



Tesis de Maestría

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Implicancias de la expresión de la proteína S100A9 durante la progresión de la Leucemia Linfoide Crónica

M^a Eugenia Payque, Ing

Laboratorio de Investigación en Leucemia Linfoide Crónica

Tutor: Pablo Oppedo, PhD

Co-Tutora: María Elena Márquez, PhD

Tribunal: Dra. Romina Gamberale, Dr. Álvaro Pittini, Dra. Sofia Grille

Índice de contenido

Resumen	8
INTRODUCCIÓN	10
1. Leucemia linfocítica crónica	11
1.1 Definición y características generales.....	11
1.2 Diagnóstico y estratificación	12
1.3 Factores pronósticos.....	13
1.3.1 Estado mutacional IgVH.....	14
1.3.2 Alteraciones Cromosómicas	15
1.3.3 Biomarcadores séricos	16
1.3.4 Índice internacional de pronóstico de LLC (CLL-IPI)	16
1.4 Estrategias terapéuticas en LLC y nuevas alternativas	18
1.4.1 Terapias tradicionales y quimio-inmunoterapia (CIT).....	19
1.4.2 Terapias dirigidas.....	20
1.5 Microambiente tumoral en la LLC.....	22
1.5.1 Células T en el microambiente tumoral de la LLC	24
1.5.2 Microambiente Estromal y <i>Nurse-like cells (NLCs)</i> en la LLC.....	25
1.6 Proteína S100A9 y su implicancia en el cáncer.....	28
1.7 <i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)</i>	31
1.8 S100A9/EMMPRIN como un potencial blanco terapéutico en la LLC.....	32
Objetivo general e hipótesis	34
Objetivos Específicos	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1 Muestras de pacientes con LLC	36
2.2 Análisis de expresión de EMMPRIN por Western Blot	38
2.2.1 Ensayo de desglicosilación de EMMPRIN	39
2.3 Análisis de expresión basal de EMMPRIN y RAGE por citometría de flujo.....	40
2.4 Estimulación de PBMCs <i>in-vitro</i> y evaluación de EMMPRIN	41
2.5 Evaluación de la expresión de proteínas implicadas en la activación de las vías NF- kB, Pi3K/AKT y MAPK/JNK luego de la activación <i>in-vitro</i> con S100A9.....	42
2.6 Análisis de muerte celular mediada por Caspasa-3/7 en células activadas con rhS100A9 por citometría de flujo	44
2.7 Análisis de expresión de mRNA por PCR cuantitativa (qPCR).....	45
2.8 Análisis estadísticos	46
RESULTADOS	47
3.1 Análisis de la expresión de EMMPRIN en células de LLC de pacientes con diferente evolución clínica	48
3.2 Evaluación del tipo de glicosilación (N/O-glicosilación) del receptor EMMPRIN en células de LLC.....	52
3.3 Impacto de señales del microambiente tumoral en la regulación de EMMPRIN.....	53

3.4	Correlación entre el factor de transcripción SP1 y EMMPRIN.....	55
3.5	Efecto de la activación del eje S100A9/EMMPRIN en la fosforilación de proteínas directamente vinculadas a vías clásicas de supervivencia y progresión tumoral en LLC.....	57
3.6	Identificación del eje S100A9/EMMPRIN en la activación de las principales vías de supervivencia, y proliferación tumoral en la LLC	59
3.7	Efecto del bloqueo de RAGE con un inhibidor específico en la activación de las vías PI3K/AKT, NF-κB y MAPK/JNK.....	62
3.8	Evaluación de la expresión de moléculas asociadas a la supervivencia, al ciclo celular y la migración tumoral luego de la activación del eje S100A9/EMMPRIN	64
3.8.1	Análisis de las moléculas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-2.....	64
3.8.2	Análisis de moléculas relacionadas con el ciclo celular Rb-1 y p27.....	65
3.8.3	Efecto del eje S100A9/EMMPRIN en la inhibición de la apoptosis en células de LLC.....	66
3.8.4	Análisis del rol de la vía S100A9/EMMPRIN en la migración y progresión tumoral en LLC.....	68
3.9	ARTICULO EN REVISIÓN	70
3.9.1	Caracterización funcional in-vivo de S100A9 como un blanco terapéutico en la LLC	70
	DISCUSIÓN	73
	Referencias	84

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de riesgo incluidos en el cálculo del CLL-IPI.....	17
Tabla 2. Índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI).....	17
Tabla 3. Caracterización clínica y molecular de los pacientes con LLC estudiados.....	37
Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western Blot.....	39
Tabla 5. Anticuerpos utilizados para el análisis de EMMPRIN y RAGE por citometría de flujo.....	40
Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados para el análisis de proteínas implicadas en la activación de las vías NF-kB, Pi3K/AKT y MAPK/JNK	43
Tabla 7. Primers utilizados para análisis por PCR cuantitativa (qPCR).....	45

Índice de Figuras

Figura 1. Terapias actuales y en experimentación para la LLC	19
Figura 2. Microambiente tumoral en la LLC.....	24
Figura 3. Funciones intracelulares y extracelulares de las proteínas S100	29
Figura 4. Niveles de EMMPRIN evaluados por citometría de flujo en células B de pacientes con LLC progresores, indolentes y donantes sanos (DS)	49
Figura 5. Expresión de EMMPRIN en células de LLC y su asociación al estadio Binet.....	51
Figura 6. Análisis del tipo de glicosilación de EMMPRIN en células de pacientes con LLC.	52
Figura 7. Efecto de señales del microambiente tumoral en la regulación de EMMPRIN.	54
Figura 8. Correlación entre el factor de transcripción SP1 y EMMPRIN en muestras de pacientes con LLC.....	56
Figura 9. Efecto de S100A9 sobre la expresión y fosforilación de proteínas en células de LLC	58
Figura 10. Inhibición <i>in-vitro</i> del eje S100A9/EMMPRIN en células primarias de LLC.....	61
Figura 11. Expresión de RAGE en células de pacientes con LLC y donantes sanos	62
Figura 12. Efecto del bloqueo de RAGE en la activación de vías celulares en células de LLC.....	63
Figura 13. Análisis de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-2 luego de la estimulación con rhS100A9	65
Figura 14. Análisis de las proteínas relacionadas al ciclo celular pRb-1 y p27 luego de la estimulación con rhS100A9.....	66
Figura 15. Efecto de S100A9 en la apoptosis de las células de LLC	67
Figura 16. Análisis de las metaloproteinasas de matriz MMP2 y MMP9, y de las quimiocinas CCL3 y CCL4, asociadas a la migración y homing tumoral luego de la estimulación con rhS100A9.....	69
Figura 17. Modelo propuesto: S100A9/EMMPRIN como nuevo eje involucrado en la progresión tumoral de la LLC	83

