53. Dileepan KN, Raveendran V V., Sharma R, et al. Mast cell-mediated immune regulation in health and disease. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10: 1213320.
 54. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*. 2002;38 Suppl 5:S3-S10.
 55. Sheikh E, Tran T, Vranic S, Levy A, Bonfil RD. Role and significance of c-KIT receptor tyrosine kinase in cancer: A review. *Bosn J Basic Med Sci*. 2022;22(5):683-698.
 56. Abdellateif MS, Bayoumi AK, Mohammed MA. c-Kit Receptors as a Therapeutic Target in Cancer: Current Insights. *Onco Targets Ther*. 2023;16:785-799.
 57. Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA, Spritz RA. Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene*. 1992;7(11):2207-2217.
 58. Vandenbark GR, DeCastro CM, Taylor H, Dew-Knight S, Kaufman RE. Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene*. 1992;7(7):1259-1266.
 59. Sattler M, Salgia R. Targeting c-Kit mutations: Basic science to novel therapies. *Leuk Res*. 2004;28 Suppl 1:11-20.
 60. Zsebo KM, Williams DA, Geissler EN, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*. 1990;63(1):213-224.
 61. Babaei MA, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2443-2459.
 62. Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1619-1649.
 63. Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(23):2924-2931.
 64. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermarck B, Heldin CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J*. 1991;10(13):4121-4128.
 65. Ali S, Ali S. Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene*. 2007;401(1-2):38-45.
 66. Blank U, Huang H, Kawakami T. The high affinity IgE receptor: a signaling update. *Curr Opin Immunol*. 2021;72:51-58.
 67. Nagata Y, Suzuki R. FcεRI: A Master Regulator of Mast Cell Functions. *Cells*. 2022;11(4).
 68. Shin JS, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(12):2349-2360.
 69. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:931-972.

70. McDonnell JM, Dhaliwal B, Sutton BJ, Gould HJ. IgE, IgE Receptors and Anti-IgE Biologics: Protein Structures and Mechanisms of Action. *Annu Rev Immunol*. 2023;41:255-275.
71. Jain R, Tikoo S, Weninger W. Mast cell granules: Modulating adaptive immune response remotely. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(5):1731-1733.
72. Cardamone C, Parente R, Feo G De, Triggiani M. Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. *Immunol Lett*. 2016;178:10-14.
73. Mantovani A, Garlanda C. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *N Engl J Med*. 2023;388(5):439-452.
74. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-353.
75. Abraham SN, St. John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):440-452.
76. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125 Suppl 2:S3-23.
77. Rio P, Caldarelli M, Chiantore M, et al. Immune Cells, Gut Microbiota, and Vaccines: A Gender Perspective. *Cells*. 2024;13(6).
78. Piliponsky AM, Romani L. The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity. *Immunol Rev*. 2018;282(1):188-197.
79. Agier J, Pastwińska J, Brzezińska-Błaszczuk E. An overview of mast cell pattern recognition receptors. *Inflamm Res*. 2018;67(9):737-746.
80. Orinska Z, Maurer M, Mirghomizadeh F, et al. IL-15 constrains mast cell-dependent antibacterial defenses by suppressing chymase activities. *Nat Med*. 2007;13(8):927-934.
81. Di Nardo A, Vitiello A, Gallo RL. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol*. 2003;170(5):2274-2278.
82. Malaviya R, Twesten NJ, Ross EA, Abraham SN, Pfeifer JD. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J Immunol*. 1996;156(4):1490-1496.
83. Féger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol*. 2002;23(3):151-158.
84. Huang C, De Sanctis GT, O'Brien PJ, et al. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta I and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. *J Biol Chem*. 2001;276(28):26276-26284.
85. Di Nardo A, Yamasaki K, Dorschner RA, Lai Y, Gallo RL. Mast cell cathelicidin antimicrobial peptide prevents invasive group A Streptococcus infection of the skin. *J Immunol*. 2008;180(11):7565-7573.
86. Dahlin JS, Maurer M, Metcalfe DD, Pejler G, Sagi-Eisenberg R, Nilsson G. The ingenious mast cell: Contemporary insights into mast cell behavior and function. *Allergy*. 2022;77(1):83-99.

-
87. Kambayashi T, Allenspach EJ, Chang JT, et al. Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation. *J Immunol.* 2009;182(8):4686-4695.
 88. Dimitriadou V, Mécheri S, Koutsilieris M, Fraser W, Al-Daccak R, Mourad W. Expression of functional major histocompatibility complex class II molecules on HMC-1 human mast cells. *J Leukoc Biol.* 1998;64(6):791-799.
 89. Galli SJ, Tsai M, Marichal T, Tchougounova E, Reber LL, Pejler G. Approaches for analyzing the roles of mast cells and their proteases in vivo. *Adv Immunol.* 2015;126:45-127.
 90. Shelburne CP, Abraham SN. The mast cell in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.* 2011;716:162-185.
 91. Reber LL, Sibilano R, Mukai K, Galli SJ. Potential effector and immunoregulatory functions of mast cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 2015;8(3):444-463.
 92. Saluja R, Metz M, Maurer M. Role and relevance of mast cells in fungal infections. *Front Immunol.* 2012;3:146.
 93. Miller HR. Immune reactions in mucous membranes. II. The differentiation of intestinal mast cells during helminth expulsion in the rat. *Lab Invest.* 1971;24(5):339-347.
 94. Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, Metz M, Maurer M, Bulfone-Paus S. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood.* 2005;106(3):978-987.
 95. Burke SM, Issekutz TB, Mohan K, Lee PWK, Shmulevitz M, Marshall JS. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood.* 2008;111(12):5467-5476.
 96. Marshall J, King C, McCurdy J. Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. *Curr Pharm Des.* 2003;9(1):11-24.
 97. Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143:83-104.
 98. Marshall JS, Portales-Cervantes L, Leong E. Mast Cell Responses to Viruses and Pathogen Products. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).
 99. Mikelis CM, Simaan M, Ando K, et al. RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nat Commun.* 2015;6:6725.
 100. Mendez-Barbero N, Yuste-Montalvo A, Nuñez-Borque E, et al. The TNF-like weak inducer of the apoptosis/fibroblast growth factor-inducible molecule 14 axis mediates histamine and platelet-activating factor-induced subcutaneous vascular leakage and anaphylactic shock. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(2):583-596.e6.
 101. Ballesteros-Martinez C, Mendez-Barbero N, Montalvo-Yuste A, et al. Endothelial Regulator of Calcineurin 1 Promotes Barrier Integrity and Modulates Histamine-Induced Barrier Dysfunction in Anaphylaxis. *Front Immunol.* 2017;8:1323.
 102. Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, et al. Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PLoS One.* 2015;10(7).

103. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, et al. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity*. 2011;34(6):973-984.
104. Torres R, Decastellarnau C, Ferrer LL, Puigdemont A, Santamaría LF, De Mora F. Mast cells induce upregulation of P-selectin and intercellular adhesion molecule 1 on carotid endothelial cells in a new in vitro model of mast cell to endothelial cell communication. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(2):170-177.
105. Wang Y, Thorlacius H. Mast cell-derived tumour necrosis factor-alpha mediates macrophage inflammatory protein-2-induced recruitment of neutrophils in mice. *Br J Pharmacol*. 2005;145(8):1062-1068.
106. Chi L, Stehno-Bittel L, Smirnova I, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Signal transduction pathways in mast cell granule-mediated endothelial cell activation. *Mediators Inflamm*. 2003;12(2):79-87.
107. Kinoshita M, Okada M, Kara M, Furukawa Y, Matsumori A. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(9):1858-1863.
108. Jehle AB, Li Y, Stechschulte AC, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Endotoxin and mast cell granule proteases synergistically activate human coronary artery endothelial cells to generate interleukin-6 and interleukin-8. *J Interferon Cytokine Res*. 2000;20(4):361-368.
109. Nyekel FN, Pacreau E, Benadda S, et al. Mast Cell Degranulation Exacerbates Skin Rejection by Enhancing Neutrophil Recruitment. *Front Immunol*. 2018;9:2690.
110. Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R, et al. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med*. 2000;192(10):1441-1451.
111. De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*. 2013;121(24):4930-4937.
112. Menzies-Gow A, Ying S, Phipps S, Kay AB. Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(8):1276-1282.
113. Gangwar RS, Levi-Schaffer F. Eosinophils interaction with mast cells: the allergic effector unit. *Methods Mol Biol*. 2014;1178:231-249.
114. Lampinen M, Carlson M, Håkansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy*. 2004;59(8):793-805.
115. Shelburne CP, Nakano H, St. John AL, et al. Mast cells augment adaptive immunity by orchestrating dendritic cell trafficking through infected tissues. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):331-342.
116. Vu Manh TP, Bertho N, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M. Investigating Evolutionary Conservation of Dendritic Cell Subset Identity and Functions. *Front Immunol*. 2015;6:260.
117. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.

-
118. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, et al. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity*. 2017;47(6):1037-1050.e6.
 119. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100(13):4512-4520.
 120. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000;165(11):6037-6046.
 121. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 2010;116(16).
 122. See P, Dutertre CA, Chen J, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*. 2017;356(6342).
 123. Katsoulis-Dimitriou K, Kotrba J, Voss M, Dudeck J, Dudeck A. Mast Cell Functions Linking Innate Sensing to Adaptive Immunity. *Cells*. 2020;9(12):1-19.
 124. Caron G, Delneste Y, Roelandts E, et al. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166(10):6000-6006.
 125. Amaral MM, Davio C, Ceballos A, et al. Histamine improves antigen uptake and cross-presentation by dendritic cells. *J Immunol*. 2007;179(6):3425-3433.
 126. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2018;14 Suppl 2:49.
 127. Bachelet I, Levi-Schaffer F, Mekori YA. Mast cells: not only in allergy. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006;26(3):407-425.
 128. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 2008;9(11):1215-1223.
 129. Mekori YA. The mastocyte: The “other” inflammatory cell in immunopathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):52-57.
 130. Rabenhorst A, Schlaak M, Heukamp LC, et al. Mast cells play a protumorigenic role in primary cutaneous lymphoma. *Blood*. 2012;120(10):2042-2054.
 131. Voehringer D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):362-375.
 132. Galli SJ, Gaudenzio N, Tsai M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:49-77.
 133. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104(3 Pt 1):517-523.
 134. Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol*. 2015;6:394.
 135. Stelekati E, Bahri R, D’Orlando O, et al. Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8+ T cell effector functions. *Immunity*. 2009;31(4):665-676.

136. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*. 1997;18(6):263-266.
137. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:749-786.
138. Meng H, Tonnesen MG, Marchese MJ, Clark RAF, Bahou WF, Gruber BL. Mast cells are potent regulators of endothelial cell adhesion molecule ICAM-1 and VCAM-1 expression. *J Cell Physiol*. 1995;165(1):40-53.
139. Meng H, Marchese MJ, Garlick JA, et al. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol*. 1995;105(6):789-796.
140. Mekori YA, Hershko AY. T cell-mediated modulation of mast cell function: heterotypic adhesion-induced stimulatory or inhibitory effects. *Front Immunol*. 2012;3:6.
141. De Vries VC, Wasiuk A, Bennett KA, et al. Mast cell degranulation breaks peripheral tolerance. *Am J Transplant*. 2009;9(10):2270-2280.
142. Hershko AY, Rivera J. Mast cell and T cell communication; amplification and control of adaptive immunity. *Immunol Lett*. 2010;128(2):98-104.
143. Palma AM, Hanes MR, Marshall JS. Mast Cell Modulation of B Cell Responses: An Under-Appreciated Partnership in Host Defence. *Front Immunol*. 2021;12:718499.
144. Galli SJ, Grimbaldston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):478-486.
145. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest*. 1997;99(7):1492-1499.
146. Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature*. 1993;365(6444):340-343.
147. Merluzzi S, Frossi B, Gri G, Parusso S, Tripodo C, Pucillo C. Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood*. 2010;115(14):2810-2817.
148. Kimata H, Fujimoto M, Ishioka C, Yoshida A. Histamine selectively enhances human immunoglobulin E (IgE) and IgG4 production induced by anti-CD58 monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1996;184(2):357-364.
149. Khoury JD, Solary E, Abula O, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-1719.
150. 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.
151. 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.
152. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood*. 2008;112(4):946-956.

-
153. Valent P, Akin C, Hartmann K, et al. Updated Diagnostic Criteria and Classification of Mast Cell Disorders: A Consensus Proposal. *Hemasphere*. 2021;5(11):E646.
 154. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(10):1053-1074.
 155. Larizza L, Magnani I, Beghini A. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2005;46(2):247-255.
 156. 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.
 157. Li JY, Ryder CB, Zhang H, et al. Review and Updates on Systemic Mastocytosis and Related Entities. *Cancers (Basel)*. 2023;15(23).
 158. Beghini A, Ripamonti CB, Cairoli R, et al. KIT activating mutations : incidence in adult and pediatric AML, and identification of an internal tandem duplication. *Haematologica*. 1644;89(8):920-925.
 159. Fontalba A, Agirre X, Real PJ, Richard C, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Identification of c-Kit gene mutations in patients with polycythemia vera. *Leuk Res*. 2006;30(10):1325-1326.
 160. 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.
 161. 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).
 162. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013;122(14):2460-2466.
 163. 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).
 164. Wu R, Lyons JJ. Hereditary Alpha-Tryptasemia: a Commonly Inherited Modifier of Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2021;21(5).
 165. González-de-Olano D, Navarro-Navarro P, Muñoz-González JI, et al. Clinical impact of the TPSAB1 genotype in mast cell diseases: A REMA study in a cohort of 959 individuals. *Allergy*. 2024;79(3):711-723.
 166. Carter MC, Metcalfe DD, Komarow HD. Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(1):181-196.
 167. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022;140(11):1200-1228.

168. 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.e1.
169. 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.
170. Brockow K. Epidemiology, prognosis, and risk factors in mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014;34(2):283-295.
171. Cohen SS, Skovbo S, Vestergaard H, et al. Epidemiology of systemic mastocytosis in Denmark. *Br J Haematol*. 2014;166(4):521-528.
172. 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 and Clin Immunol*. 2016;137(1):35-45.
173. Sandru F, Petca RC, Costescu M, et al. Cutaneous mastocytosis in childhood—update from the literature. *J Clin Med*. 2021;10(7).
174. Patel LM, Lambert PJ, Gagna CE, Maghari A, Lambert WC. Cutaneous signs of systemic disease. *Clin Dermatol*. 2011;29(5):511-522.
175. Valent P, Akin C, Metcalfe DD. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*. 2017;129(11):1420-1427.
176. Hamed NA. The 2023 Updated Classification and Diagnostic Criteria of Mastocytosis. *Cancer Ther Oncol Int J*. 2023;24(4).
177. 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.
178. Wolff K, Komar M, Petzelbauer P. Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leuk Res*. 2001;25(7):519-528.
179. Alvarez-Twose I, Vañó-Galván S, Sánchez-Muñoz 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.
180. Lange M, Niedoszytko M, Nedoszytko B, Łata 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.
181. Leung AKC, Lam JM, Leong KF. Childhood Solitary Cutaneous Mastocytoma: Clinical Manifestations, Diagnosis, Evaluation, and Management. *Curr Pediatr Rev*. 2019;15(1):42-46.
182. George TI, Horny HP. Systemic mastocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(5):1067-1083.
183. Ozdemir D, Dagdelen S, Erbas T. Systemic mastocytosis. *Am J Med Sci*. 2011;342(5):409-415.

-
184. Frossi B, Mion F, Sibilano R, Danelli L, Pucillo CEM. Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity? *Immunol Rev*. 2018;282(1):35-46.
185. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N Engl J Med*. 2015;373(2):163-172.
186. Zanotti R, Tanasi I, Crosera L, et al. Systemic mastocytosis: Multidisciplinary approach. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2021;13(1).
187. Rama TA, Henriques AF, Matito A, et al. Bone and Cytokine Markers Associated With Bone Disease in Systemic Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023;11(5):1536-1547.
188. Zanotti R, Bonifacio M, Lucchini G, et al. Refined diagnostic criteria for bone marrow mastocytosis: a proposal of the European competence network on mastocytosis. *Leukemia*. 2022;36(2):516-524.
189. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2019;94(3):363-377.
190. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2021 Update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol*. 2021;96(4):508-525.
191. Zanotti R, Tanasi I, Bernardelli A, Orsolini G, Bonadonna P. Bone Marrow Mastocytosis: A Diagnostic Challenge. *J Clin Med*. 2021;10(7).
192. Metcalfe DD. Classification and diagnosis of mastocytosis: Current status. *J Invest Dermatol*. 1991;96(3):S2-4S.
193. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.
194. Leguit RJ, Wang SA, George TI, Tzankov A, Orazi A. The international consensus classification of mastocytosis and related entities. *Virchows Archiv*. 2023;482(1):99-112.
195. 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.
196. Akin C, Scott LM, Kocabas CN, et al. Demonstration of an aberrant mast-cell population with clonal markers in a subset of patients with “idiopathic” anaphylaxis. *Blood*. 2007;110(7):2331-2333.
197. Bonadonna P, Zanotti R, Müller U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(4):347-353.
198. Álvarez-Twose I, González de Olano D, Sánchez-Muñoz L, et al. Clinical, biological, and molecular characteristics of clonal mast cell disorders presenting with systemic mast cell activation symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(6).
199. 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.

200. 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.
201. Escribano L, Álvarez-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.
202. 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.
203. Valent P, Akin C, Escribano L, et al. Standards and standardization in mastocytosis: consensus statements on diagnostics, treatment recommendations and response criteria. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(6):435-453.
204. 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.
205. 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.
206. Hoermann G, Gleixner K V., 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.
207. Erben P, Schwaab J, Metzgeroth G, et al. The KIT D816V expressed allele burden for diagnosis and disease monitoring of systemic mastocytosis. *Ann Hematol*. 2014;93(1):81-88.
208. 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.
209. Teodosio C, García-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).
210. Sánchez-Muñoz L, Alvarez-Twose I, García-Montero AC, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011;24(9):1157-1168.
211. Valent P, Sperr WR, Akin C. How I treat patients with advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2010;116(26):5812-5817.
212. 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.
213. 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.
214. 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.