Abreviaturas

°C - Grados Celsius

µg - Microgramo

µL - Microlitro

mL - Mililitro

AID - Deaminasa de Citosina Inducida por Activación (del inglés *activation-induced cytidine deaminase*)

APC - Aloficocianina (del inglés *Allophycocyanin*)

BCA - Ácido bicinconínico (del inglés *bicinchoninic acid*)

BSA - Seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)

CMSP - Células mononucleares de sangre periférica

Cf - Concentración final

CO₂ - Dióxido de carbono

CXCL10 Quimiocina 10 con motivo C-X-C

CXCL11 Quimiocina 11 con motivo C-X-C

CXCL12 Quimiocina 12 con motivo C-X-C

CXCL13 Quimiocina 13 con motivo C-X-C

CXCR3 Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 3

CXCR4 Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4

CXCR5 Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 5

DMSO - Dimetilsulfóxido

EMMPRIN - Inductor de las metaloproteinasas de matriz extracelular (del inglés *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*)

FITC - Isotiocianato de fluoresceína (del inglés *fluorescein isothiocyanate*)

GAPDH - Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa

HRP - Peroxidasa de rábano (del inglés *horseradish peroxidase*)

Ig - Inmunoglobulina

IgG - Inmunoglobulina G

IgM - Inmunoglobulina M

IL - Interleuquina

kDa - Kilo dalton

LLC - Leucemia linfóide crónica

mA - Miliampere

MCL-1 - *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*

MFI - Intensidad media de fluorescencia

M-MLV 'Moloney Murine Leukemia Virus'

NCLs - *Nurse like cells*

NF-κB - Factor nuclear kappa B

nm - Nanómetro

PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PBS - Buffer fosfato salino (del inglés *phosphate saline buffer*)

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

PD-1 - Proteína de muerte celular programada

PD-L1 - Ligando de la proteína de muerte celular programada

PE - Ficoeritrina

PE - Ficoeritrina (del inglés *Phycoerythrin*)

PerCP - Proteína Clorofila

Pi3K - Fosfatidilinositol 3 fosfato quinasa

PNGasa F - N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum*

RAGE - Receptor para los compuestos de glicosilación avanzada (del inglés *receptor for advanced glycation end products*)

RPMI (Medio de cultivo) – Medio *Roswell Park Memorial Institute*

SDS - Dodecilsulfato sódico (del inglés *Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (del inglés *sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*)

SFB - Suero fetal bovino

SP - Sangre Periferica

TCL1 - '*T- cell leukemia/lymphoma Treg Linfocitos T reguladores*

Vcx - *Venetoclax*

VEGF -*Factor de crecimiento endotelial vascular1'*

Resumen

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de células B que se caracteriza por la expansión clonal de estas células en sangre, médula ósea y órganos linfoides. La progresión de la enfermedad está estrechamente vinculada a la interacción con el microambiente tumoral, que favorece la supervivencia y progresión de las células leucémicas. Nuestro grupo ha descrito previamente la presencia de altos niveles de la proteína pro-inflamatoria S100A9 en microvesículas séricas secretadas por el clon leucémico de pacientes con mal pronóstico. Esta característica distintiva de los linfocitos B en dichos pacientes, junto con una alta expresión del receptor de S100A9, EMMPRIN, desencadena la activación de la vía NF- κ B, un eje fundamental en la progresión de la leucemia (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017). Con base en estos hallazgos, esta tesis busca profundizar en el papel del eje S100A9/EMMPRIN en la progresión tumoral y su potencial terapéutico en LLC.

En este trabajo demostramos que EMMPRIN está altamente expresado en células B leucémicas, con una mayor expresión en pacientes progresores en comparación con pacientes indolentes y donantes sanos. Además, su N-glicosilación reveló dos glicoformas: una de alta (HG) y otra de baja (LG) glicosilación, destacándose que la forma HG está asociada con un peor pronóstico y un estadio avanzado según la clasificación de Binet.

A partir de esta caracterización, profundizamos el impacto de la interacción entre S100A9 y EMMPRIN en la progresión tumoral. El estudio del eje S100A9/EMMPRIN reveló que su interacción activa múltiples vías de señalización esenciales para la progresión y supervivencia de las células tumorales, como PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK/JNK. La activación de estas vías modula la expresión de genes relacionados con la resistencia a la apoptosis y la proliferación celular, como MCL-1, BCL-2, p-Rb1 y p27, los cuales desempeñan un papel relevante en la regulación de estos procesos. Además, se encontró que la interacción S100A9/EMMPRIN no solo promueve la supervivencia y proliferación celular, sino que también induce un aumento en la expresión de las quimiocinas CCL3 y CCL4, que favorecen la comunicación entre las células leucémicas y el microambiente tumoral. La activación del eje S100A9/EMMPRIN también parece facilitar la migración de las células leucémicas, al aumentar la expresión de metaloproteinasas de matriz, como MMP2 y MMP9, que contribuyen a la remodelación del microambiente tumoral y favorecen la progresión leucémica. La inhibición de S100A9 con inhibidores específicos, así como el bloqueo de su receptor EMMPRIN, redujo significativamente la activación de dichas vías.

Para evaluar la relevancia in-vivo del eje S100A9/EMMPRIN, se realizaron experimentos en colaboración con el Departamento de Inmunología del H. Lee Moffitt Cancer Center, utilizando el modelo murino E μ -TCL1, que emula mejor la LLC. En estos ratones la sobreexpresión del oncogén TCL1 genera una LLC muy similar a la observada en pacientes con progresión de la enfermedad. Esta cepa fue utilizada para generar un nuevo modelo, el E μ -TCL1/S100A9 “*knock-out*”. Tal como habíamos planteado en nuestra hipótesis, los ratones generados deficientes en S100A9 mostraron una mayor supervivencia y una progresión leucémica más lenta, con menor esplenomegalia e infiltración tumoral. Además, la transferencia adoptiva de células S100A9^{-/-} redujo la proliferación del clon leucémico y la linfocitosis, asociándose con una mejor supervivencia. Estos efectos también se replicaron en un modelo de xenoinjerto derivado de pacientes (PDX) tratado con Tasquinimod (inhibidor de S100A9), que redujo significativamente la infiltración leucémica y la esplenomegalia, mejorándose la supervivencia de los ratones.

En conjunto, nuestros hallazgos indican que el eje S100A9/EMMPRIN desempeña un papel relevante en la fisiopatología y evolución de la LLC, al promover la activación de vías de señalización críticas para la progresión tumoral. La inhibición específica de este eje posiciona a S100A9 como un potencial blanco terapéutico en la LLC.

INTRODUCCIÓN

1. Leucemia linfocítica crónica

1.1 Definición y características generales

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia hematológica caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B maduros, clonales y CD5 positivos en sangre periférica (SP), médula ósea (MO) y órganos linfoides secundarios (OLS) (Rozman et al., 1995; Hallek & Al-Sawaf, 2021). Esta enfermedad es altamente heterogénea, con un grupo de pacientes que presenta una forma indolente, definida por una linfocitosis mayor de 5000 linfocitos B/ μ l, pero que se mantiene estable sin requerir tratamiento. En contraste, otros pacientes desarrollan una forma agresiva de la LLC, con un rápido aumento de la linfocitosis y la posible presencia de linfadenopatías y/o citopenias, lo que requiere tratamiento inmediato. Finalmente, existe un tercer grupo de pacientes en los que la enfermedad permanece estable durante años, pero luego progresa de forma impredecible (Dighiero G. 2003). Este último grupo plantea un desafío importante para el médico tratante, ya que se requiere de factores pronósticos que permitan predecir de manera temprana la progresión de la enfermedad para optimizar el tratamiento de la enfermedad.

Desde una perspectiva epidemiológica, la LLC representa aproximadamente el 30% del total de leucemias a nivel mundial, y es la enfermedad linfoproliferativa crónica más frecuente en adultos, especialmente en los países occidentales. Afecta principalmente a personas mayores de 50 años, siendo rara en individuos menores de 40 años (Hallek & Al-Sawaf, 2021; Kipps et al., 2017). La incidencia de LLC varía según la región geográfica y la composición étnica de la población. En Estados Unidos, la incidencia es de 4.7/100,000 habitantes por año, reportándose en el año 2024 unos 20,700 nuevos casos y 4320 muertes originadas por causa de la enfermedad en 2021 (Vallejo et al., 2024; Hallek & Al-Sawaf, 2021). En Uruguay, la incidencia estimada es de 6 casos por cada 100,000 personas por año, lo que resultó según el último Registro Nacional Leucemia Linfocítica Crónica y Aguda publicado en 2021 en unos 143 casos nuevos (Sociedad de Hematología del Uruguay, 2021).

1.2 Diagnóstico y estratificación

El diagnóstico de la LLC se realiza principalmente mediante la evaluación clínica y la identificación de linfocitosis (aumento de los linfocitos B), que suele superar los 5000 linfocitos/ μ l en la sangre y persiste por al menos 3 meses. Para confirmar el diagnóstico, se utilizan técnicas como la inmunofenotipificación por citometría de flujo, que permite identificar las células B clonales que expresan antígenos típicos de linfocitos B (CD19, CD20 y CD23) pero también antígenos de células T (como CD5). En las células leucémicas, el receptor de la célula B, del inglés BCR, por “*B Cell Receptor*” están claramente disminuidos, así como también las moléculas CD20 y CD79 en comparación con las células B normales (Payelle-Brogard et al., 2002; Vuillier et al 2005; Stevenson & Caligaris-Cappio, 2004). Actualmente, se considera que un panel de marcadores que incluya CD19, CD5, CD20, CD23, kappa (κ) y lambda (λ) es adecuado para confirmar el diagnóstico de LLC. En los casos donde el diagnóstico sigue siendo incierto, se recomienda añadir marcadores adicionales como CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10 o ROR1 (Hallek & Al-Sawaf, 2021; Ghia & Rawstron, 2018).

Confirmado el diagnóstico, es esencial determinar el estadio clínico de la LLC para evaluar la necesidad de tratamiento y elegir la mejor opción terapéutica. Los sistemas de clasificación más utilizados son los de *Rai* y *Binet*, que dividen a los pacientes según la progresión de la enfermedad y la presencia de complicaciones inmunohematológicas. El sistema *Rai*, propuesto en 1975, clasifica a los pacientes en función de la linfocitosis y la presencia de agrandamiento de los ganglios linfáticos, hígado o bazo, así como la disminución de hemoglobina o plaquetas (Rai et al., 1975). Por otro lado, el sistema *Binet*, propuesto en 1977, categoriza a los pacientes en tres grupos: Estadio A (con menos de tres áreas afectadas, y niveles normales de hemoglobina y plaquetas), Estadio B (más de tres áreas comprometidas, pero con hemoglobina y plaquetas normales) y Estadio C (con anemia y/o trombocitopenia) (Binet et al., 1981).

La clasificación de *Binet* y *Rai* está directamente relacionada con la supervivencia de los pacientes. Aquellos clasificados como *Binet A* o *Rai 0* tienen una supervivencia media superior a los 10 años. Los pacientes con estadios *Binet B* o *Rai I/II* presentan una supervivencia media de entre 5 a 7 años, mientras que los pacientes en estadios más avanzados, como *Binet C* o *Rai III/IV*, tienen una supervivencia media significativamente más baja, de aproximadamente 3 años (Dighiero & Hamblin, 2008). Ambas clasificaciones siguen siendo ampliamente utilizadas en la práctica clínica debido a

su simplicidad, lo que facilita tanto el diseño de estudios clínicos como la planificación de estrategias terapéuticas.

1.3 Factores pronósticos

Los sistemas de estratificación clínica Rai y Binet para la LLC, aunque simples y económicos, presentan limitaciones en su capacidad para predecir la progresión de la enfermedad, especialmente en los estadios iniciales (Binet A y Rai 0). La heterogeneidad de la LLC, en la que la evolución clínica varía significativamente entre pacientes, ha impulsado la investigación de factores pronósticos que ayuden a predecir la evolución de la enfermedad y, en consecuencia, a optimizar el tratamiento. Identificar si un paciente progresará rápidamente o permanecerá estable es crucial para tomar decisiones terapéuticas acertadas.