215. Muñoz-González JI, Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, et al. Proposed global prognostic score for systemic mastocytosis: a retrospective prognostic modelling study. *Lancet Haematol*. 2021;8(3):e194-e204.
216. Muñoz-González JI, Álvarez-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.
217. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Dubreuil P, Chandesris MO, Hermine O, Damaj G. Mast cell leukemia. *Blood*. 2013;121(8):1285-1295.
218. 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.
219. 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.
220. Pardanani A, Akin C, Valent P. Pathogenesis, clinical features, and treatment advances in mastocytosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):595-615.
221. Scherber RM, Borate U. How we diagnose and treat systemic mastocytosis in adults. *Br J Haematol*. 2018;180(1):11-23.
222. Akin C, Arock M, Valent P. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of indolent systemic mastocytosis: Are we there yet? *J Allergy Clin Immunol*. 2022;149(6):1912-1918.
223. Piris-Villaespesa M, Alvarez-Twose I. Systemic Mastocytosis: Following the Tyrosine Kinase Inhibition Roadmap. *Front Pharmacol*. 2020;11:443.
224. Gotlib J, Reiter A, Radia DH, et al. Efficacy and safety of avapritinib in advanced systemic mastocytosis: interim analysis of the phase 2 PATHFINDER trial. *Nat Med*. 2021;27(12):2192-2199.
225. Gotlib J, Kluin-Nelemans HC, George TI, et al. Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis. *N Engl J Med*. 2016;374(26):2530-2541.
226. van der Ploeg EK, Hermans MAW, van der Velden VHJ, Dik WA, van Daele PLA, Stadhouders R. Increased group 2 innate lymphoid cells in peripheral blood of adults with mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(4):1490-1496.e2.
227. Hermans MAW, Heeringa JJ, Swagemakers SGA, et al. Altered leukocyte subsets and immune proteome indicate proinflammatory mechanisms in mastocytosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022;150(1):146-156.e10.
228. Kulinski JM, Eisch R, Young ML, et al. Skewed Lymphocyte Subpopulations and Associated Phenotypes in Patients with Mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(1):292-301.e2.

229. Makovoz A, Cousins KL, Dominguez Aldama LN, et al. Assessment of low immunoglobulin levels and clinical manifestations in patients with mastocytosis. *J Investig Allergol Clin Immunol Glob*. 2023;2(1):105-110.
230. Ercolano G, Trabanelli S, Jandus C, Jandus P. IL-9R Loss in Type 2 Innate Lymphoid Cells Reflects Treg Impairment in Patients With Mastocytosis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2023;33(2):129-131.
231. 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.
232. Valent P. KIT D816V and the cytokine storm in mastocytosis: production and role of interleukin-6. *Haematologica*. 2020;105(1):5-6.
233. Tobío A, Bandara G, Morris DA, et al. Oncogenic D816V-KIT signaling in mast cells causes persistent IL-6 production. *Haematologica*. 2020;105(1):124-135.
234. Li T, Wang H, He S. Induction of interleukin-6 release from monocytes by serine proteinases and its potential mechanisms. *Scand J Immunol*. 2006;64(1):10-16.
235. Murphy DM, Mills KHG, Basdeo SA. The Effects of Trained Innate Immunity on T Cell Responses; Clinical Implications and Knowledge Gaps for Future Research. *Front Immunol*. 2021;12:706583.
236. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):427.
237. Divangahi M, Aaby P, Khader SA, et al. Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol*. 2021;22(1):2-6.
238. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):375-388.
239. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, et al. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell*. 2018;172(1-2):147-161.e12.
240. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*. 2018;172(1-2):176-190.e19.
241. Yona S, Kim KW, Wolf Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
242. Neeland MR, Koplin JJ, Dang TD, et al. Early life innate immune signatures of persistent food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142(3):857-864.e3.
243. Komarow HD, Brenchley JM, Eisch AR, et al. A study of microbial translocation markers in mastocytosis. *Clin Exp Allergy*. 2021;51(2):369-372.
244. Meyer F, Wendling D, Demougeot C, Prati C, Verhoeven F. Cytokines and intestinal epithelial permeability: A systematic review. *Autoimmun Rev*. 2023;22(6).
245. Hsieh FH. Gastrointestinal Involvement in Mast Cell Activation Disorders. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018;38(3):429-441.

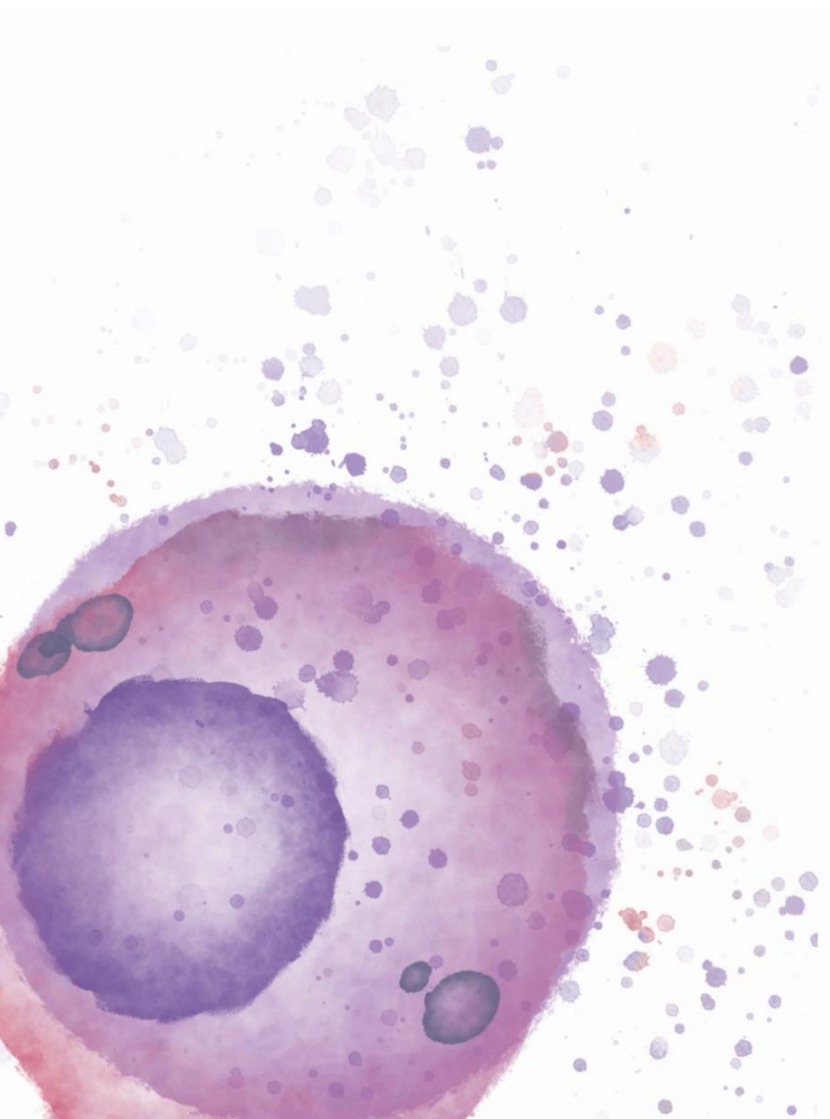
-
246. Aponte-López A, Muñoz-Cruz S. Mast Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1273:159-173.
247. Chang GW, Davies JQ, Stacey M, et al. CD312, the human adhesion-GPCR EMR2, is differentially expressed during differentiation, maturation, and activation of myeloid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(1):133-138.
248. Lim J, Iyer A, Liu L, et al. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. *FASEB J.* 2013;27(12):4757-4767.
249. Elieh Ali Komi D, Grauwet K. Role of Mast Cells in Regulation of T Cell Responses in Experimental and Clinical Settings. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018;54(3):432-445.
250. Damasceno D, Teodosio C, van den Bossche WBL, et al. Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;144(1):320-323.e6.
251. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2208-2219.e16.
252. Botafogo V, Pérez-Andres M, Jara-Acevedo M, et al. Age Distribution of Multiple Functionally Relevant Subsets of CD4⁺ T Cells in Human Blood Using a Standardized and Validated 14-Color EuroFlow Immune Monitoring Tube. *Front Immunol.* 2020;11:166.
253. Giannetti MP, Nicoloso-SantaBarbara J, Godwin G, Middlesworth J, Espeland A, Castells MC. Drug and Venom Allergy in Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2023;43(4):699-710.
254. Lichterman JN, Reddy SM. Mast cells: A new frontier for cancer immunotherapy. *Cells.* 2021;10(6).
255. Sayed BA, Brown MA. Mast Cells as Modulators of T-Cell Responses. *Immunol. Rev.* 2007;217:53-64.
256. Malamud V, Vaaknin A, Abramsky O, et al. Tryptase activates peripheral blood mononuclear cells causing the synthesis and release of TNF- α , IL-6 and IL-1 β : Possible relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003;138(1-2):115-122.
257. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2003;1639(3):141-151.
258. Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity.* 1999;10(2):137-142.
259. Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond).* 2003;104(1):27-38.
260. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-483.
261. Hermans MAW, Schrijver B, van Holten-Neelen CCPA, et al. The JAK1/JAK2- inhibitor ruxolitinib inhibits mast cell degranulation and cytokine release. *Clin Exp Allergy.* 2018;48(11):1412-1420.

262. Villar J, Segura E. Decoding the Heterogeneity of Human Dendritic Cell Subsets. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1062-1071.
263. Chen YL, Gomes T, Hardman CS, et al. Re-evaluation of human BDCA-2+ DC during acute sterile skin inflammation. *J Exp Med.* 2020;217(3).
264. Jardine L, Wiscombe S, Reynolds G, et al. Lipopolysaccharide inhalation recruits monocytes and dendritic cell subsets to the alveolar airspace. *Nat Commun.* 2019;10(1).
265. Leylek R, Idoyaga J. The versatile plasmacytoid dendritic cell: Function, heterogeneity, and plasticity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2019;349:177-211.
266. Noto CN, Hoft SG, DiPaolo RJ. Mast Cells as Important Regulators in Autoimmunity and Cancer Development. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:752350.
267. Valitutti S, Espinosa E. Cognate interactions between mast cells and helper T lymphocytes. *Self Nonself.* 2010;1(2):114-122.
268. Mekori YA, Hershko AY, Frossi B, Mion F, Pucillo CE. Integrating innate and adaptive immune cells: Mast cells as crossroads between regulatory and effector B and T cells. *Eur J Pharmacol.* 2016;778:84-89.
269. Oliva-Ariza G, Fuentes-Herrero B, Lecrevisse Q, et al. Immune cell kinetics and antibody response in COVID-19 patients with low-count monoclonal B-cell lymphocytosis. *Am J Hematol.* 2023;98(12):1909-1922.
270. Nakae S, Suto H, Iikura M, et al. Mast Cells Enhance T Cell Activation: Importance of Mast Cell Costimulatory Molecules and Secreted TNF. *J Immunol.* 2006;176(4):2238-2248.
271. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45-65.
272. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1717-1725.
273. McLachlan JB, Hart JP, Pizzo S V., et al. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1199-1205.
274. Li H, Wu M, Zhao X. Role of chemokine systems in cancer and inflammatory diseases. *MedComm (2020).* 2022;3(2): e147.
275. Lavender N, Yang J, Chen SC, et al. The Yin/Yan of CCL2: a minor role in neutrophil anti-tumor activity in vitro but a major role on the outgrowth of metastatic breast cancer lesions in the lung in vivo. *BMC Cancer.* 2017;17(1):88.
276. Sayama K, Diehn M, Matsuda K, et al. Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(epsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. *BMC Immunol.* 2002;3:5.
277. Nakajima T, Inagaki N, Tanaka H, et al. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcepsilon receptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood.* 2002;100(12):3861-3868.

-
278. Ji T, Li H. T-helper cells and their cytokines in pathogenesis and treatment of asthma. *Front Immunol.* 2023;14:1149203.
279. Gutiérrez-Melo N, Baumjohann D. T follicular helper cells in cancer. *Trends Cancer.* 2023;9(4):309-325.
280. Yoshitomi H, Ueno H. Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):523-527.
281. Chantran Y, Valent P, Arock M. KIT Mutations and Other Genetic Defects in Mastocytosis: Implications for Disease Pathology and Targeted Therapies. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2023;43(4):651-664.
282. Bai Y, Bandara G, Ching Chan E, et al. Targeting the KIT activating switch control pocket: a novel mechanism to inhibit neoplastic mast cell proliferation and mast cell activation. *Leukemia.* 2013;27(2):278-285.
283. Hartmann K, Gotlib J, Akin C, et al. Midostaurin improves quality of life and mediator-related symptoms in advanced systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146(2):356-366.e4.
284. Gurram RK, Zhu J. Orchestration between ILC2s and Th2 cells in shaping type 2 immune responses. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(3):225-235.
285. Kubo M. T follicular helper and TH2 cells in allergic responses. *Allergol Int.* 2017;66(3):377-381.
286. Boehm T, Ristl R, Mühlbacher J, Valent P, Wahrmann M, Jilma B. Massive release of TH2 cytokines induced a cytokine storm during a severe mast cell activation event in a patient with indolent systemic mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2022;150(2):406-414.e16.
287. Jafarzadeh A, Larussa T, Nemati M, Jalapour S. T cell subsets play an important role in the determination of the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Microb Pathog.* 2018;116:227-236.
288. Tamasauskienė L, Sitkauskienė B. Role of Th22 and IL-22 in pathogenesis of allergic airway diseases: Pro-inflammatory or anti-inflammatory effect? *Pediatr Neonatol.* 2018;59(4):339-344.
289. Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem.* 2011;353(1-2):41-46.
290. Pan Y, Du D, Wang L, Wang X, He G, Jiang X. The Role of T Helper 22 Cells in Dermatological Disorders. *Front Immunol.* 2022;13:911546.
291. Kranyak A, Shuler M, Lee LW. Cutaneous Manifestations in Hereditary Alpha Trypsinemia. *Cutis.* 2023;111(1):49-52.
292. Wang M, Tian T, Yu S, He N, Ma D. Th17 and Treg cells in bone related diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:203705.
293. Cheru N, Hafler DA, Sumida TS. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1154575.

294. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(4):345-350.
295. Sørensen AL, Bjørn ME, Riley CH, et al. B-cell frequencies and immunoregulatory phenotypes in myeloproliferative neoplasms: Influence of ruxolitinib, interferon- α 2, or combination treatment. *Eur J Haematol*. 2019;103(4):351-361.
296. Benjamin D, Shohat B, Pinkhas J, Joshua H. B- and T-lymphocyte subpopulations in polycythemia vera. A study of 100 patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1979;13(4):378-382.
297. Dong Q, Li G, Fozza C, et al. Levels and Clinical Significance of Regulatory B Cells and T Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Biomed Res Int*. 2020;2020:7023168.
298. Srivannaboon K, Conley ME, Coustan-Smith E, Wang WC. Hypogammaglobulinemia and reduced numbers of B-cells in children with myelodysplastic syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23(2):122-125.
299. Tarlinton DM, Ding Z, Tellier J, Nutt SL. Making sense of plasma cell heterogeneity. *Curr Opin Immunol*. 2023;81:102297.
300. Husband AJ, Gowans JL. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med*. 1978;148(5):1146-1160.
301. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(10):822-829.
302. Jackson CW, Pratt CM, Rupprecht CP, Pattanaik D, Krishnaswamy G. Mastocytosis and Mast Cell Activation Disorders: Clearing the Air. *Int J Mol Sci*. 2021;22(20).
303. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell*. 2019;177(3):524-540.
304. Sokol H, Georgin-Lavialle S, Canioni D, et al. Gastrointestinal manifestations in mastocytosis: a study of 83 patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(4).
305. Zogorean R, Wirtz S. The yin and yang of B cells in a constant state of battle: intestinal inflammation and inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2023;14:1260266.
306. Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: Role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-69.
307. van der Vliet A, Danyal K, Heppner DE. Dual oxidase: a novel therapeutic target in allergic disease. *Br J Pharmacol*. 2018;175(9):1401-1418.

ANEXO I



MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

Artículo 1:

“Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients”.

En este apartado se recoge la siguiente información (también disponible en la página web de la revista):

- i) Materiales y métodos suplementarios.
- ii) Resultados suplementarios
- iii) Tablas suplementarias (Tablas suplementarias 1 – 6).
- iv) Figuras suplementarias (Figuras suplementarias 1-3)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Title: “Altered innate immune profile in blood of systemic mastocytosis patients”

Alba Pérez-Pons, María Jara-Acevedo, Ana Henriques, Paula Navarro-Navarro, Andrés C. García-Montero, Iván Álvarez-Twose, Carlos E. Pedreira, Laura Sánchez-Muñoz, Daniela Damasceno, Carolina Caldas, Javier I. Muñoz-González, Almudena Matito, Juan Flores-Montero, Oscar González-López, Ignacio Criado, Andrea Mayado, Alberto Orfao

SUPPLEMENTARY METHODS

Serum tryptase levels. Serum baseline tryptase (sBT) level was measured using the Phadia ImmunoCAP Tryptase System (Phadia/Thermo Fisher Scientific Inc., Uppsala, Sweden), according to the instructions of the manufacturer.

***KIT* mutational analysis.** The *KIT* D816V mutation was investigated in whole BM DNA and FACS-purified ($\geq 97\%$ purity) BM MC, eosinophils, monocytes, neutrophils, CD34⁺ hematopoietic precursors cells (HPC) and T cells from all 115 SM patients studied, as well as on purified PB monocytes (FACS Aria, BD) from a subgroup of 17 SM patients. For *KIT* mutational analyses both an allele-specific oligonucleotide quantitative PCR (ASOqPCR) (1) approach and a peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR-clamping method (2, 3, 4), were used in whole BM and purified cell DNA. The *KIT* D816V variant allele frequency (VAF) was determined in BM as previously described (5).