Los factores pronósticos pueden agruparse en cuatro categorías principales: 1) factores intrínsecos del paciente (edad, sexo, etnia, comorbilidades), 2) marcadores clínicos de la enfermedad (presencia de adenomegalias, hepatomegalia, esplenomegalia, recuento de linfocitos y plaquetas), 3) marcadores moleculares como el estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGVH) (Hamblin et al., 1999; Damle et al., 1999; Maloum, 2000), la expresión de ARN mensajeros aberrantes en el clon tumoral como el gen de la lipoproteína Lipasa LPL (Oppezso et al., 2005; Kaderi et al., 2011; Prieto et al., 2018), CLLU1, (Buhl et al., 2006), citidina desaminasa inducida por activación (AID, por sus siglas en inglés) (Heintel et al., 2004), y la expresión de diferentes microARNs, como mir-29c (Stamatopoulos, 2010). 4) Marcadores celulares como CD38 (Damle et al., 1999), niveles de β 2-microglobulina, (Hallek et al., 1996), ZAP-70 (Crespo et al., 2003), CD49d, (Gattei, 2008), CCL3/CCL4 (Sivina et al., 2010) anomalías genéticas (como deleciones y/o translocaciones cromosómicas (Dohner et al., 2000) y mutaciones en el gen TP53 (Malcikova et al., 2024). En conjunto, estos factores pronósticos son esenciales para predecir la progresión de la enfermedad y guiar las decisiones terapéuticas, como se analiza en revisiones recientes (Braish, *Cerchione & Ferrajoli, 2024*; Hallek, 2025).

1.3.1 Estado mutacional IgVH

Uno de los factores pronósticos más confiables en la LLC es el estado mutacional IGVH. El BCR desempeña un papel central en la biología de los linfocitos B, ya que activa una cascada de señalización esencial para su supervivencia y proliferación. El BCR está compuesto por una inmunoglobulina de superficie asociada con moléculas accesorias, como CD79a y CD79b, que amplifican y facilitan la transmisión de la señal. Cuando el BCR se une a su antígeno, se inicia un proceso de refinamiento de la afinidad en el anticuerpo, facilitado por la enzima AID. AID induce mutaciones puntuales en las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y liviana (VL) del BCR, iniciando el proceso de hipermutación somática (HMS). Además, AID es responsable del cambio de clase (CSR, por sus siglas en inglés), generando cortes de doble hebra y mutaciones en las regiones de cambio (*pre-switch*) de las inmunoglobulinas (μ , δ , γ , α y ϵ), promoviendo la diversificación funcional de los anticuerpos. Ambos procesos ocurren en el centro germinal durante la maduración de los linfocitos B (Honjo et al., 2002).

La heterogeneidad clínica y molecular de la LLC fue una de las primeras incógnitas que surgieron en torno al origen de la célula leucémica. A principios de la década de 1980, estudios pioneros identificaron distintos marcadores y respuestas celulares que sugerían variaciones en la biología tumoral entre pacientes (Catovsky et al., 1981; Rubartelli et al., 1983; Kipps et al., 1988). Esto llevó a plantear una pregunta aún sin respuesta definitiva: ¿es la LLC una sola enfermedad o son dos entidades biológicas distintas? (Hamblin., 2002). En este contexto, Schroeder y Dighiero (1994) observaron que aproximadamente la mitad de los pacientes con LLC presentaban genes IGVH sin evidencia de HMS, mientras que la otra mitad mostraban un BCR con este proceso. Propusieron así que los pacientes con BCR no mutado podrían tener una LLC originada en células B vírgenes (pre-centro germinal), mientras que aquellos con BCR mutado podrían derivar de linfocitos B memoria, expuestos al proceso de maduración en el centro germinal. La relevancia clínica de estos hallazgos fue confirmada por estudios posteriores que demostraron que los pacientes con IGVH no mutado (≥ 98 % de homología con la secuencia germinal) tienen una supervivencia media de 8 años, mientras que aquellos con IGVH mutado (< 98 % de homología) presentan una supervivencia media de 25 años (Hamblin et al., 1999; Damle et al., 1999). De este

modo, el perfil mutacional de IGVH se consolidó como el principal factor pronóstico en la LLC (Stevenson & Chiorazzi, 2020).

1.3.2 Alteraciones Cromosómicas

Si bien en la LLC, no existe una translocación cromosómica característica, se han identificado diversas aberraciones cromosómicas mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que afectan hasta al 82% de los pacientes. Las alteraciones más comunes incluyen la delección del cromosoma 13q14 (presente en el 55% de los casos), la delección del 11q22-23 (25%), la trisomía 12 (10-20%) y la delección del 17p13 (5-8%) (Dohner et al, 2000).

La Del(13q14) está asociada con un buen pronóstico, especialmente en pacientes con IgVH mutado. Se ha demostrado que esta delección implica la pérdida de los microARNs 15a y 16-1, lo que favorece un curso más indolente de la enfermedad (Döhner et al., 2000). Por el contrario, la Del(11q22-23) /gen ATM se asocia con un perfil de IgVH no mutado y un pronóstico desfavorable. Esta alteración se encuentra en una región que contiene dos genes importantes, ATM y BIRC3, implicados en la reparación del ADN. La pérdida de ATM, que activa la vía de señalización ATM/p53, compromete la respuesta del tumor a la quimioterapia, aumentando la resistencia a los tratamientos (Brizard et al., 1997; Zhu et al., 1999; Dohner et al., 1997; Jiang et al., 2016). Mientras que mutaciones en BIRC3 han sido asociadas con impacto clínico, también puede afectarse por delecciones. Ubicado en el cromosoma 11, cerca de ATM, su locus se pierde en el 80% de las delecciones 11q. Sus mutaciones, principalmente nonsense y frameshift, son raras (3- 5% en no tratados) pero más comunes en CLL refractaria a fludarabina, sugiriendo un alto riesgo (Tausch & Stilgenbaue, 2020).

Aunque no se ha identificado un vínculo directo entre los genes involucrados en la trisomía 12 y la patogénesis de la LLC, algunos estudios sugieren que pacientes con esta alteración presentan mutaciones en NOTCH1, lo que se relaciona con una menor supervivencia global (Losada et al 1991; Hamblin et al 1997; Ballati et al., 2012). Sin embargo, la relación entre la trisomía 12 y el pronóstico sigue siendo controvertida. Por último, la Del(17p13), que afecta a un 5-8% de los pacientes, implica la pérdida del gen TP53, un factor clave en la respuesta a daños en el ADN. Los pacientes con del(17p13) tienen un pronóstico muy desfavorable, con una alta resistencia a la quimioterapia (Fenaux et al 1992; Newcomb et al., 1998; Moteno & Montserrat, 2008).

1.3.3 Biomarcadores séricos

Los biomarcadores séricos, como la β 2-microglobulina, son herramientas para evaluar la carga tumoral en pacientes con LLC. La β 2-microglobulina, una proteína asociada al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), ha sido identificada como un marcador en la LLC. Niveles elevados de β 2-microglobulina (>3.5 mg/L) se asocian con una menor capacidad de las células leucémicas para ser reconocidas por el sistema inmune, lo que contribuye a una progresión más agresiva de la enfermedad (Hallek et al., 1996). Varios estudios han confirmado que la β 2-microglobulina es un factor pronóstico independiente, siendo los niveles elevados indicativos de un pronóstico desfavorable (Hallek et al., 1995; Hallek et al., 2018).

1.3.4 Índice internacional de pronóstico de LLC (CLL-IPI)

Los factores pronósticos anteriormente mencionados han colaborado al desarrollo del índice internacional de pronóstico de LLC (CLL-IPI, del inglés, *Chronic Lymphocytic Leukemia International Prognostic Index*) que permite una evaluación más completa del riesgo de los pacientes. Este índice incorpora la edad del paciente, el estadio de la enfermedad (según los sistemas Rai o Binet), la delección del gen TP53, el estado mutacional de IGVH y los niveles séricos de β 2-microglobulina. Cada uno de estos factores se pondera individualmente y, a partir de su puntuación combinada, los pacientes son asignados a uno de los cuatro grupos de riesgo, lo que permite predecir la supervivencia global (SG) a 5 años (*International CLL-IPI working group*, 2016).

Una de las principales ventajas del CLL-IPI es su capacidad para diferenciar con mayor precisión entre pacientes que requieren tratamiento y aquellos que no, lo que optimiza el manejo clínico. Además, al integrar varios parámetros, el CLL-IPI permite identificar subgrupos de pacientes que antes no se distinguían, como aquellos con del(17p) con alto riesgo y muy alto riesgo. A continuación, se presenta la tabla con la asignación de puntajes según los factores de riesgo para el cálculo del CLL-IPI.

Tabla 1. Factores de riesgo incluidos en el cálculo del CLL-IPI

Factor de Riesgo	Puntaje
Delección o mutación TP53	4
Perfil IgVH No mutado	2
β2-microglobulina	2
Edad > 65 años	1
Estadio Rai/Binet intermedio o alto	1

Dentro de los parámetros estudiados el que representa mayor puntaje es la presencia de delección o mutación en *TP53*, a cuál se le asigna 4 puntos, mientras que aquellos pacientes con un perfil IGHV No mutado o un valor de β2-microglobulina >3.5 mg/L reciben 2 puntos, por último, una edad > 65 años o estadio RAI o Binet intermedio o alto recibe 1 punto. La suma de estos puntajes compone el CLL-IPI y determinan la clasificación del paciente en uno de los siguientes grupos de riesgo, facilitando la predicción de su pronóstico y la toma de decisiones clínicas:

Tabla 2. Índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI)

Valor CLL-IPI	Categoría CLL-IPI	SG (5 años)	Tratamiento indicado
0-1	Bajo riesgo	93,2%	Enfoque <i>Watch-and-wait</i> , no tratar y vigilar al paciente
2-3	Riesgo intermedio	79,3%	No tratar, excepto cuando la enfermedad es sintomática
4-6	Alto riesgo	63,3%	Tratar, excepto cuando la enfermedad es asintomática
7-10	Muy alto riesgo	23,3%	Fármacos dirigidos, evitando quimioinmunoterapia.

Si bien esta herramienta permite orientar la estrategia terapéutica, desde la vigilancia activa en pacientes de bajo riesgo hasta la implementación de tratamientos más agresivos en aquellos con alto riesgo, aún existen variables que requieren ser mejoradas. Además, se han propuesto otros índices para abordar las diferencias entre subgrupos de pacientes, como el IPS-E

(Condoluci et al., 2021), que ofrece un enfoque pronóstico específico para pacientes con LLC en estadio temprano.

1.4 Estrategias terapéuticas en LLC y nuevas alternativas

La decisión de iniciar tratamiento en pacientes con LLC depende de varios factores, especialmente la presencia de una enfermedad activa y el riesgo de progresión. Según las pautas para el diagnóstico y tratamiento de la LLC el tratamiento está generalmente indicado en pacientes con enfermedad sintomática o activa, mientras que no se recomienda iniciar tratamiento en aquellos que no presentan síntomas (Hallek & Al-Sawaf, 2021; Hallek et al., 2018). Si bien esta es una práctica aceptada y aplicada a nivel mundial en la clínica médica, sigue siendo un desafío relevante en la LLC identificar marcadores pronósticos que permitan predecir la progresión de la enfermedad en pacientes asintomáticos y habilitar su tratamiento. Actualmente, esto aún no es posible.

A continuación, se muestran las terapias actualmente aprobadas y en experimentación para el tratamiento de la LLC (Figura 1).