***TPSAB1* gene analysis.** Genotyping was performed in 103 SM patients by quantitative real-time digital PCR (qdPCR) following previously described methods (6); for this purpose the Biomark™ HD system (Fluidigm, South San Francisco, CA) and the Digital PCR Analysis Software (Fluidigm) were used. Hereditary α tryptasemia (HaT) was defined when 3 or more copies of the α tryptase gene copies or 2 copies of the α -tryptase gene together with in

presence of 3 copies of the β -tryptase gene were found, following previously established criteria.

SUPPLEMENTARY RESULTS

Association between the presence of symptoms and both the distribution of monocyte and dendritic cell subsets in blood of SM patients. In a subset of 70 SM patients, we further investigated if the presence of symptoms such as anaphylaxis, osteoporosis, pruritus or gastrointestinal symptoms would have an effect on the distribution of PB monocytes and DC. Thus, SM patients with anaphylaxis showed higher monocytes ($P=.029$) and DC counts ($P<.001$) vs SM cases without anaphylaxis, at the expense of all subsets of monocytes ($P\leq.040$) and DC ($P<.002$) (Table 4 SupplInfo). In addition, SM patients who had pruritus displayed decreased counts ($P=.034$) (vs cases without pruritus) of ncMo. In contrast, no statistically significant differences were found neither in the distribution of cytokine producing blood monocytes, nor in plasma levels of the cytokines investigated between SM patients presenting with or without anaphylaxis, pruritus, GI symptoms and/or osteoporosis (Table 4 SupplInfo).

Association between the presence of the *KIT* D816V mutation in PB monocytes of SM patients and both the distribution of monocyte and dendritic cell subsets in blood and their cytokine production profile. In a subset of 25 SM patients, including 10 BMM and 15 ISM, we further investigated the presence of the *KIT* D816V mutation in highly-purified blood monocytes by ASO-qPCR. *KIT* D816V⁺ blood monocytes were detected in 3/10 (30%) BMM and in 11/15 (73%) ISM patients (Table 5 SupplInfo). Of note, no statistically significant differences were found in the distribution of blood monocyte and DC populations, neither in their cellular and plasma cytokine levels, between cases that showed *KIT* D816V mutated vs unmutated blood monocytes (Table 5 SupplInfo). Thus, the presence of *KIT* D816V mutation in blood monocytes from SM patients might not have a direct effect on the altered

distribution and the dysregulated cytokine production of blood monocytes and dendritic cells here observed among SM patients.

Association between the presence of HaT and both the distribution of monocyte and dendritic cell subsets in blood and their cytokine production profile. In a subset of 103 SM patients, including 40 BMM, 54 ISM and 9 ASM, we further investigated the *TPSAB1* genotype (Table 6 SupplInfo). Overall, the HaT genotype was detected in 7/40 (18%) BMM, 3/54 (6%) ISM and in 3/9 (33%) ASM patients (Table 6 SupplInfo). Of note, HaT patients showed increased numbers of total monocytes, cMo and mDC compared to patients showing a normal *TPSAB1* genotype ($P=.036$, $P=.02$ and $P=.045$, respectively).

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015 Aug;28(8):1138-49. doi: 10.1038/modpathol.2015.72.
2. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A 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 Oct 1;108(7):2366-72. doi: 10.1182/blood-2006-04-015545.
3. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, 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 Mar;162(3):737-46. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63870-9.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
5. Muñoz-González JI, Álvarez-Twose I, Jara-Acevedo M, Henriques A, Viñas E, Prieto C, Sánchez-Muñoz L, Caldas C, Mayado A, Matito A, Dasilva-Freire N, Orfao A, García-Montero AC. Frequency and prognostic impact of KIT and other genetic variants in indolent systemic mastocytosis. *Blood*. 2019 Aug 1;134(5):456-468. doi: 10.1182/blood.2018886507. Epub 2019 May 31. PMID: 31151985.
6. Lyons JJ, Yu X, Hughes JD, Le QT, Jamil A, Bai Y et al. Elevated basal serum tryptase identifies a multisystem disorder associated with increased *TPSAB1* copy number. *Nat Genet*. 2016 Dec;48(12):1564-1569. doi: 10.1038/ng.3696.

Table 1 SupplInfo. Adult systemic mastocytosis patients (n=115): demographic, clinical and laboratory findings at diagnosis according to distinct subtypes of the disease.

Variable	SM (n=115)	BMM (n=45)	ISM (n=61)	ASM (n=9)	P value
Age (y)*	55±11	53±9	55±11	60±12	NS
Sex (M/F)	58/57 (50.4%/49.6%)	29/16 (64%/36%)	25/36 (41%/59%)	4/5 (44%/56%)	0.017 [†]
Anaphylaxis	59 (52%)	40 (89%)	18 (30%)	1 (11%)	<0.001 [‡]
Organomegaly	18 (16%)	3 (6.7%)	8 (13%)	7 (78%)	<0.001 [§]
Haemoglobin (x10 ⁹ /l)*	14±1.3	14.7±1.2	14±1	12.2±1.8	0.003 [¶]
N. of platelet counts (x10 ⁹ /l)*	228±56	220±44	230±60	255±80	NS
N. of leucocytes counts (x10 ⁹ /l)*	6785±1967	7073±1821	6523±1811	7122±3442	NS
Serum tryptase (ng/ml)*	86.2 ± 153.6	36.9±50.3	71.4±60.7	433±380	<0.001 [¶]
Altered TPSAB1 genotype	13 (13%)	7 (18%)	3 (5.5%)	3 (33%)	0.009 [§]
LDH (U/l)	196.1±82.2	218±88	187±73	148.1±88	0.042 [¶]
SAP (U/l)	101.2±173.9	71.±20	75.3±23	426.7±543.7	<0.001 ^{‡§}
Serum β-2-microglobulin (μl/ml)	3.7±15.9	5.8±25	2.1±0.5	3.7±1.3	<0.001 ^{‡§}
D816V <i>KIT</i> mutation	113 (98%)	43 (96%)	61 (100%)	9 (100%)	NS
Other gene mutations					
<i>ASXL1</i>	2 (3%)	1 (6%)	0	1 (14%)	
<i>CSMD1</i>	2 (3%)	0	2 (3%)	0	
<i>DNAH2</i>	1 (2%)	0	1 (2%)	0	
<i>DNMT3A</i>	2 (3%)	0	2 (3%)	0	NS
<i>SAR</i>	1 (2%)	0	1 (2%)	0	
<i>SETBP1</i>	1 (2%)	0	1 (2%)	0	
<i>SRSF2</i>	1 (2%)	0	0	1 (14%)	
<i>TET2</i>	2 (3%)	0	1 (2%)	1 (14%)	
% BMMC* by FCM	0.35%± 0.9	0.11%±0.12	0.29%±0.41%	1.99±2.6%	0.015 [¶]
Follow up (months)*	118±86	93±44	127±74	195±210	NS

Results expressed as number of cases (percentage) or as*mean ± one standard deviation. SM, systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; y, years; M, male; F, female; LDH, lactate dehydrogenase; SAP, serum alkaline phosphatase; BM, bone marrow; MC, mast cell; FCM, flow cytometry; NS, statistically not significantly different (P>0.05); ND, not determined; † BMM vs ISM patients, ‡ BMM vs ASM patients, § ISM vs ASM patients, ¶ BMM, ISM and ASM patients.

Table 2 SuppInfo. Distribution of healthy donors (HD) (n=32) and systemic mastocytosis (SM) patients per diagnostic subtype of the disease (n=115) according to the type of assays performed in this study.

Assay type	Healthy donors n=32	SM n=115	SM Patients		
			BMM n=45	ISM n=61	ASM n=9
Immunophenotypic studies	12	70	24	39	7
<i>Ex vivo</i> cytokine production	16	53	20	28	5
Soluble cytokine plasma levels	6	52	19	28	5
Soluble CCL2 and EMR2 plasma levels	15	57	20	32	5
Soluble CXCR2, SAA1 and TLR2 plasma levels	10	30	9	17	4
<i>TPSAB1</i> genotype	14	103	40	54	9

Results expressed as number of cases. SM, systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; CCL2, C-C motif chemokine ligand 2; EMR2, epidermal growth factor-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 2; CXCR2, C-X-C motif chemokine receptor 2; SAA1, serum amyloid A1; TLR2, toll like receptor 2.

Table 3 SupplInfo. List of monoclonal antibody reagents used for immunophenotypic analysis of different populations of blood monocytes and dendritic cells from SM patients and healthy donors.

Marker	Clone	Fluorochrome	Source
CD1	F10/21A3	BBB515	BD Biosciences ^a
CD3	UCHT1	BV711	BD Biosciences
CD5	UCHT2	BV510	BD Biosciences
CD14	MφP9	APCH7	BD Biosciences
CD16	3G8	BV786	BD Biosciences
CD19	SJ25C1 N	BV711	BD Biosciences
CD33	P67.6	BV605	BD Biosciences
CD33	P67.6	PECy7	BD Biosciences
CD34	581	PECF594	BD Biosciences
CD36	CLB-IVC7	PerCPCy5.5	Immunostep ^b
CD45	HI30	OC515	BD Biosciences
CD45	HI30	AF700	BD Biosciences
CD56	NCAM16.2	BV711	BD Biosciences
CD62L	DREG56	BV650	Biolegend ^c
CD123	7G3	BV650	BD Biosciences
CD141	1A4	BV421	BD Biosciences
CD182	6C6	APC	BD Biosciences
CD192	K036C2	BV605	Biolegend
CD282	11G7	BV510	BD Biosciences
CD300e (IREM2)	UP-H2	APC	Immunostep
CD303	AC144	APC	Miltenyi Biotec ^d
CD312	REA302	PE	Miltenyi Biotec
HLADR	G46-6	PECF594	BD Biosciences
HLADR	G46-6	BV711	BD Biosciences
IL1β	AS10	PE	BD Biosciences
IL6	MQ2-6A3	PE	BD Biosciences
IL8	E8N	PECy7	Biolegend
IL10	JES3-9D7	PECy7	Biolegend
IL12	C8.6	BV421	BD Biosciences
IL13	JES10-5A2	PerCPCy5.5	Biolegend
TGFβ	TW4-9E7	BV421	BD Biosciences
TNFα	Mab11	PerCPCy5.5	Biolegend
FcERI	AER-37	FITC	Thermo Fisher ^e
FcERI	AER-37	PE	Thermo Fisher
PAR-2	344222	APC	R&D Systems ^f
Slan	DD.1	PE	Miltenyi Biotec

Abbreviations: AF700, Alexa Fluor 700; APC, allophycocyanin; APCH7, allophycocyanin-Hilite®7 BB515, Brilliant Blue 515; BV421, Brilliant Violet 421; BV605, Brilliant Violet 605; BV650, Brilliant Violet 650; BV711, Brilliant Violet 711; FITC, fluorescein isothiocyanate; PacB, Pacific Blue; PE, phycoerythrin; PECF594, PerCPCy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5; PECy7, phycoerythrin-cyanin 7; PacO, Pacific Orange; ^aBD Biosciences (San Jose, CA); ^bImmunostep (Salamanca, Spain); ^cBiolegend (San Diego, CA); ^dMiltenyi Biotec (Cologne, Germany); ^eThermo Fisher (Waltham, MA); ^fR&D Systems (Minneapolis, MN).

Table 4 SuppInfo. Relationship between the presence of symptoms and the distribution of distinct populations of monocytes and dendritic cells in blood of systemic mastocytosis (SM) patients (n=70).

	Anaphylaxis		Osteoporosis		Pruritus		Gastrointestinal symptoms		P value
	Yes n=37	No n=33	Yes n=11	No n=59	Yes n=36	No n=34	Yes n=21	No n=49	
N. of total PB monocytes (cells/μl)	397 (175-3458)	336 (103-2011)	363 (205-749)	377 (103-3458)	348 (103-701)	408 (150-3458)	397 (103-2011)	347 (150-3458)	*
N. of PB classical monocytes (cells/ μ l)	359 (169-3349)	298 (84-1995)	318 (172-592)	329 (84-3349)	304 (84-659)	367 (136-3349)	348 (84-1995)	313 (136-3349)	*
N. of PB intermediate monocytes (cells/ μ l)	17 (2-85)	12 (3-35)	14 (6-85)	13 (2-58)	13 (36-2)	15 (7-85)	14 (5-33)	13 (2-85)	*
N. of PB non-classical monocytes (cells/ μ l)	29 (4-71)	19 (4-46)	22 (12-71)	23 (4-67)	21 (4-51)	28 (4-71)	22 (4-47)	23 (4-71)	*** †
N. of total dendritic cells (cells/μl)	24 (7-55)	14 (3-46)	23 (11-36)	17 (3-55)	17 (3-55)	23 (5-46)	20 (3-55)	18 (5-46)	***
N. of PB myeloid DC (cells/ μ l)	16 (4-41)	9 (2-43)	16 (8-24)	11 (2-43)	11 (2-41)	14 (2-43)	13 (2-43)	11 (2-31)	**
N. of PB plasmacytoid DC (cells/ μ l)	8 (2-18)	4 (1-14)	9 (3-18)	6 (1-17)	5 (0.5-17)	7 (2-18)	5 (0.6-14)	6 (1-18)	***
N. of PB AXL DC (cells/ μ l)	0.5 (0-2)	0.3 (0-0.6)	0.3 (0-0.9)	0.4 (0-2)	0.4 (0-2)	0.4 (0-2)	0.3 (0-0.7)	0.4 (0-2)	***

Results expressed as median values and range between brackets. Presence vs absence for * anaphylaxis, ‡ osteoporosis, † pruritus, § gastrointestinal symptoms. PB, peripheral blood; DC, dendritic cells. P-values: * <.05, ** <.010, *** <.001, † <.05, †† <.010, ††† <.001.

Table 5 SuppInfo. Relationship between the presence of the *KIT* D816V mutation in blood monocytes of systemic mastocytosis (SM) patients (n=25) and the distribution of distinct populations of monocytes and dendritic cells and cytokine producing monocytes counts in blood.

	<i>KIT</i> D816V-mutational status of blood monocytes		
	<i>KIT</i> D816V ⁺ (n=14)	<i>KIT</i> D816V ⁻ (n=11)	P value
Diagnostic subtype of SM:			
BMM (n=10)	3/14 (21%)	7/11 (64%)	.032
ISM (n=15)	11/14 (79%)	4/11 (36%)	
Number of monocytes and dendritic cells (DCs) in PB*:			
N. of total PB monocytes (cells/ μl)	338 (254-363)	369 (317-421)	NS
N. of PB classical monocytes (cells/ μ l)	291 (241-300)	304 (260-348)	NS
N. of PB intermediate monocytes (cells/ μ l)	12 (7-35)	26 (19-33)	NS
N. of PB non-classical monocytes (cells/ μ l)	25 (7-47)	39 (38-39)	NS
N of total dendritic cells	16 (11-24)	17 (15-20)	NS
N. of PB myeloid DC (cells/ μ l)	9 (6.7-16)	13 (10-16)	NS
N. of PB plasmacytoid DC (cells/ μ l)	6.1 (4.5-8.7)	4 (3.4-4.8)	NS
N. of PB Axl DC (cells/ μ l)	0.33 (0.07-0.37)	0.30 (0.12-0.47)	NS
Ex vivo cytokine production:			
N. of PB IL1 β + (cells/ μ l)	27 (0-222)	34.47 (0-153)	NS
N. of PB IL6+ (cells/ μ l)	21 (2.9-76)	13.01 (0-65.72)	NS
N. of PB IL8+ (cells/ μ l)	22 (3.9-87)	27 (0.62-147)	NS
Plasma levels:			
IL1 β (pg/ml)	4122 (91-9635)	4163. (204-7491)	NS
IL6 (pg/ml)	15,698 (214-33,191)	15301 (2722-31,395)	NS
IL8 (pg/ml)	16,285 (1773-25,022)	17,072 (5067-26,907)	NS

Results expressed as number of cases/total cases (percentage) or as *median values and range between brackets. BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; MC, mast cell; PB, peripheral blood; DC, dendritic cells.

Table 6 SupplInfo. Relationship between the presence of an altered *TPSAB1* genotype in systemic mastocytosis (SM) patients (n=103) and the distribution of distinct populations of blood monocytes, dendritic cells, cytokine producing monocytes and cytokine levels in plasma.

	HaT (n=13)	Non-HaT (n=90)	P value
Diagnostic subtype of SM:			
BMM (n=40)	7/40 (18%)	33/40 (83%)	
ISM (n=54)	3/54 (6%)	51/54 (94%)	.033
ASM (n=9)	3/9 (33%)	6/9 (67%)	
Number of monocytes and dendritic cells (DCs) in PB*:			
N. of total PB monocytes (cells/ µl)	428 (313-701)	348 (103-3458)	.036
N. of PB classical monocytes (cells/ µl)	363 (260-659)	298 (8-3349)	.02
N. of PB intermediate monocytes (cells/ µl)	21 (9-36)	13 (0.2-85)	NS
N. of PB non-classical monocytes (cells/ µl)	33 (10-52)	25 (7-47)	NS
N of total dendritic cells	23 (10-38)	14 (3-46)	NS
N. of PB myeloid DC (cells/ µl)	16 (7-22)	10 (2-31)	0.045
N. of PB plasmacytoid DC (cells/ µl)	7 (2-17)	5 (0.2-18)	NS
N. of PB Axl DC (cells/ µl)	0.4 (0.05-0.95)	0.4 (0.03-2.1)	NS
Ex vivo cytokine production:			
N. of PB IL1β+ (cells/ µl)	34.47 (0-153.43)	13 (0-222)	NS
N. of PB IL6+ (cells/ µl)	13.01 (0-65.72)	11 (0-76)	NS
N. of PB IL8+ (cells/ µl)	26.66 (0.62-147.29)	17 (0.5-147)	NS
Plasma levels:			
IL1β (pg/ml)	4688 (168-7491)	1413 (41-9932)	NS
IL6 (pg/ml)	15301 (3042-28900)	13473 (214-33191)	NS
IL8 (pg/ml)	12015 (8806-26907)	14997 (1773-28246)	NS

Results expressed as number of cases/total cases (percentage) or as *median values and range between brackets. BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; MC, mast cell; PB, peripheral blood.