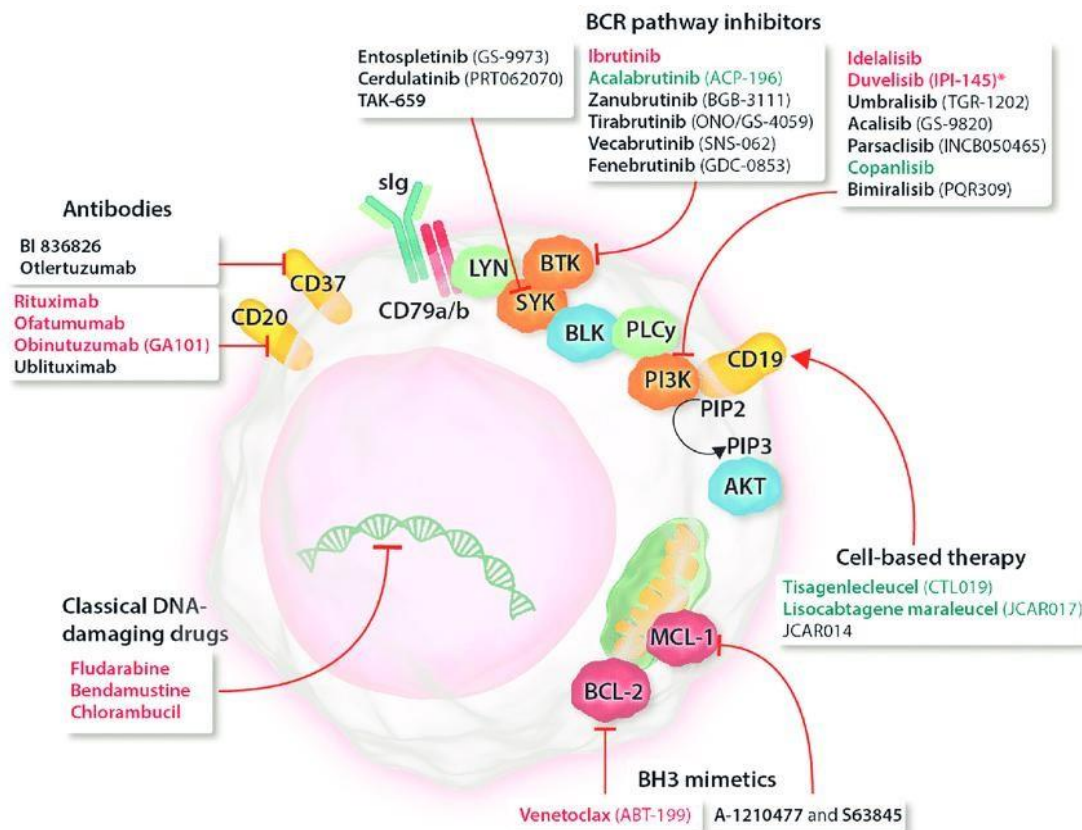


Figura 1. Terapias actuales y en experimentación para la LLC. Los agentes que dañan e interfieren en la replicación del ADN, como fludarabina y bendamustina, promueven la apoptosis en las células leucémicas. Los anticuerpos monoclonales, como rituximab y obinutuzumab, se dirigen contra CD20, induciendo citotoxicidad mediada por el sistema inmune. Las terapias dirigidas al receptor de células B (BCR) incluyen inhibidores como ibrutinib, que bloquea la tirosina quinasa de Bruton (BTK), e idelalisib, que inhibe PI3Kδ, interrumpiendo señales de proliferación y supervivencia tumoral. Venetoclax, un mimético de BH3, inhibe BCL-2, una proteína antiapoptótica, restaurando la muerte celular programada. Las terapias basadas en células, como tisagenlecleucel, emplean linfocitos T reprogramados mediante tecnología CAR-T para atacar células leucémicas que expresan CD19. Finalmente, se incluyen drogas en desarrollo clínico como entospletinib y cerdulatinib, que bloquean múltiples vías pro-tumorales. (Adaptado de Yosifov et al., 2019).

1.4.1 Terapias tradicionales y quimio-inmunoterapia (CIT)

El tratamiento de la LLC ha evolucionado significativamente desde su enfoque inicial basado en la quimioterapia. Tradicionalmente, se utilizaban agentes alquilantes como el clorambucilo y la ciclofosfamida, junto con análogos de nucleósidos como la fludarabina, que inhibe la replicación del ADN. Sin embargo, la búsqueda de terapias más eficaces y menos tóxicas llevó a un cambio en el abordaje terapéutico (Burger, 2018; Scheffold & Stilgenbauer, 2020).

En 1997 se introdujeron los anticuerpos monoclonales, Rituximab, dirigido contra CD20 en células B, demostró mejorar las tasas de respuesta y la supervivencia al eliminar células tumorales mediante citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) e inducción de apoptosis. Posteriormente, Obinutuzumab, un anticuerpo anti-CD20 de segunda generación, mostró mayor eficacia al potenciar la ADCC gracias a su mayor afinidad por los receptores FcγRIII y a su capacidad de inducir apoptosis directa de manera más eficiente que rituximab, con una menor dependencia de la CDC. Esta mejora en la actividad antitumoral ha llevado a evaluar su uso en combinación con otros agentes, como venetoclax (Vx), debido a su potencial sinérgico en la eliminación de células tumorales (Bauer et al., 2012).

La combinación de quimioterapia e inmunoterapia (CIT) se convirtió en el estándar de tratamiento, especialmente en pacientes jóvenes y sin comorbilidades. En particular, el esquema fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) logró tasas de respuesta prolongadas, con una supervivencia libre de progresión cercana al 50% (Robak et al., 2010; Fischer et al., 2016). Sin embargo, su efectividad está limitada en pacientes mayores o con comorbilidades, quienes presentan mayores recaídas y respuestas insuficientes. Además, aquellos con del(17p) o mutaciones en TP53 han mostrado una mala respuesta a este tratamiento (Scheffold, A & Stilgenbauer, 2020).

1.4.2 Terapias dirigidas

En la última década, los avances en la biología de la LLC han impulsado el desarrollo de terapias dirigidas, reemplazando progresivamente a los agentes citotóxicos inespecíficos y acercándose a un enfoque “*chemotherapy-free*”. Inhibidores diseñados para bloquear moléculas y vías clave de supervivencia han demostrado gran eficacia independientemente de las aberraciones cromosómicas antes mencionadas, transformando el manejo actual de la enfermedad (Burger, 2018; Fürstenau, 2019; Woyach et al., 2018).

Uno de los avances más significativos fue el desarrollo de los inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), como ibrutinib. Aprobado en 2014 para LLC en recaída/refractaria y en 2016 para el tratamiento en primera línea, su aprobación se basó en estudios clínicos que demostraron una tasa de supervivencia libre de progresión (PFS) del 75% y una supervivencia global (OS)

del 83% a los 26 meses (Byrd et al., 2012). Además, el estudio RESONATE-2 confirmó su superioridad frente a la quimioterapia en pacientes mayores sin tratamiento previo, con una PFS de 24 meses y una OS del 98.9% (Burger et al., 2015). Ibrutinib bloquea la actividad de la quinasa BTK al formar un enlace covalente con el residuo cisteína⁴⁸¹, inhibiendo su actividad. Es altamente eficaz en pacientes con mutaciones en TP53 y en formas resistentes a la quimioterapia. Sin embargo, su uso se ve limitado por la resistencia adquirida debido a mutaciones en BTK que impiden la unión de la droga a su blanco (Ahn et al., 2017; Woyach et al., 2014).