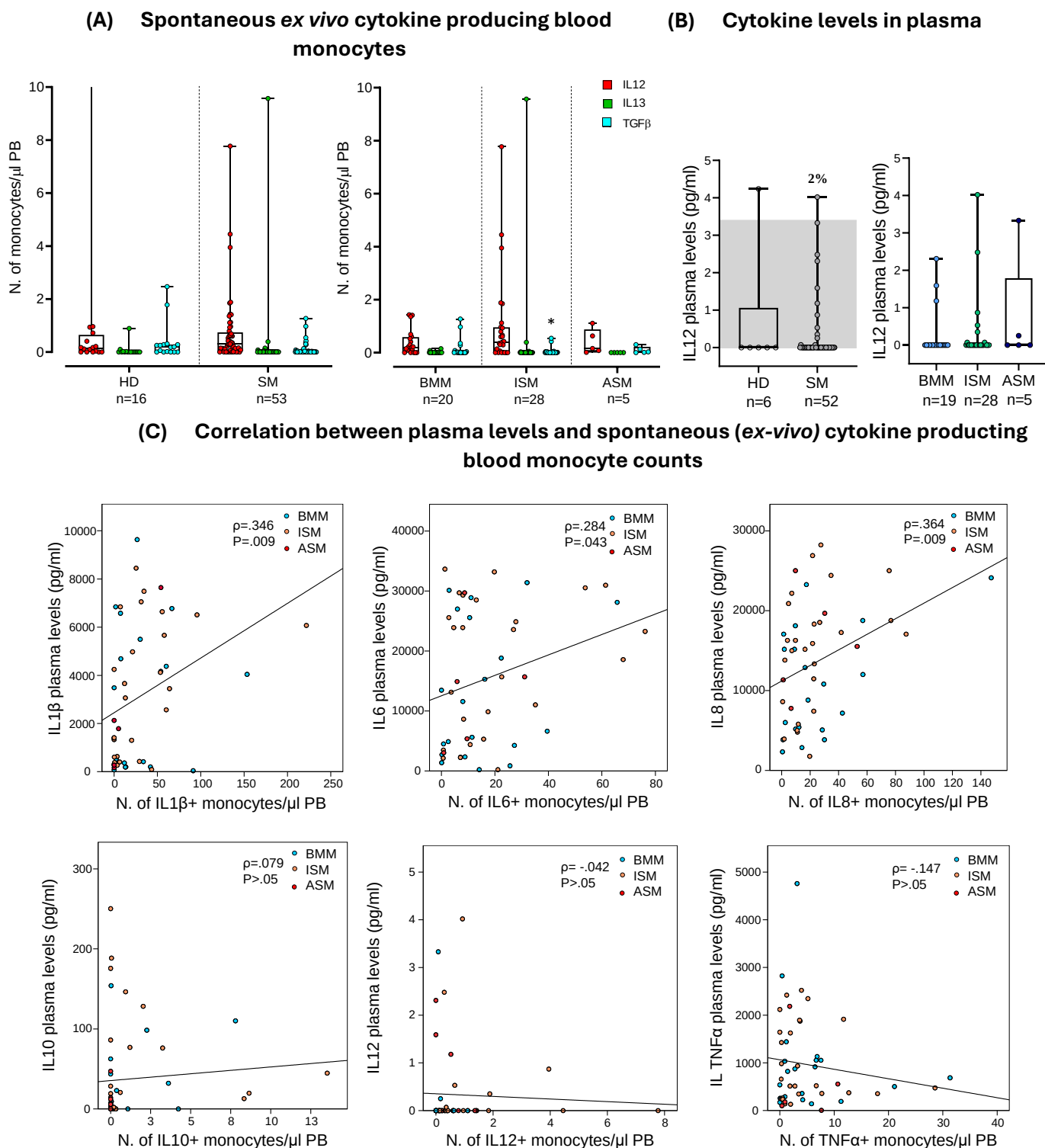


Figure_1_SupplInfo. Distribution of spontaneous (ex vivo) cytokine (IL1 β , IL1 γ and TGF β) producing monocytes (A) and cytokine plasma levels (B), and the correlation among them (C), in healthy donors (HD) vs systemic mastocytosis (SM) patients classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease. Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. The percentage depicts the percentage of SM patients with numbers above 95% of the HD. P-values: * <.05, ** <.010, *** <.001.

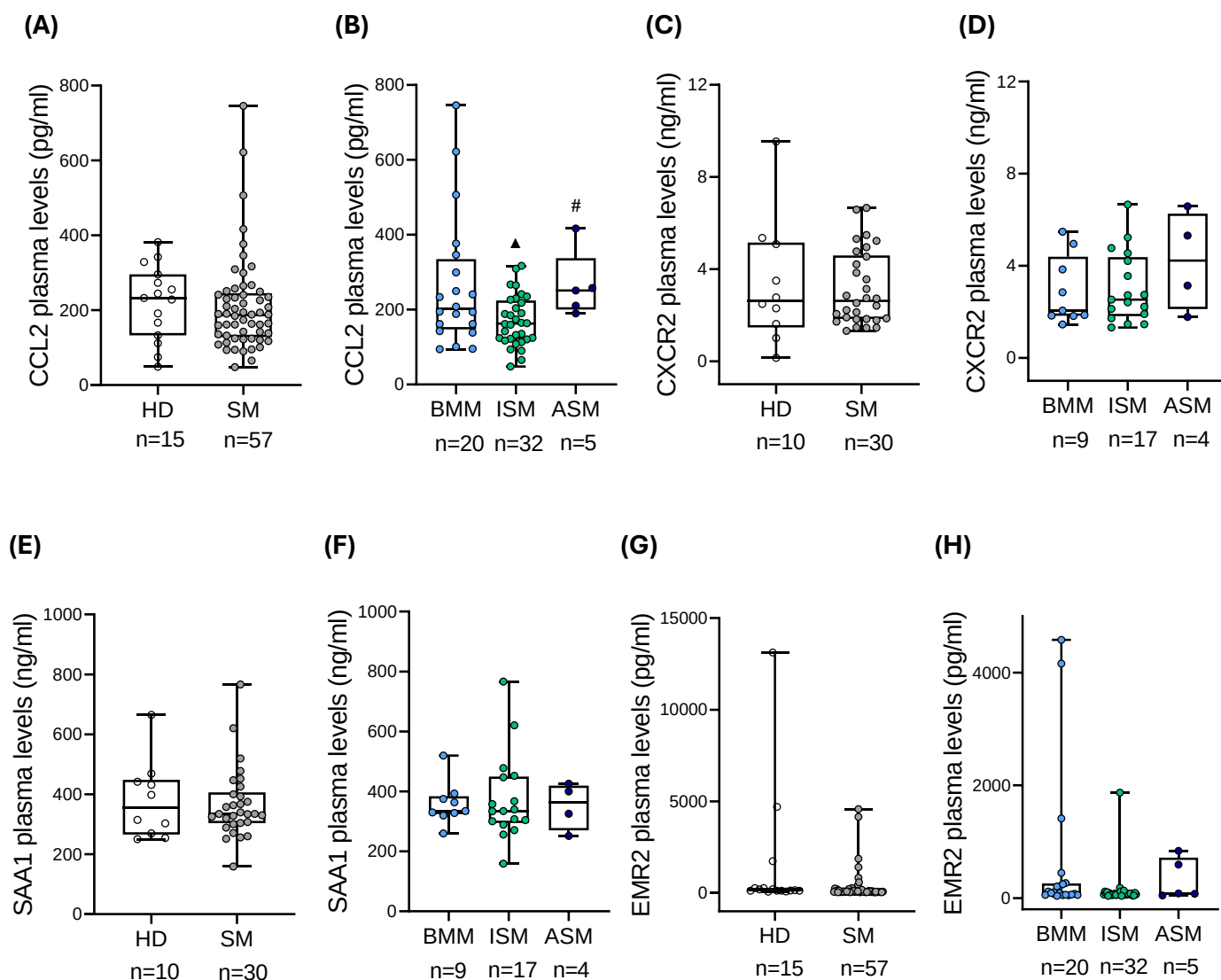


Figure 2_SupplInfo. CCL2, CXCR2, SAA1 and EMR2 plasma levels (A-H) in healthy donors (HD) vs systemic mastocytosis (SM) patients (A, C, E and G) classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease (B, D, F and H). Notched-boxes extend from 25th to 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. * vs HD, ▲ vs BMM, # vs ISM. P-values: * <.05, ** <.010, *** <.001, ▲ <.05, ▲▲ <.010, ▲▲▲ <.001, # <.05, ## <.010, ### <.001. BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis.

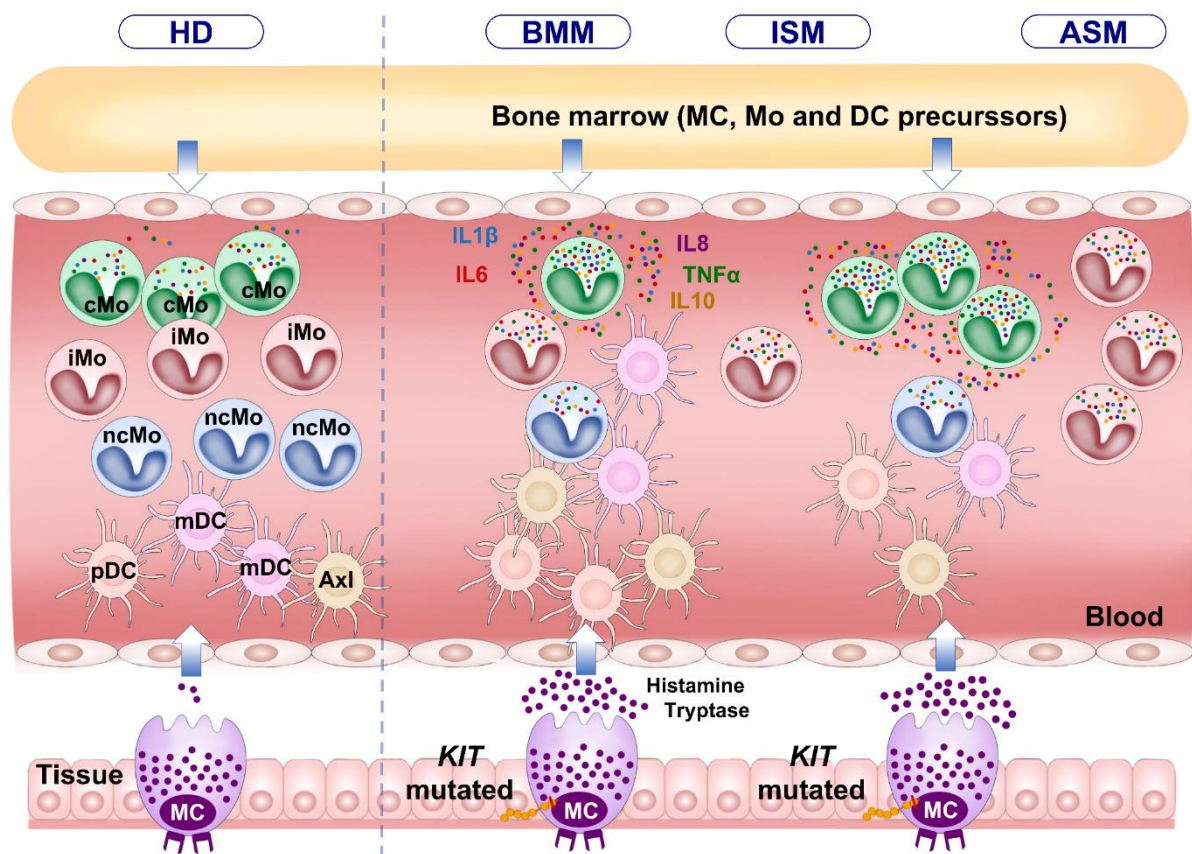


Figure_3_SupplInfo. Schematic graphical representation of the main results of this study associated with increased spontaneous cytokine production by blood monocytes, elevated cytokine plasma levels, and changes in the distribution of monocyte and dendritic cells observed in SM patients vs healthy donors, and their potential pathophysiologic implications.

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

Artículo 2:

“T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: Association with disease features”.

En este apartado se recoge la siguiente información (también disponible en la página web de la revista):

- i) Materiales y métodos suplementarios.
- ii) Resultados suplementarios
- iii) Tablas suplementarias (Tablas suplementarias 1 – 6).
- iv) Figuras suplementarias (Figuras suplementarias 1-3)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Title: “T-cell immune profile in blood of systemic mastocytosis: Association with disease features”

Alba Pérez-Pons, Cristina Teodosio, María Jara-Acevedo, Ana Henriques, Paula Navarro-Navarro, Andrés C. García-Montero, Iván Álvarez-Twose, Quentin Lecrevisse, Rafael Fluxa, Laura Sánchez-Muñoz, Carolina Caldas, Julio Pozo, Silvia Martín, Teresa Contreras-Sanfeliciano, Carlos E. Pedreira, Vitor Botofago, Oscar González-López, Andrea Mayado, Alberto Orfao

SUPPLEMENTARY METHODS

Flow cytometric identification of total lymphocytes, NK-cells, B-cells, T-cells and their subsets in blood. Briefly, lymphocytes were identified based on their unique (low) light scatter features and CD45^{hi} expression profile (Supplementary Figure 1A). For further, identification of the major populations of T-, B- and NK-cells, a combination of CD3 and CD185 was used. B-cells were identified as CD45^{hi} CD3⁻ CD185⁺ cells, NK-cells as CD45^{hi} CD3⁻ CD185^{-/+} lymphocytes, and T-cells displayed a characteristic CD45^{hi} CD3⁺ CD185⁻ immunophenotypic profile (Supplementary Figure 1A). Further discrimination between the major CD4⁻T-cytotoxic and CD4⁺ T-helper (Th) plus T-regulatory cell (Tregs) compartments was based on CD4 expression (Supplementary Figure 1B). Within TCD4⁺ cells, T-follicular helper cells (TFH) were identified as CD185⁺ TCD4⁺ cells while Tregs were defined as CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD127^{-/lo} cells, both populations being discriminated from all other TCD4⁺ cells (Supplementary Figure 1C). Subsequently, all above T-cell populations were further classified according to their maturation stage based on their pattern of expression for the CD27, CD62L and CD45RA markers and several chemokine receptors. Naive T-cells were identified as CD45RA^{hi} CD27^{hi} CD62L^{hi} cells lacking expression of the CD183, CD194, CD196 and CCR10 chemokine receptors; central memory (CM) T cells were CD45RA⁺

CD27⁺ CD62L⁺ and transitional memory (TM) T-cells displayed CD45RA⁺ CD27⁺ CD62L⁻ phenotype; in turn, effector memory (EM) T-cells had a CD45RA^{low+} CD27⁻ CD62L^{-/+} immunophenotype, terminal effector (TE) T-cells displayed a CD45RA⁺ CD27⁻ CD62L^{-/+} features and early cytotoxic TCD4⁻ cells had a CD27^{lo} CD45RA⁺ CD62L^{-/+} immunophenotypic profile (Supplementary Figure 1B). Except for naive cells, all other maturation-associated subsets of TCD4⁺ cells were further subclassified into their Th1 (CD183⁺ CD194⁻ CD196⁻ CCR10⁻), Th2 (CD183⁻ CD194⁺ CD196⁻ CCR10⁻), Th17 (CD183⁻ CD194⁺ CD196⁺ CCR10⁻), Th1/Th17 (CD183⁺ CD194⁻ CD196⁺ CCR10⁻), Th22 (CD183⁻ CD194⁺ CD196⁺ CCR10⁺), functional subpopulations (Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 2).

Quantification of cytokine levels in plasma. Soluble IL2, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13, IL17A, IL17F, IL22, IFN- γ and TNF α levels were quantified in plasma samples from a subset of 30 SM patients using the Human Th Cytokine Panel (12-plex) (BioLegend®, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. All samples were measured in duplicate and acquired in a 5-laser Aurora flow cytometer with the SpectroFlo® software. Data analysis was performed using the LEGENDplex analysis software v8.0 (BioLegend®, San Diego, CA) which allows to automatically distinguish between 12 different analytes on beads of different sizes that contain different (internal) fluorescent dyes.

Analysis of immunoglobulin levels in plasma. Peripheral blood samples were collected using EDTA-coated tubes. Briefly, fresh samples were centrifuged (10 min at 800 g), the platelet-rich plasma was collected and centrifuged again (5 min at 2000 g), and the supernatant stored immediately at -80°C, until analysis. Soluble IgA, IgG, and IgM were measured using conventional nephelometry (Dimension Vista; Siemens Healthcare, Erlanger, Germany).

Flow cytometric analysis of the expression of immune checkpoint markers on blood lymphocyte subsets. In a subgroup of 6 SM patients and 5 HD, expression of the programmed cell death protein 1 (PD-1) and its PD-L1 ligand was analysed on different stained maturation-associated T-cell subsets using a 3-laser flow cytometer (Cytek® Biosciences, Fremont, CA) equipped with the SpectroFlo® software (Cytek).

SUPPLEMENTARY RESULTS

Soluble cytokine levels in plasma of SM patients vs HD. Overall, SM patients displayed increased IL5 levels in plasma compared to the HD ($P=.035$), at the expense of ISM cases (Supplementary Figure 4). No other statistically significant differences were found for any of the other cytokine investigated.

Soluble immunoglobulin levels in plasma of SM patients. A tendency towards increased IgA immunoglobulin values was observed in ASM patients compared to both HD and the other diagnostic subtypes of the disease (i.e., BMM and ISM cases). However, no statistically differences were found for IgG, IgA and IgM immunoglobulin plasma values in between SM patients and HD, neither among BMM vs ISM vs ASM patients (Supplementary Figure 5). Likewise, no significant correlation was found between IgG, IgA, and IgM plasma neither with Th2 T-cell counts nor with the presence/ absence of specific clinical features such as anaphylaxis and Hymenoptera venom allergy (data not shown).

Expression profile of immune checkpoint markers in the different maturation-associated subsets of blood T-cells from SM patients. In order to further investigate whether the altered distribution in the different maturation associated subsets of blood T-cells was also associated with changes in the expression of immune checkpoints molecules such as PD-1 and PD-L1, we investigated the expression of PD-1 and PD-L1 in

blood of a subset of SM patients (n=6) and HD (n=5). Compared to HD, SM patients showed lower counts of PD-1⁺ TCD4⁻ naive (P=.011), TCD4⁻ EE (P=.028) and TCD4⁻ TM (P=.028) cells in association with normal PD-1⁺ levels among the distinct compartments of TCD4⁺ blood cells (Supplementary Figure 6). In contrast, no expression of PD-L1 protein was found (data not shown).

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Monoclonal antibody reagents used for the immunophenotypic analysis of the major populations of lymphocytes and the different subpopulations of TCD4⁺ and TCD4⁺ cells present in blood of systemic mastocytosis (SM) patients and healthy donors (HD).

Tube	Marker	Clone	Fluorochrome	Source
Euroflow-Immune monitoring (IMM) TCD4⁺	CD3	SK7	BV786	BD Biosciences^a
	CD4	SK3	APCH7	BD Biosciences
	CD25	4E3	VioBrightFITC	Miltenyi Biotec^b
	CD27	M-T27	BV421	BD Biosciences
	CD45	HI30	AF700	BD Biosciences
	CD45RA	HI100	BV510	BD Biosciences
	CD62L	DREG-56	BV650	Biolegend^c
	CD127	HIL7RM21	BV711	BD Biosciences
	CD183	1C6/CXCR3	PE	BD Biosciences
	CD185	REA103	APC	Miltenyi Biotec
	CD194	L291H4	PE-Cy7	Biolegend
	CD196	11A9	PE-CF594	BD Biosciences
	CCR10	1B5	PerCPcy5.5	BD Biosciences
Euroflow-Lymphocyte Screening Tube (LST)	CD20	L27	V450	BD Biosciences OneFlow LST™
	CD4	SK3	V450	
	CD45	2D	V500-C	
	CD8	SK1	FITC	
	Anti-λ	1-155-2	FITC	
	CD56	MY31	PE	
	Anti-κ	TB28-2	PE	
	CD5	L17F12	PerCPcy5.5	
	CD19	SJ25-C1	PE-Cy7	
	Anti-TCRγδ	11F2	PE-Cy7	
	CD3	SK7	APC	
	CD38	HB7	APCH7	

Abbreviations: AF700, Alexa Fluor 700; APC, allophycocyanine; BV, Brilliant Violet; PE, phycoerythrin; CF, Cyanine-based Fluorescent dye; Cy, cyanine; H7, Hilite®7; PerCP, peridinin chlorophyll protein; VioBrightFITC, VioBright fluorescein isothiocyanate; ^aBD Biosciences, Becton/Dickinson Biosciences (San Jose, CA); ^bMiltenyi Biotec (Cologne, Germany); ^cBiolegend (San Diego, CA).

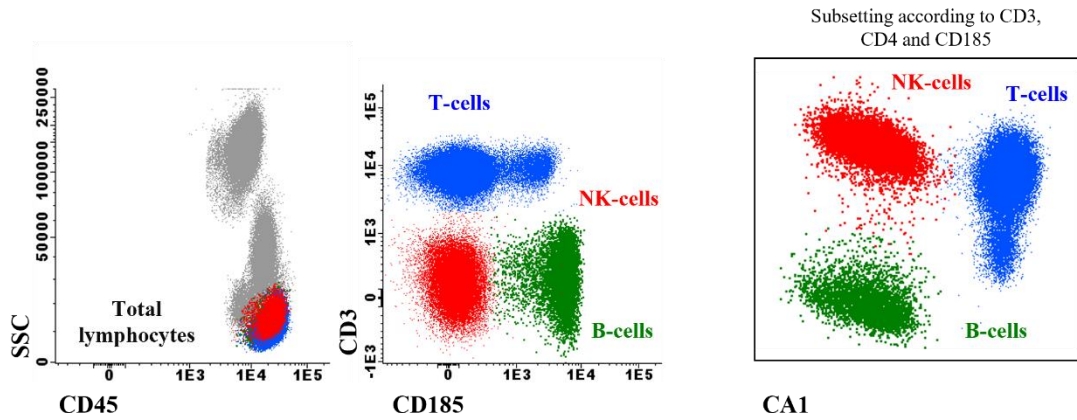
Supplementary Table 2. Absolute counts of NK-cells and T-cells and their respective subpopulations in blood of adult systemic mastocytosis (SM) patients (n=115) studied after diagnosis and distributed according to the distinct WHO 2022 diagnostic subtypes of disease compared to healthy donors (HD) (n=83).

Cell population	HD (n=83)	BMM (n=38)	ISM (n=67)	ASM (n=10)	P- value
NK-cells	300.3 (81.2-1326.1)	164.2 (79.5-477.0)	198.1 (30.5-654.6)	145.1 (0.0-276.4)	<0.004 [■]
T-cells	1587.0 (601.0-3419.0)	1710.9 (734.8-3996.9)	1447.6 (688.5-4457.0)	855.1 (127.2-3066.3)	<0.006 ^{†¶}
TCD4- cytotoxic cells	576.2 (106.0-1974.3)	534.9 (262.0-2129.5)	448.3 (145.3-1940.7)	283.2 (0.0-1353.5)	<0.013 ^{†‡}
CD4 ⁺ naive	29.3 (3.0-286.3)	116.8 (12.6-753.3)	92.8 (10.4-464.5)	20.1 (0.0-150.9)	<0.007 ^{†¶¶}
TCD4- EE	27.6 (1.6-297.9)	17.6 (3.2-137.8)	15.6 (1.6-150.0)	14.5 (0.0-136.7)	0.002 [†]
TCD4- CM	181.6 (37.1-589.9)	89.3 (30.3-375.8)	86.1 (0.3-690.3)	54.8 (0.0-320.6)	<0.001 [■]
TCD4- TM	102.2 (18.2-357.8)	77.0 (15.3-399.8)	87.5 (16.5-299.1)	51.3 (0.0-469.2)	<0.023 ^{†‡}
TCD4- EM	41.2 (3.6-883.0)	47.9 (8.7-190.9)	45.0 (1.9-238.6)	35.5 (0.0-189.5)	NS
TCD4- TE	95.7 (1.7-1019.8)	71.3 (5.0-1178.6)	52.6 (0.6-1321.0)	75.4 (0.0-374.8)	0.018 [†]
TCD4⁺ helper cells	975.0 (399.8-2628.0)	1139.3 (470.7-2432.7)	978.2 (485.5-2516.5)	524.9 (73.0-1715.2)	<0.019 ^{†¶□}
Naive TCD4⁺ cells	322.0 (25.4-1432.0)	297.3 (89.2-1209.3)	298.7 (0.0-778.4)	72.9 (0.9-349.7)	<0.011 ^{†¶}
Total Th1 cells	112.5 (18.0-704.0)	108.9 (18.0-516.2)	77.7 (0.0-1198.0)	49.5 (0.8-125.6)	<0.005 ^{†‡§¶}
Th1 CM	43.6 (10.4-278.0)	50.3 (13.1-156.4)	38.1 (0.0-127.1)	19.0 (0.6-57.7)	<0.034 ^{†‡¶}
Th1 TM	11.9 (0.0-81.8)	9.0 (1.2-42.5)	7.9 (0.0-35.7)	4.3 (0.1-10.1)	<0.026 ^{■¶□}
Th1 TE	7.3 (0.0-415.0)	2.9 (0.1-199.8)	1.8 (0.0-367.6)	7.6 (0.0-21.8)	0.012 [†]
Total Th2 cells	48.7 (16.8-221.0)	60.9 (22.2-1086.4)	53.1 (0.0-152.6)	35.8 (0.0-125.1)	<0.031 ^{†¶□}
Th2 CM	39.1 (9.4-216.0)	52.3 (19.7-1061.5)	46.9 (0.0-134.6)	29.0 (0.0-95.9)	<0.044 ^{¶□}
Th2 EM	3.8 (0.0-14.0)	3.9 (0.3-26.5)	2.9 (0.2-27.6)	1.8 (0.0-7.1)	<0.029 ^{†‡¶}
Th2 TE	0.1 (0.0-7.0)	0.1 (0.0-23.5)	0.0 (0.0-6.8)	0.1 (0.0-16.1)	<0.025 ^{†§}
Total Th22 cells	11.7 (3.2-40.2)	14.0 (2.8-47.1)	12.9 (1.6-49.1)	12.0 (0.0-46.8)	NS
Th22 TE	0.2 (0.0-2.6)	0.2 (0.0-3.9)	0.1 (0.0-1.1)	0.1 (0.0-3.7)	<0.008 ^{†§}
Total Th1/Th17 cells	55.5 (0.5-275.7)	73.4 (9.3-391.4)	67.7 (5.4-211.8)	38.6 (0.0-114.9)	0.021 [□]
Th1/Th17 CM	24.6 (0.3-104.6)	33.9 (4.6-142.2)	29.9 (0.0-122.8)	17.4 (0.0-45.0)	<0.036 ^{†□}
Th1/Th17 TM	22.4 (0.1-121.0)	26.4 (3.0-122.2)	27.3 (1.2-94.7)	10.8 (0.0-48.4)	0.021 [□]
TFH cells	121.0 (22.4-325.0)	158.8 (61.9-416.9)	151.6 (43.3-353.5)	94.5 (8.9-543.7)	<0.047 ^{††¶□}
Naive TFH	7.7 (0.2-53.7)	15.4 (1.7-37.2)	12.9 (0.0-35.8)	2.5 (0.1-39.7)	<0.038 ^{■¶□}
Treg-TFH	13.5 (0.0-62.6)	25.5 (4.4-75.4)	21.4 (0.0-73.9)	20.9 (0.8-122.7)	<0.001 ^{††}
Th1-like TFH	14.2 (2.3-52.1)	15.9 (2.5-55.3)	14.2 (0.3-46.4)	5.4 (0.2-30.5)	<0.004 ^{†¶□}
Th2-like TFH	9.8 (1.5-52.4)	12.4 (4.1-41.1)	10.6 (2.4-28.4)	5.5 (0.1-38.4)	0.039 [¶]
Th17-like TFH	24.0 (4.3-84.3)	36.7 (8.7-105.9)	31.2 (9.6-96.2)	13.4 (0.1-116.8)	<0.041 ^{†¶□}
Th1/Th17-like TFH	5.4 (0.0-40.7)	6.3 (0.8-23.9)	5.7 (0.3-20.1)	2.5 (0.0-17.4)	<0.036 ^{†¶□}
Treg cells	58.9 (22.1-151.0)	66.0 (14.8-162.2)	51.6 (17.0-149.8)	31.1 (9.0-120.9)	<0.029 ^{†¶§}
Naive Tregs	8.3 (0.5-37.7)	8.2 (0.8-34.3)	7.4 (0.0-125.5)	1.8 (0.0-16.0)	<0.029 ^{†¶□}
TH1-like Tregs	3.3 (0.2-15.9)	2.8 (0.1-11.7)	2.3 (0.1-13.3)	1.5 (0.0-10.0)	<0.001 [†]
TH2-like Tregs	4.5 (0.0-17.6)	6.2 (1.1-19.3)	4.1 (1.0-12.7)	3.1 (0.0-14.5)	<0.02 ^{†§}
TH17-like Tregs	10.0 (2.0-39.3)	12.0 (4.1-35.4)	8.7 (2.7-31.1)	8.0 (0.0-27.5)	<0.045 ^{§¶}
TH22-like Tregs	6.4 (1.6-17.6)	7.5 (1.5-21.2)	5.4 (1.2-17.1)	5.6 (0.0-10.9)	<0.044 ^{†§}

Results expressed as median (cell/ μ l) values and range between brackets. HD, healthy donor; SM, systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; NS, statistically not significantly different ($P>.05$); * HD vs BMM; † HD vs ISM, ‡ HD vs ASM patients, § BMM vs ISM patients, ¶ BMM vs ASM patients; □ ISM vs ASM; ■ HD vs all SM.