Otra clase de terapias dirigidas son los inhibidores de BCL-2, como venetoclax. Esta molécula, un mimético de BH3, bloquea la proteína BCL-2, cuya sobreexpresión en la LLC evita la apoptosis de las células tumorales, induciendo así la muerte celular programada (Crombie et al., 2017). Aprobado en 2019 para el tratamiento en primera línea, su eficacia fue demostrada en el estudio *CLL14*. En este ensayo, la combinación de venetoclax con obinutuzumab (Ven-Obi) mostró una PFS significativamente superior en comparación con clorambucilo-obinutuzumab (Clb-Obi), alcanzando una PFS del 88.2% a 24 meses frente al 64.1%. Incluso a largo plazo, Ven-Obi mantuvo mejores resultados, con una mediana de PFS de 76.2 meses frente a 36.4 meses de Clb-Obi. Además, los pacientes con delección de TP53 o IGVH no mutado, considerados de peor pronóstico, mostraron beneficios significativos (Al-Sawaf et al., 2024).

Además, los inhibidores de la subunidad δ de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), como idelalisib, también han demostrado un potencial terapéutico en la LLC. PI3K participa en la señalización y supervivencia de las células B, y su inhibición interrumpe vías críticas para la viabilidad de las células leucémicas. Idelalisib, aprobado por la FDA y la EMA en 2014 para pacientes con LLC refractaria, actúa bloqueando la señalización del receptor de células B (BCR) en las células leucémicas (Brown et al., 2014). Esta aprobación se basó en un estudio fase III que mostró mejoras significativas en la PFS y la OS en combinación con rituximab. Sin embargo, su uso se ha visto limitado por efectos adversos graves, debido a esto, idelalisib no se utiliza como primera opción en pacientes con enfermedad refractaria o en recaída, reservándose para líneas de tratamiento avanzadas o para aquellos que no son aptos para otras terapias (Lampson et al., 2016)

Por último, las terapias con células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell*) han surgido como una opción prometedora en la LLC. Estas células T modificadas genéticamente expresan un receptor quimérico que les permite reconocer y eliminar células tumorales. En LLC, los CAR-T dirigidos contra CD19, como liso-cel y axi-cel, han mostrado eficacia en pacientes refractarios o en recaída, incluidos aquellos con mutaciones en *TP53* o resistencia a inhibidores de BTK y BCL-2 (Porter et al., 2022; Siddiqi et al., 2021). Sin embargo, tienen limitaciones que incluyen factores tumorales (como el escape antigénico), factores intrínsecos de las células CAR T (como el agotamiento celular, un rasgo característico en las células T de LLC) y una variabilidad importante en la respuesta terapéutica dependiendo de la biología del clon leucémico (Gauthier et al., 2020; Fraietta et al., 2018).

A pesar de los avances en terapias dirigidas, la resistencia en la LLC sigue siendo un desafío debido a mutaciones en BTK (Ahn et al., 2017; Burger et al., 2016), sobreexpresión de BCL-2 u otras moléculas anti-apoptóticas de la familia como MCL-1 y BCL-X (Elias et al., 2022) y la protección ofrecida por el microambiente tumoral (Skånland & Mato, 2021; Elias et al., 2022). Estos mecanismos limitan la eficacia a largo plazo y subrayan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias y combinaciones terapéuticas más efectivas.

1.5 Microambiente tumoral en la LLC

A pesar de su aparente supervivencia *in-vivo*, se ha demostrado que, las células de LLC extraídas de la SP mueren rápidamente en cultivo *in-vitro*, lo que evidencia su dependencia de señales extrínsecas proporcionadas por el microambiente tumoral (TME, del inglés, *tumor microenvironment*) (Burger et al., 2009; Bagnara et al., 2011). Las células de LLC recirculan entre la sangre periférica y los órganos linfoides secundarios, donde proliferan en estructuras denominadas pseudofolículos, en lugar de formar centros germinales convencionales (Calissano et al., 2009; Burger et al., 2009; Bagnara et al., 2011). Estas regiones contienen diversas poblaciones celulares, incluidas células estromales mesenquimales, *nurse-like cells*, células T, células endoteliales y prolinfocitos B. La interacción bidireccional entre estas células y el clon leucémico proporciona señales esenciales para su supervivencia, proliferación y evasión inmunológica (Kipps, 2021)

El tráfico de las células de LLC entre la sangre periférica y los nichos del TME está regulado por moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas que dirigen su quimiotaxis. CXCL12 (secretada por NLC y células estromales), CXCL13 (producida por células dendríticas foliculares) y CCL19/CCL21 (derivadas de vénulas del endotelio alto), que activan CXCR4, CXCR5 y CCR7, respectivamente (Burger & Kipps 2006; Burger et al., 2009).

La invasión de los tejidos por células leucémicas requiere a su vez la degradación de la membrana basal y la matriz extracelular (ECM), un proceso mediado por metaloproteinasas (MMPs). En la LLC, la metaloproteinasa 9 (MMP9), principal gelatinasa expresada en estas células, facilita la migración transendotelial y la invasión de la membrana basal, permitiendo la infiltración del clon tumoral en órganos como bazo, ganglios e incluso la MO (Gusella et al., 2017; Redondo-Muñoz, 2006; Rodríguez et al., 2020). La producción de estas MMPs es regulada por quimiocinas y otros factores del microambiente, lo que incrementa los niveles de proMMP9 en los tejidos infiltrados (Redondo-Muñoz 2006; Bailón et al., 2014; Redondo-Muñoz 2008). Además, la expresión de MMP9 en el microambiente de la LLC ha sido vinculada a señales de supervivencia para las células leucémicas (Redondo-Muñoz 2010; Bailón et al., 2014).