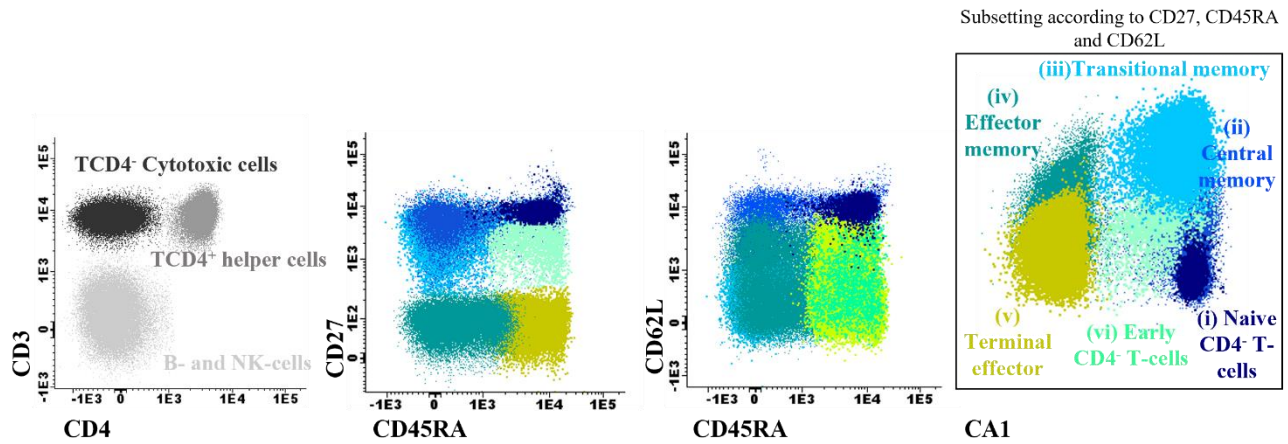
Major lymphocyte populations

A



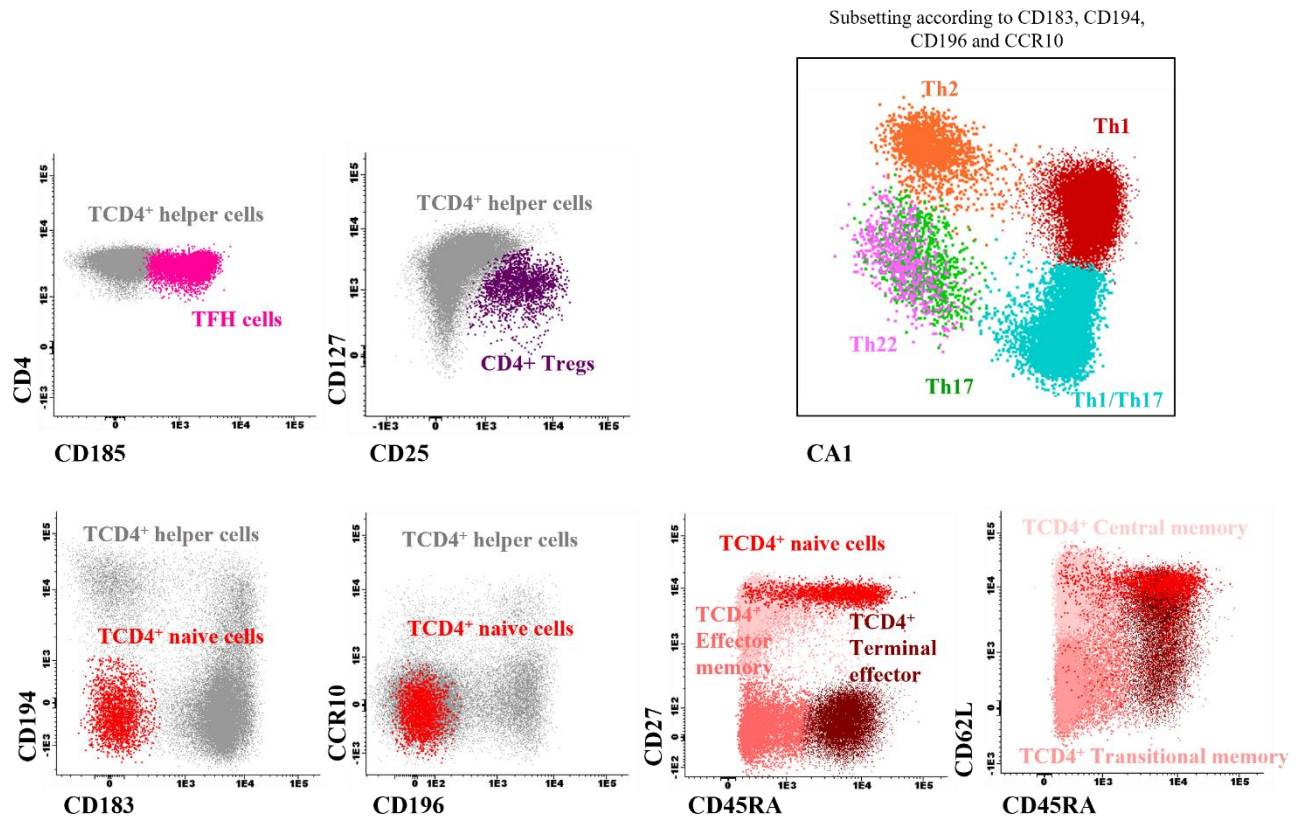
B

Maturation-associated T cytotoxic and T helper cell populations

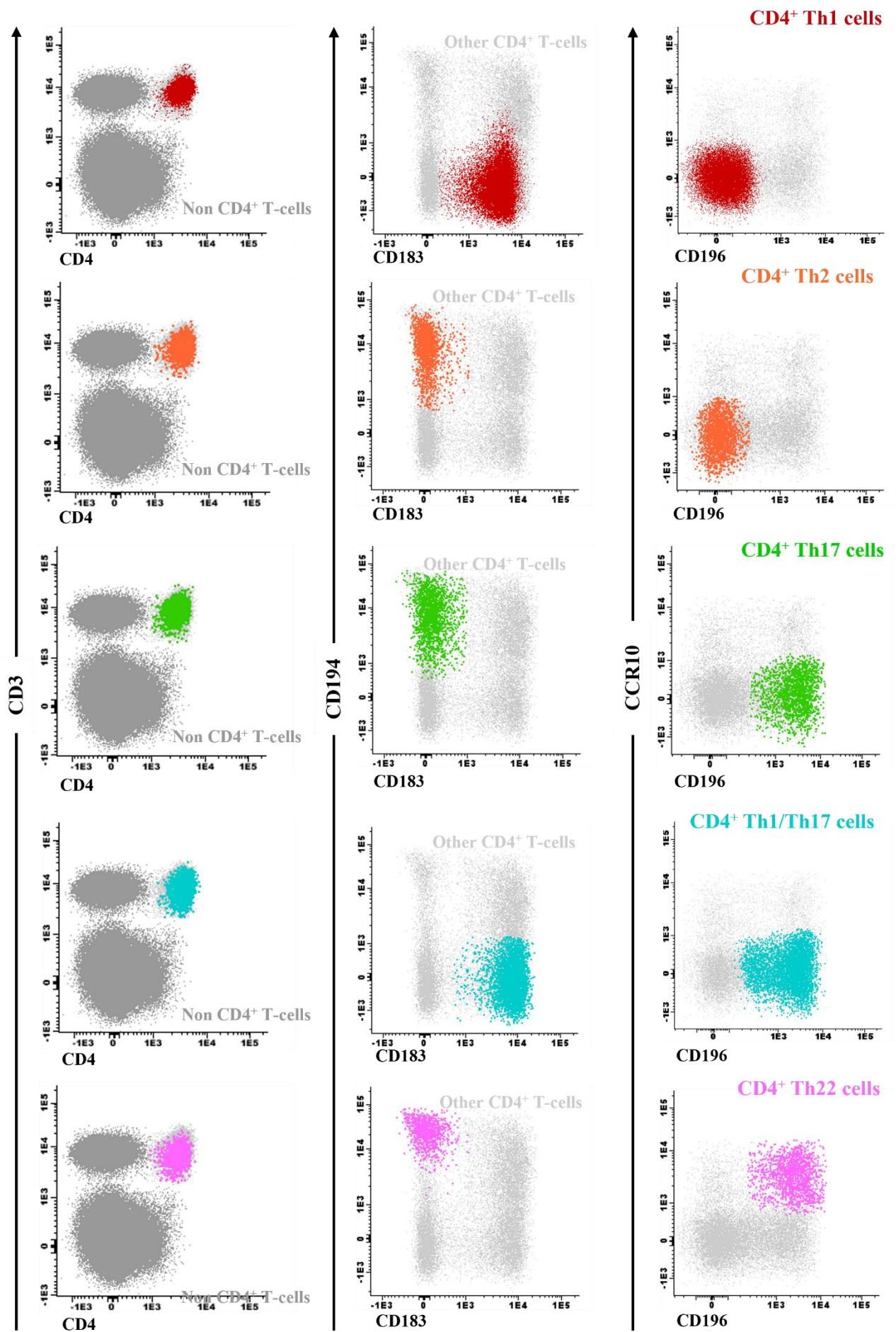


C

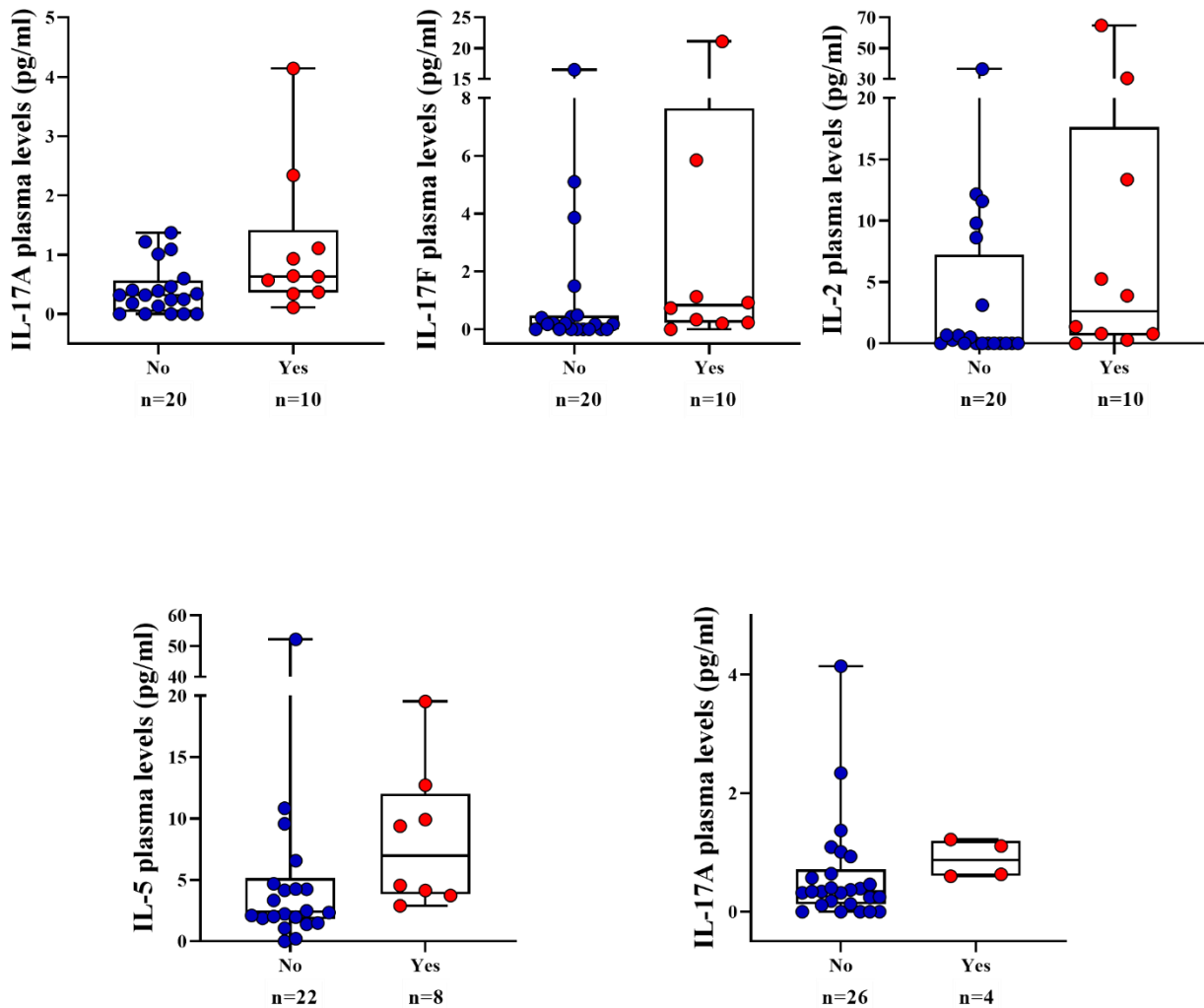
CD4⁺ T-cell populations



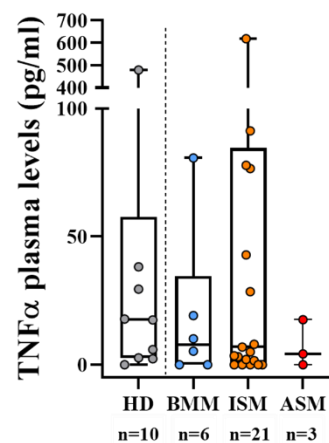
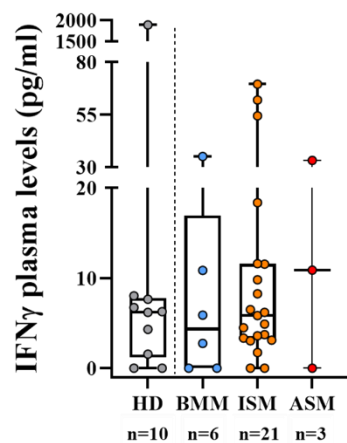
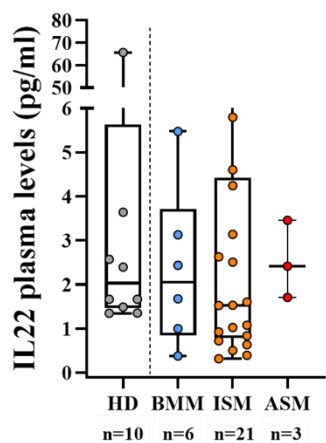
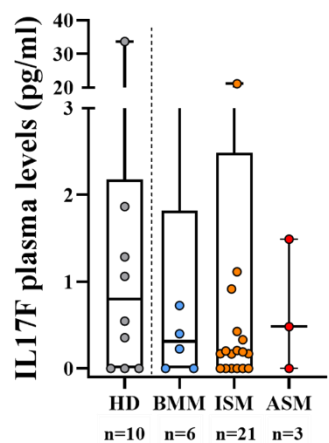
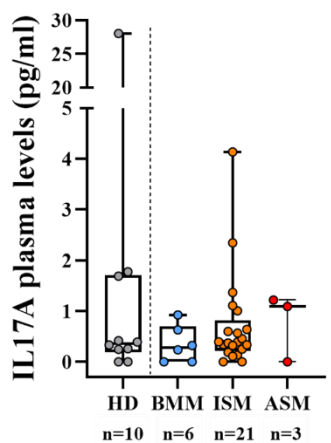
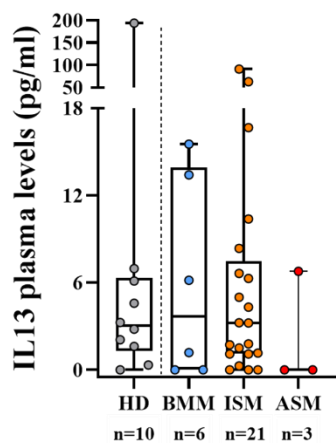
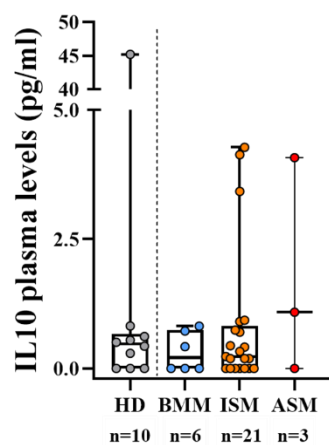
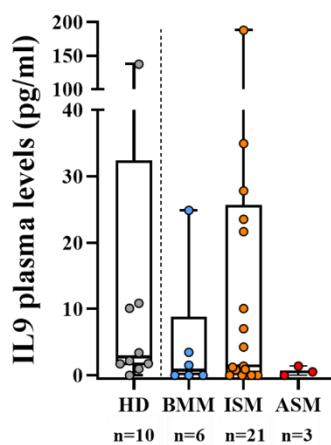
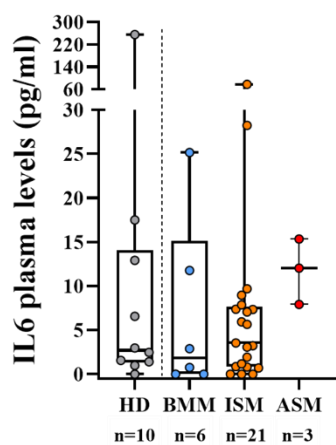
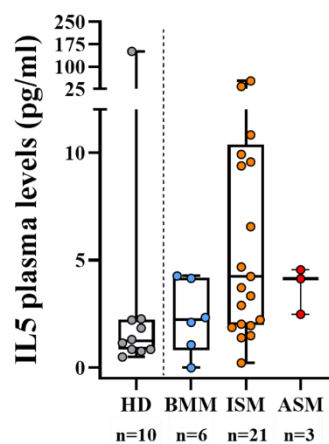
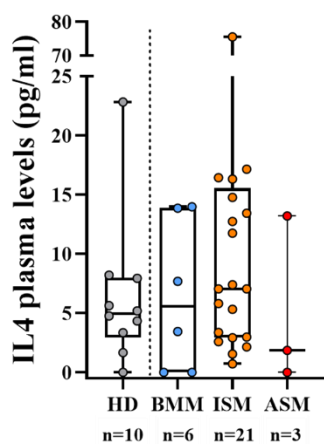
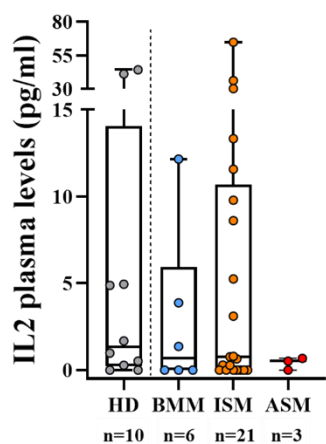
Supplementary Figure 1. Illustrating example on how the major populations of NK-, B- and T-cells and their maturation-associated and functional subsets present in blood (PB) of systemic mastocytosis patients (SM) and healthy donors (HD) were identified using the EuroFlow Immune Monitoring (IMM) TCD4 tube. Sequential gating strategy based on the CD3, CD45, and CD185 markers was first used for the identification of the major populations of T-, B- and NK-cells (panel A). In panel B the gating strategy used for the discrimination within CD3⁺ T-cells, and their major TCD4⁻ and TCD4⁺ subsets, [including the distinct maturation-associated compartments of T-cytotoxic -naïve cells, (CD27⁺CD45RA⁺CD62L⁺); central memory, (CD27⁺CD45RA⁻CD62L⁺); transitional memory, (CD27⁺CD45RA⁻CD62L⁻); effector memory, (CD27⁻CD45RA⁻CD62L⁺); terminal effector, (CD27⁻CD45RA⁺CD62L⁻) and for early effector cytotoxic (CD27⁺CD45RA⁺) T-cells] is shown. In panel C the strategy used for the discrimination between TCD4⁺ naïve cells, T-regulatory (Treg), T-follicular helper (TFH) and T helper (Th) cells, including their Th1, Th2, Th17, Th22 and Th1/Th17 subsets and maturation-associated compartments of central memory, transitional memory, effector memory and terminal effector cells, is illustrated based on conventional 2-D dot plots and multivariate canonical analysis (CA) 2-D plots.



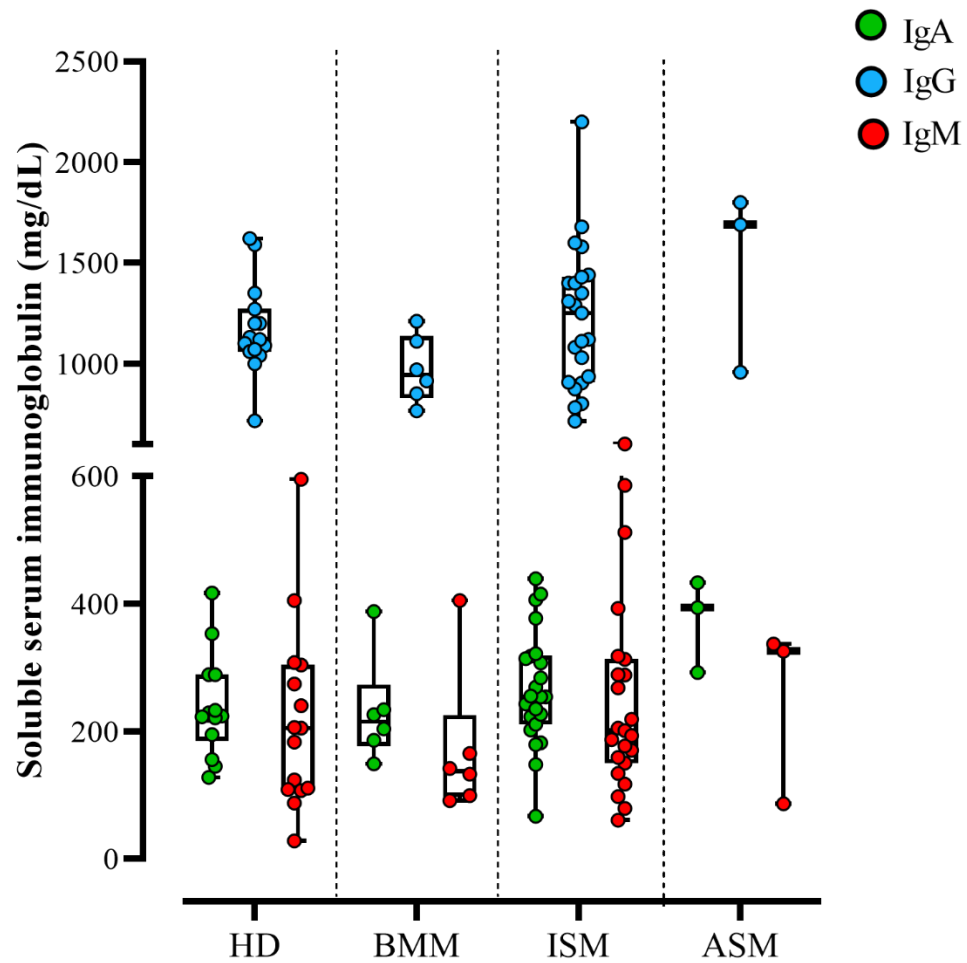
Supplementary Figure 2. Gating strategy used to identify TCD4+ Th1 cells (A), Th2 cells (B), Th17 cells (C), Th1/Th17 (D) and Th22 cells (E), based on the pattern of expression on the cell surface membrane of the CD3, CD4, CD183, CD185, CD194, CD196 and CCR10 marker proteins by flow cytometry.



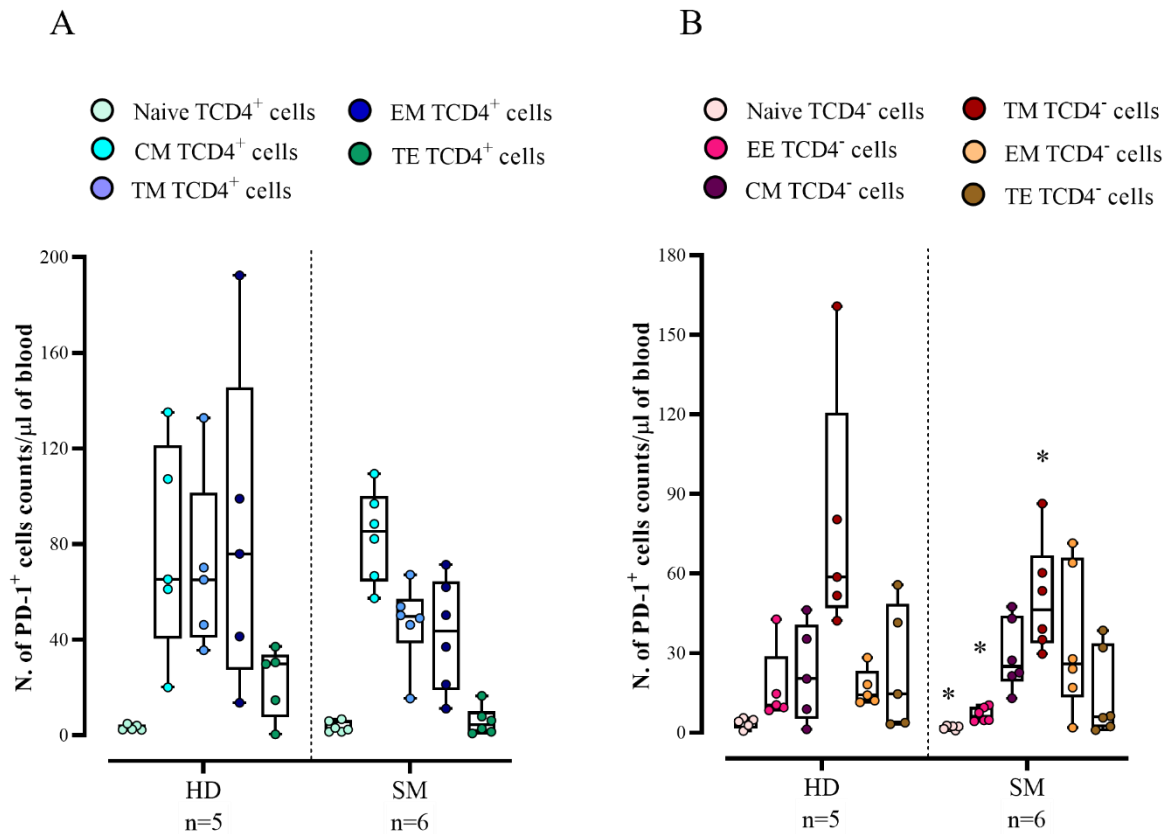
Supplementary Figure 3. Soluble cytokine levels in plasma of SM patients classified according to the presence vs absence of osteoporosis (A), osteosclerosis (B) and Hymenoptera venom allergy (HVA; C). Notched-boxes extend from the 25th to the 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analysed. Red circles; indicate presence of each disease feature while blue circles indicate absence of each disease feature. P-value: * <.05 vs HD.



Supplementary Figure 4. Soluble cytokine levels in plasma of HD and SM patients classified according to the distinct diagnostic subtypes of the disease. Notched-boxes extend from the 25th to the 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analysed. Gray dots depict healthy donors, blue dots correspond to bone marrow mastocytosis cases, orange dots show indolent systemic mastocytosis patients, and red dots depict aggressive systemic mastocytosis cases. * P-values: <.05 vs HD. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis.



Supplementary Figure 5. Soluble IgG, IgA and IgM levels (mg/dL) in plasma of HD and SM patients distributed according to the distinct diagnostic subtypes of the disease. Notched-boxes extend from the 25th to the 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and the 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. ASM, aggressive systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; HD, healthy donor; ISM, indolent systemic mastocytosis.



Sypplementary Figure 6. Expression profile of PD-1 on different maturation-associated T-cell populations present in blood of systemic mastocytosis (SM) patients (n=6) and healthy donors (HD) (n=5). In panel A, notched-boxes extend from the 25th to the 75th percentile values, the lines in the middle and vertical lines correspond to median values and the 10th and 90th percentiles, respectively, while dots represent each individual case analyzed. * P-values: <.05, vs HD. CM, central memory; EE, early effector; EM, effector memory; TE, terminal effector; TM, transitional memory.

MATERIAL SUPLEMENTARIO CORRESPONDIENTE AL

Artículo 3:

“Altered B-cell, plasma cell and antibody immune profiles in blood of systemic mastocytosis”.

En este apartado se recoge la siguiente información (también disponible en la página web de la revista):

- i) Materiales y métodos suplementarios.
- ii) Tablas suplementarias (Tablas suplementarias 1 – 6).
- iii) Figuras suplementarias (Figura 1-3)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Title: “Altered B-cell, plasma cell and antibody immune profiles in blood of systemic mastocytosis”

Alba Pérez-Pons, Ana Henriques, Teresa Contreras-Sanfeliciano, María Jara-Acevedo, Paula Navarro-Navarro, Andrés C. García-Montero, Iván Álvarez-Twose, Quentin Lecrevisse, Rafael Fluxa, Laura Sánchez-Muñoz, Carolina Caldas, Julio Pozo, Óscar González-López, Martín Pérez-Andrés, Andrea Mayado, Alberto Orfao

SUPPLEMENTARY METHODS

Flow cytometry identification and quantification of B-cells, plasma cells and their subsets in blood and bone marrow. Briefly, blood circulating B-cells and PC were both identified based on their unique (low and intermediate) light scatter features and CD45^{int-hi} CD19⁺ CD38^{-/lo} vs CD38^{hi} expression profile, respectively (Supplementary Figure 1A). For further dissection of B-cells and PC into their major maturation-associated compartments, the CD5, CD21, CD24, CD27, CD38 and surface membrane (sm) IgM markers were used. Thus, PC were defined by their unique CD38^{hi} CD27⁺⁺ CD24⁻ CD21⁻ CD5⁻ CD19^{lo} phenotype (grouped into immature CD20⁺ CD138⁻, intermediate CD20⁻ CD138⁻ and mature CD20⁻ CD138⁺ PC) and separated from all other CD19⁺ B-lymphocytes CD38^{-/lo} (Supplementary Figure 1A). Subsequently, pre-germinal center B-lymphocytes (immature plus naive B-cells) were identified as CD27⁻ smlgM⁺ CD5^{-/+} B-cells, and further discriminated into CD38⁺⁺ CD24^{hi} immature and CD38⁻ CD24^{het} naive B-cells (Supplementary Figure 1A). Naive B-lymphocytes were divided into CD5⁺ and CD5⁻ B-lymphocytes (Supplementary Figure 1A). Then, unswitched memory B-cells (MBC) were identified by their unique CD38^{lo} CD27⁺ smlgM⁺⁺ phenotype, and separated from CD27^{-/+} CD38^{lo} smlgMD⁻ switched MBC (Supplementary Figure 1A). Both MBC and PC were further subclassified according to their

smlgH phenotype into smlgMD⁺, smlgD⁺-only, smlgA₁⁺, smlgA₂⁺, smlgG₁⁺, smlgG₂⁺, smlgG₃⁺ and smlgG₄⁺ MBC, and into IgM⁺, IgD⁺, IgA₁⁺, IgA₂⁺, IgG₁⁺, IgG₂⁺, IgG₃⁺ and IgG₄⁺ PC, respectively (Supplementary Figure 1B).

For BM samples, B-cell precursors (BCP) and mature B-lymphocytes were identified based on their positivity for CD19⁺, heterogenous pattern of expression of CD45^{het} in BM and (low) light scatter features, while PC were defined by their unique CD38^{hi} expression and intermediate light scatter characteristics (Supplementary Figure 2A). Further discrimination between BCP and mature B-lymphocytes was based on a combination of CD5, CD20, CD38, CD45 and the κ/λ smlg light chain (SmlgLC) expression profile. These included pro-B (CD38⁺⁺ CD45⁺ CD5⁻ smlgLC⁻) BCP and pre-B (CD38⁺⁺ CD45⁺⁺ CD5⁻ smlgLC⁻) BCP, in addition to three different subsets of progressively more mature pre-germinal center (CD38^{het} CD45⁺⁺, CD5^{-/low}, smlgκ⁺ or smlgλ⁺) B-lymphocytes; i) immature-I CD38⁺⁺ CD45⁺⁺ CD5⁻ CD20^{-/low} smlgκ⁺ or smlgλ⁺; and, ii) CD38^{+/++} CD45⁺⁺, CD5⁻, CD20^{low/+}, smlgκ⁺ or smlgλ⁺ immature-II B-lymphocytes; in addition to, iii) naive CD38⁻ CD45⁺⁺⁺ CD20⁺ smlgκ⁺ or smlgλ⁺ B-lymphocytes (Supplementary Figure 2B-C). As for blood samples, BM naive B-lymphocytes were further subdivided into CD5⁺ and CD5⁻ naive B-cells (Supplementary Figure 2B-C). Finally, three different maturation-associated subsets of PC were defined in BM according to their differential expression of CD19 and CD20: CD20⁺ CD19⁺ plasmablasts, intermediate CD20⁻ CD19⁺ PC and mature CD20⁻ CD19⁻ PC (Supplementary Figure 2D).

Molecular analysis of the KIT mutational status and TPSAB1 genotype. The *KIT*^{D816V} mutation was investigated in genomic (g) DNA from whole BM nucleated cells and FACS-purified (≥97% purity) BM MC, eosinophils, monocytes, neutrophils, CD34⁺ hematopoietic precursors cells (HPC) and T-lymphocytes from each SM patient, using an allele-specific oligonucleotide quantitative polymerase chain reaction (ASOqPCR) approach (1) and a

peptide nucleic acid (PNA)-mediated PCR-clamping method (2, 3, 4), respectively. In turn, the TPSAB1 genotype of individual patients was assessed in gDNA from a subset of 85 SM patients, based on a quantitative real-time digital PCR (qdPCR) technique (5, 6) using the Biomark™ HD system (Standard BioTools, San Francisco, CA) and the Digital PCR Analysis Software (Standard BioTools). Hereditary α -tryptasemia (HaT) was defined whenever ≥ 3 copies of the α -tryptase gene allele, or 2 copies of the α -tryptase gene allele in the presence of 3 copies of the β -tryptase gene, were found, following previously established criteria (6).

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez-Muñoz L, Álvarez-Twose I, Mayado A, Caldas C, et al. Detection of the KIT D816V mutation in peripheral blood of systemic mastocytosis: diagnostic implications. *Mod Pathol*. 2015 Aug;28(8):1138-49. doi: 10.1038/modpathol.2015.72.
2. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A 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 Oct 1;108(7):2366-72. doi: 10.1182/blood-2006-04-015545.
3. Sotlar K, Escribano L, Landt O, Möhrle S, Herrero S, Torrelo A, 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 Mar;162(3):737-46. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63870-9.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
5. Lyons JJ, Yu X, Hughes JD, Le QT, Jamil A, Bai Y et al. Elevated basal serum tryptase identifies a multisystem disorder associated with increased TPSAB1 copy number. *Nat Genet*. 2016 Dec;48(12):1564-1569. doi: 10.1038/ng.3696.
6. Hernández-Hernández L, Sanz C, Marcos-Vadillo E, García-Sánchez A, Moreno E, Lorente F et al. Increased TPSAB1 Copy Number in a Family With Elevated Basal Serum Levels of Tryptase. *Front Med*. 2021 Apr 13;8:577081. doi: 10.3389/fmed.2021.577081.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Demographic, clinical and laboratory findings at diagnosis in adult systemic mastocytosis patients distributed according to the distinct WHO 2022 diagnostic subtypes of the disease (n=109).

Variable	SM (n=108)	BMM (n=35)	ISM (n=64)	ASM (n=9)	P value
Age (y)*	55 (27-77)	54 (34-74)	55 (27-76)	63 (44-77)	<0.040 [‡]
Sex (M/F)	44/64 (40.7%/59.3%)	17/18 (48.6%/51.5%)	22/42 (34.4%/65.6%)	5/4 (55.6%/44.4%)	NS
Anaphylaxis	62 (57.4%)	33 (94.3%)	25 (39.1%)	4 (44.4%)	<0.001 ^{††}
Skin lesions	72 (67.9%)	0 (0%)	64 (100%)	8 (88.9%)	<0.001 ^{††}
Venom allergy	25 (23.1%)	16 (45.7%)	8 (12.5%)	1 (11.1%)	<0.001 [†]
Osteopenia	46 (42.6%)	18 (51.4%)	27 (42.2%)	1 (11.1%)	0.029 [‡]
Osteoporosis	23 (21.3%)	6 (17.1%)	17 (26.6%)	0 (0%)	NS
Bone sclerosis	19 (17.6%)	1 (2.9%)	11 (17.2%)	7 (77.8%)	<0.037 [¶]
<i>H. Pylori</i> infection	14 (13%)	1 (2.9%)	12 (18.8%)	1 (11.1%)	0.025 [†]
Pruritus	55 (50.9%)	11 (31.4%)	38 (59.4%)	6 (66.7%)	0.008 [†]
Flushing	41 (38%)	9 (25.7%)	27 (42.2%)	5 (55.6%)	NS
GI symptoms	38 (35.2%)	10 (28.6%)	21 (32.8%)	7 (77.8%)	<0.009 ^{‡§}
HaT ⁺ genotype	12/83 (14.5%)	6/24 (25%)	4/50 (8%)	2/9 (22.2%)	0.045 [†]
Hemoglobin (g/l)*	139 (89-168)	145 (97-167)	138 (119-168)	113 (89-137)	<0.025 [¶]
N. of platelets (x10 ⁹ /l)*	227 (62-385)	218 (141-306)	231 (111-342)	225 (62-385)	NS
N. of leucocytes (x10 ⁹ /l)*	6200 (2500-13,100)	6300 (2800-10,000)	6150 (4000-13,100)	5000 (2500-11,200)	NS
Serum baseline tryptase (ng/ml)*	39.3 ± (4.1-1317)	18 (4.1-92.2)	58.9 (7.7-400)	259.5 (89.5-1317)	<0.001 [¶]
Serum LDH (U/l)	139 (84-432)	151 (106-432)	135 (91-277)	115.5 (84-317)	<0.046 ^{††}
SAP (U/l)	70 (32-499)	67 (36-120)	70.5 (32-177)	134.5 (95-499)	<0.001 ^{‡§}
Serum β-2- microglobulin (μg/ml)	2.1 (1.6-15)	2 (1.6-4.4)	2.1 (1.3-3.5)	3.1 (2.6-15)	<0.001 ^{‡§}
<i>KIT</i> ^{D816V} mutation	106 (98.1%)	33 (94.4%)	64 (100%)	9 (100%)	NS
Other <i>KIT</i> mutations (D816H and D816Y)	2 (1.8%)	2 (5.6%)	0 (0%)	0 (0%)	NS
% of BMMC* by FCM	0.1 (0-8.6)	0.05 (0-0.3)	0.14 (0.01-1.6)	1.7 (0.03-8.6)	<0.002 [¶]

Results expressed as number of cases (percentage) or as median (range). SM, systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; y, years; M, male; F, female; LDH, lactate dehydrogenase; SAP, serum alkaline phosphatase; BM, bone marrow; MC, mast cell; FCM, flow cytometry; NS, statistically not significantly different ($P>.05$); † BMM vs ISM patients, ‡ BMM vs ASM patients, § ISM vs ASM patients, ¶ all SM (BMM, ISM and ASM) patient groups.

Supplementary Table 2. Monoclonal antibody reagents included in the 14-color Euroflow-Immune monitoring (IMM) IgH-isotype-B-cell tube and the Euroflow-Lymphocyte Screening Tube (LST) employed for the immunophenotypic identification and characterization of the major B-cell and plasma cell populations present in blood and bone marrow, respectively, of systemic mastocytosis (SM) patients and healthy donors (HD).

Tube	Marker	Clone	Fluorochrome	Source
Euroflow-Immune monitoring (IMM) IgH-isotype-B-cell tube	CD5	L17F12	PECy7	BD Biosciences ^a
	CD19	SJ25C1	BV786	BD Biosciences
	CD20	2H7	PECF594	BD Biosciences
	CD21	Bly4	BV711	BD Biosciences
	CD24	ML5	BV650	BD Biosciences
	CD27	MT271	BV421	BD Biosciences
	CD38	HB7	APCH7	BD Biosciences
	CD45	HI30	AF700	BD Biosciences
	CD62L	DREG-56	BV605	Biolegend ^b
	CD138	MI15	PECy7	Biolegend
	smlgM	MHM-88	BV510	Biolegend
	cylgM	MHM-88	BV510	Biolegend
	smlgD	IA6-2	FITC	Biolegend
	cylgD	IA6-2	FITC	Biolegend
	smlgD	IA6-2	APC	BD Biosciences
	cylgD	IA6-2	APC	BD Biosciences
	smlg Cocktail*			Cytognos ^c
	cylg Cocktail*			Cytognos
Euroflow Lymphocyte Screening Tube (LST)	CD20	L27	V450	BD Biosciences OneFlow LST™ reagent kit
	CD4	SK3	V450	
	CD45	2D	V500-C	
	CD8	SK1	FITC	
	Anti-λ	1-155-2	FITC	
	CD56	MY31	PE	
	Anti-κ	TB28-2	PE	
	CD5	L17F12	PerCPcy5.5	
	CD19	SJ25-C1	PE-Cy7	
	Anti-TCRγδ	11F2	PE-Cy7	
	CD3	SK7	APC	
	CD38	HB7	APCH7	

*Ig cocktail contains the following antibody-fluorochrome (clone) reagents: IgG₃-FITC (SAG3), IgG₂-FITC (SAG2), IgA₁-PerCPcy5.5 (SAA1), IgA₂-PerCPcy5.5 (SAA2), IgG₁-PE (SAG1), IgG₂-PE (SAG2), IgA₁-APC (SAA1), IgG₄-APC (SAG4).

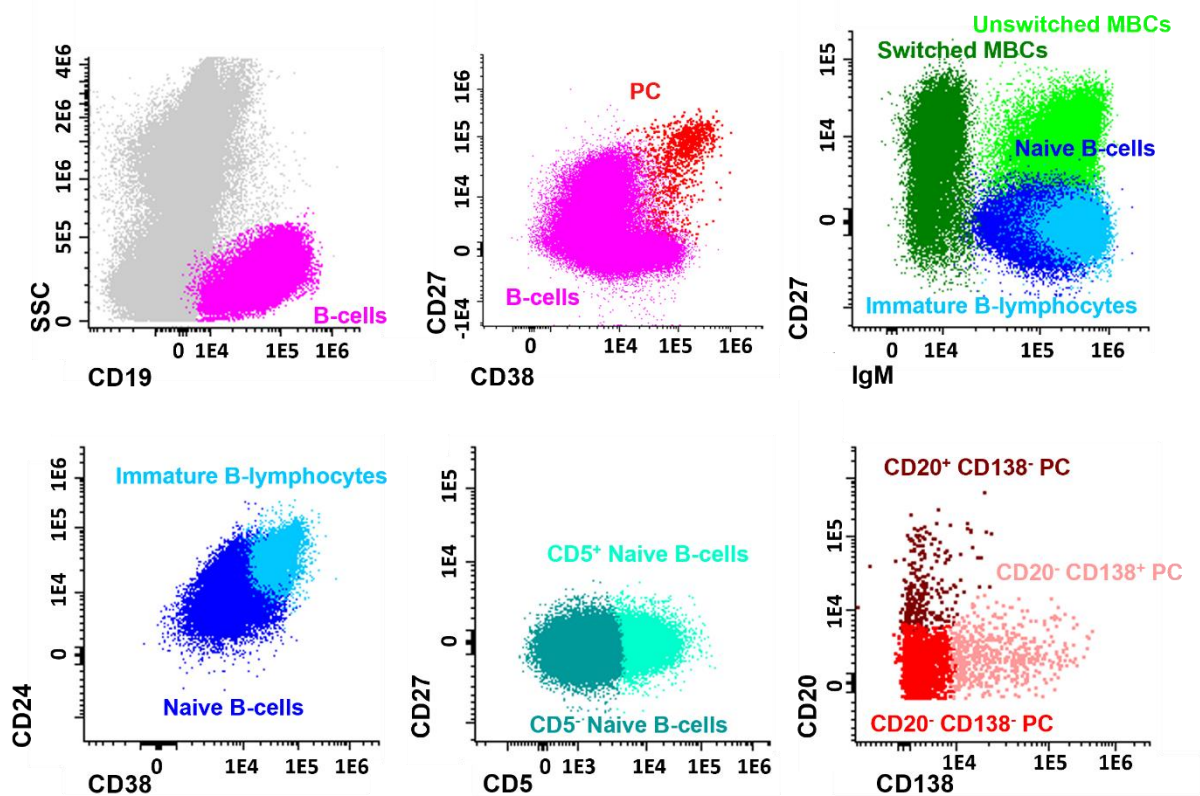
Abbreviations: AF700, AlexaFluor 700; APC, allophycocyanine; BV, Brilliant Violet; FITC, fluorescein isothiocyanate; Cy, cyanine; H7, Hilite®7; PE, phycoerythrin; PECF594, phycoerythrin cyanine-based 594; PerCPcy5.5, peridinin chlorophyll protein-cyanine 5.5; PECy7, phycoerythrin cyanine 7; ^aBD Biosciences, Becton/Dickinson Biosciences (San Jose, CA); ^bBiolegend (San Diego, CA), ^cCytognos (Salamanca, Spain).

Supplementary Table 3. Distribution of mature B-cells, PC and their subpopulations in blood of systemic mastocytosis (SM) patients (n=108) studied at diagnosis and distributed according to the distinct WHO 2022 diagnostic subtypes of the disease compared to healthy donors (HD) (n=117).

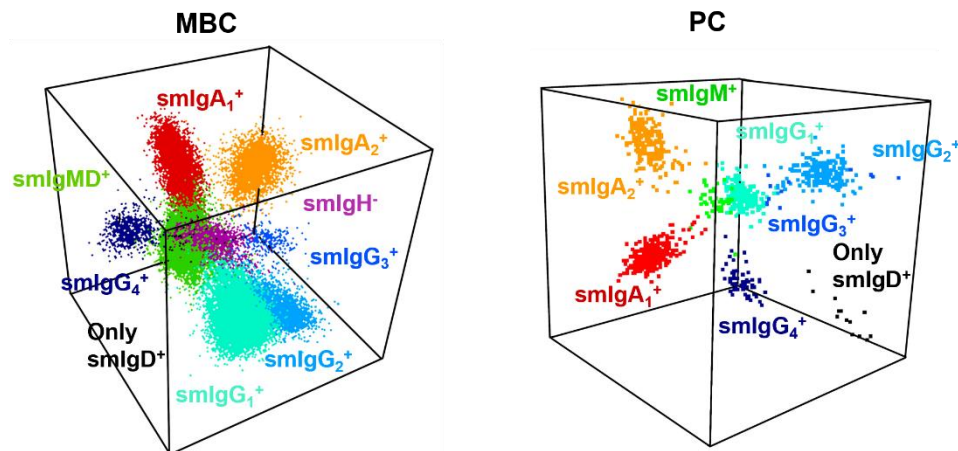
Cell population	HD (n=117)	SM (n=108)	P- value	BMM (n=35)	ISM (n=64)	ASM (n=9)	P- value
B-lymphocytes	218.3 (47-5140)	202 (24-1964)	NS	227 (55-877)	190.5 (69.4-841)	196 (23.6-1964)	NS
Pre-Germinal center	129.9 (8.2-3267)	129 (15.3-1810)	NS	143 (40.9-431)	114 (20.2-498)	144 (15.3-1810)	NS
Immature B-cells	4.1 (0.1-50.4)	5 (0.4-232)	NS	3.6 (0.5-15.9)	5.05 (0.4-75.9)	15.4 (1.9-232)	<0.005 ^{¶‡}
Naive CD5 ⁺	13.6 (0.2-889)	16.4 (0-295)	NS	18.4 (1.7-183)	16.2 (0-295)	14.9 (0.9-69.4)	NS
Naive	123.4 (8.1-2366)	100.2 (12.6-1525)	NS	116 (25.3-256)	92.2 (16.8-361)	102 (12.6-1525)	NS
Memory B-cell (MBC)	72.9 (14.9-1844)	69.7 (6.2-783)	NS	78.5 (13.7-671)	70.7 (18.2-783)	35.3 (6.2-265)	NS
SmIgMD ⁺ MBC	33.5 (1.7-1045)	29 (1.4-749)	NS	31.1 (7.8-318)	29.7 (9.5-749)	11.3 (1.4-125)	<0.041 ^{¶‡}
SmIgD ⁺ MBC	0.1 (0-12.4)	0.3 (0-5.7)	<0.001	0.5 (0.1-2.4)	0.3 (0-5.7)	0.1 (0-3.7)	0.027* [†]
SmIgG ₁ ⁺ MBC	12 (0.8-262)	10.7 (0.7-151)	NS	13.3 (1.9-151)	10 (0.9-46.8)	4.7 (0.8-53.1)	NS
SmIgG ₂ ⁺ MBC	4.5 (0.3-75.3)	4.0 (0-30)	NS	5.1 (0.3-20.6)	3.6 (0.5-30)	1 (0-10.7)	NS
SmIgG ₃ ⁺ MBC	2.3 (0.1-57.6)	1.85 (0-15.1)	NS	1.9 (0.3-15.1)	1.7 (0.1-8.8)	1.4 (0-13.9)	NS
SmIgG ₄ ⁺ MBC	0.4 (0-18.2)	0.4 (0-5.7)	NS	0.6 (0-4)	0.4 (0-5.7)	0.1 (0-1)	NS
SmIgA ₁ ⁺ MBC	9.2 (0.6-151)	10.7 (0.9-62.4)	NS	10.8 (1.4-62.4)	8.4 (1.9-53)	4 (1-42.1)	NS
SmIgA ₂ ⁺ MBC	3.2 (0-124)	3.4 (0-44.7)	NS	4.2 (0.5-44.7)	2.9 (0.5-10.9)	1.1 (0-24.8)	<0.045 ^{▲‡}
Plasma cells (PC)	1.9 (0.1-29.5)	0.6 (0.04-8.3)	<0.001	0.6 (0.05-8.3)	0.6 (0.1-3.3)	0.2 (0.04-4)	<0.001 [■]
IgM ⁺ PC	0.2 (0.01-6.9)	0.07 (0-5.2)	<0.001	0.07 (0-5.2)	0.07 (0-0.8)	0.04 (0.01-0.5)	<0.004 [■]
IgD ⁺ PC	0.005 (0-3.1)	0 (0-0.2)	<0.001	0.001 (0-0.2)	0.03 (0-0.05)	0 (0-0.2)	<0.001 [†]
IgG ₁ ⁺ PC	0.2 (0-5.4)	0.03 (0-0.7)	<0.001	0.03 (0-0.45)	0.03 (0-0.7)	0.02 (0-0.7)	<0.001 [■]
IgG ₂ ⁺ PC	0.2 (0-1.7)	0.05 (0-1)	<0.001	0.06 (0-0.5)	0.05 (0-1)	0.02 (0-0.2)	<0.032 ^{■□}
IgG ₃ ⁺ PC	0.01 (0-1.4)	0.005 (0-0.64)	<0.001	0 (0-0.64)	0.005 (0-0.2)	0.005 (0-0.06)	<0.032* [†]
IgG ₄ ⁺ PC	0.01 (0-0.4)	0 (0-0.2)	<0.001	0 (0-0.2)	0 (0-0.05)	0 (0-0)	<0.001 [■]
IgA ₁ ⁺ PC	0.6 (0-10.1)	0.1 (0-1.8)	<0.001	0.1 (0.02-1.8)	0.12 (0-1)	0.04 (0-1.5)	<0.001 [■]
IgA ₂ ⁺ PC	0.3 (0-6.4)	0.07 (0-1.2)	<0.001	0.07 (0-1.2)	0 (0-0.6)	0.02 (0-0.6)	<0.001 [■]

Results expressed as median (cell/μl) values and range between brackets. HD, healthy donor; SM, systemic mastocytosis; BMM, bone marrow mastocytosis; ISM, indolent systemic mastocytosis; ASM, aggressive systemic mastocytosis; NS, statistically not significantly different (P>.05); * HD vs BMM; † HD vs ISM, ‡ HD vs ASM patients, § BMM vs ISM patients; ¶ BMM vs ASM; □ ISM vs ASM; ■ HD vs all SM (BMM, ISM and ASM); ▲ ASM vs BMM and ISM.

A Blood circulating B-cells and PC and their major maturation-associated subsets

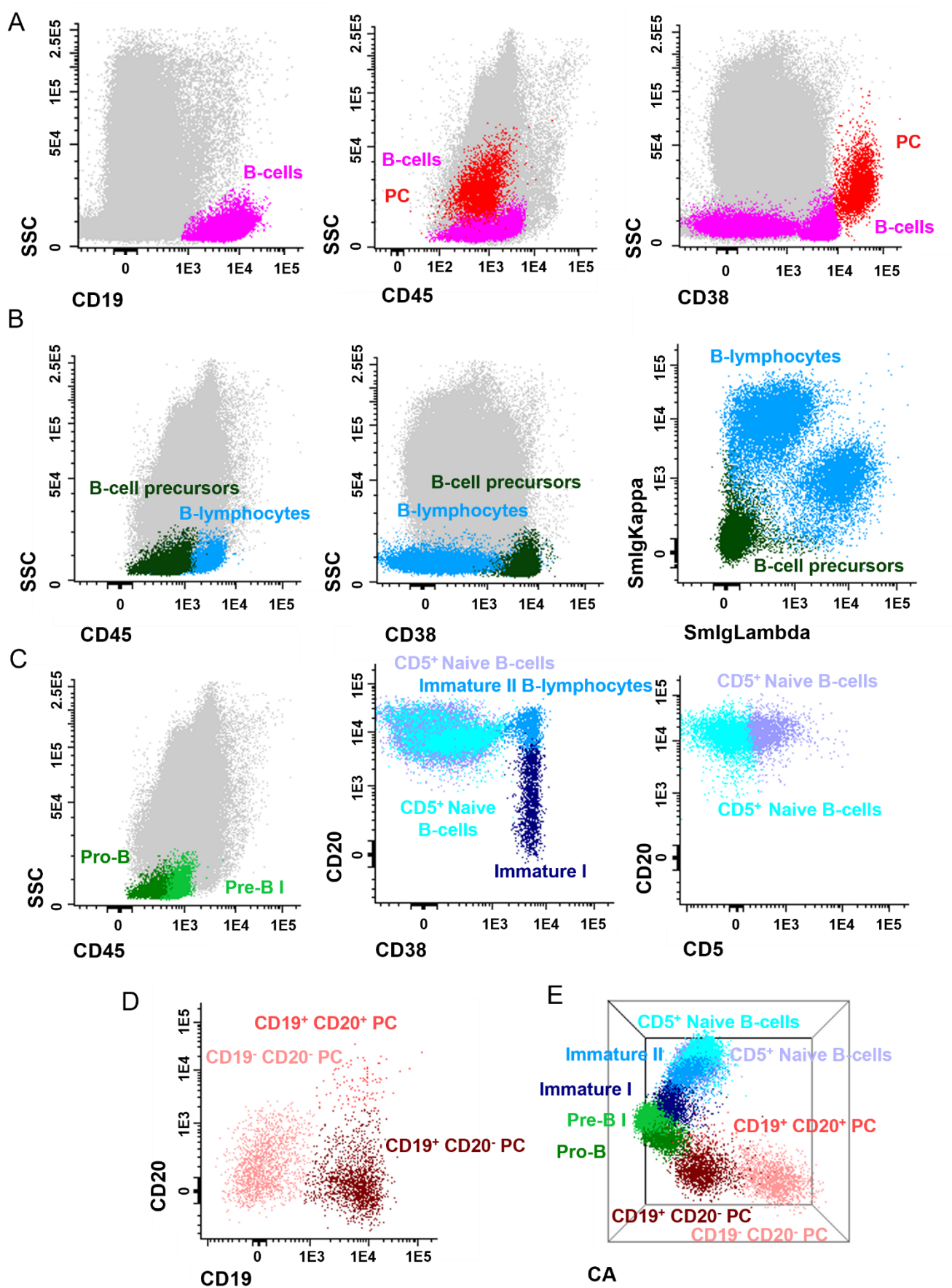


B Subsets of blood MBC and PC expressing different IgH isotypes and subclasses



Supplementary Figure 1. Illustrating example of the strategy used for the identification of B-lymphocytes, PC and their maturation-associated subsets in a representative blood sample from a systemic mastocytosis patient stained with the EuroFlow IMMune Monitoring (IMM) IgH-isotype-B-cell tube. In panel A, CD19⁺ B-cells are identified (left upper panel) and classified into different (maturation-associated) subsets of pre-germinal center B-cells (including immature, naïve CD5⁺ and naïve CD5⁻ B-cells), memory B-cells (MBC) and plasma cells (PC), based on their unique staining patterns for CD5, CD24, CD27, CD38 and surface membrane (sm) IgM, and their sideward light scatter (SSC) features including the CD20⁺ CD138⁻, CD20⁻CD138⁻ and CD20⁻ CD138⁺ maturation-associated PC. In panel B, the discrimination among distinct subsets of peripheral blood MBC (left panel) and PC (right panel) expressing different IgH-isotypes and subclasses is shown. Images are illustrated based on conventional 2-dimensional dot plots and multivariate canonical analysis (CA) 3-dimensional plots.

B-cells, PC and their major maturation-associated subsets in BM



Supplementary Figure 2. Illustrating example of the strategy (and criteria) used for the identification of the major populations of B-cells, PC and their maturation-associated subsets in a bone marrow (BM) sample from a representative systemic mastocytosis patient stained with the EuroFlow Lymphocyte Screening Tube (LST). In panel A, CD19⁺ B-cell precursors (BCP) and maturing B-lymphocytes, as well as CD38⁺ PC are identified, based on their unique staining patterns for CD19, CD45 and CD38 and their sideward light scatter (SSC) features. In panel B, gated B-cells are further subclassified into their maturation-associated subsets based on their distinct expression profiles for CD45, CD38, smlgk or λ and SSC properties. Those include: CD38^{hi} smlgk⁻/ λ ⁻ BCP and smlgk⁺/ λ ⁺ maturing/mature B-lymphocytes. In panel C, BCP and B-lymphocytes are further subdivided into their distinct maturation-associated subsets (pro-B and pre-B BCP plus immature-I, immature-II, CD5⁺ naïve and CD5⁻ naïve plus memory B-lymphocytes) based on their different patterns of expression of CD45, CD20, CD38 and CD5. In panel D, BM PC are subclassified into their CD19⁺ CD20⁺, CD19⁺ CD20⁻ and CD19⁻ CD20⁻ maturation-associated subpopulations, while in panel E, all maturation-associated B-cell and PC populations identified in BM are depicted in a multivariate canonical analysis (CA) 3-dimensional plot.