El "homing" (retorno del clon tumoral) a los OLS genera una mayor activación de diversas vías de señalización, como NF- κ B, Pi3K/AKT, NOTCH y MYC, en comparación con las células en SP (ten Hacken & Burger, 2016). Este proceso podría estar mediado en gran parte por la activación del BCR, probablemente por autoantígenos o antígenos, junto con señales homotípicas que impulsan la proliferación leucémica. La activación simultánea de estas vías es crucial para la proliferación de la LLC. Estudios *in-vitro* han mostrado que la estimulación aislada de una vía, como la activación del BCR, TLRs o mediante CD40L, prolonga la supervivencia celular, pero no es suficiente para inducir proliferación. En cambio, la combinación de múltiples señales es necesaria para su expansión y proliferación (ten Hacken & Burger, 2016; Haselager et al., 2020). Así, la integración de estímulos microambientales promueve la proliferación tumoral, aumentando la expresión de proteínas antiapoptóticas como BCL2, BCLXL y MCL1, lo que favorece la acumulación de células leucémicas y la progresión de la enfermedad (Haselager et al., 2020). A continuación, en la figura 2 se resumen los principales componentes e interacciones descritos al momento en el microambiente tumoral de la LLC.

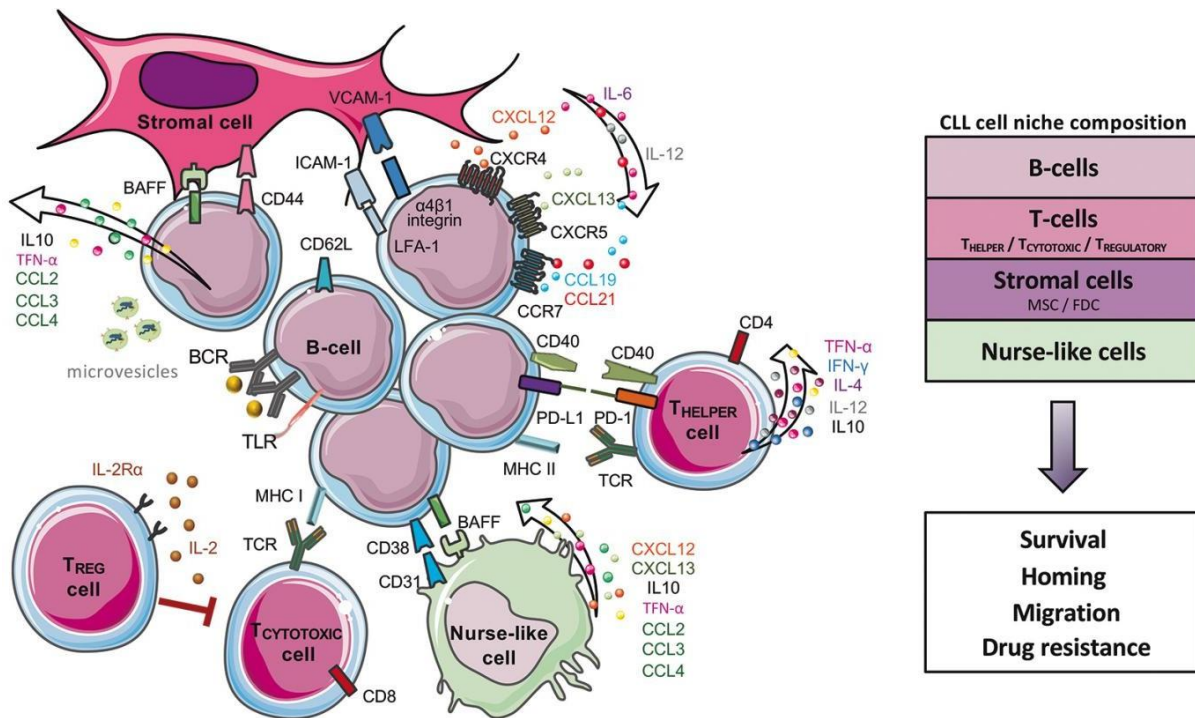


Figura 2. Microambiente tumoral en la LLC. Las células de LLC interactúan con células estromales, células T y nurse-like cells (NLC) mediante contactos directos, receptores de quimiocinas/citoquinas, moléculas de adhesión e interacciones ligando-receptor. Esta comunicación ya sea por interacción directa o por secreciones de citocinas y quimiocinas envían señales de supervivencia y proliferación a las células leucémicas de LLC (Adaptado de Delgado et al., 2020).

1.5.1 Células T en el microambiente tumoral de la LLC

Las células T desempeñan un papel clave en el microambiente tumoral (TME) de la LLC al interactuar con las células leucémicas. En particular, los linfocitos T CD4+ tipo T-helper (Th) están fuertemente correlacionados con las células B leucémicas en los centros proliferativos de los pacientes con LLC, promoviendo su multiplicación mediante el contacto directo y la secreción de diversas citocinas. Se ha observado un aumento absoluto de células CD4+ en la sangre periférica de estos pacientes, y se ha demostrado que los linfocitos Th favorecen el crecimiento y la supervivencia de las células de LLC (Os et al., 2013; Vlachonikola et al., 2021; Roessner & Seiffert, 2020).

Las células T CD4+ activadas expresan CD40L, una molécula clave en la activación de la vía NF-κB no canónica. Su interacción con CD40 en las células de LLC favorece su supervivencia, aunque

esta señal por sí sola no es suficiente para inducir un crecimiento significativo. Se requieren otros factores del microambiente, como IL-21, IFN- γ e IL-4, que aumentan la expresión de CD40 en las células de LLC, potenciando su activación por CD40L y promoviendo la activación de distintas vías, como NF- κ B y STAT6. Esto induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como BFL-1, BCL-XL y MCL-1 (Pascutti et al., 2013; Os et al., 2013; Bhattacharya et al., 2015; Haselager et al., 2020) y de la enzima mutagénica AID (Morande y Sivina et al., 2019).

La activación de las células de LLC a través de CD40L no solo favorece su supervivencia, sino que también remodela el nicho tumoral al promover el reclutamiento y la retención de linfocitos T en los OLS. Las células de LLC activadas secretan quimiocinas como CCL22, que atraen linfocitos T CD4+, especialmente Th2 y Tregs, contribuyendo a un entorno inmunosupresor. Además, su interacción con células dendríticas mieloides induce la producción de CCL3 y CCL4, cuya presencia se ha asociado con una mayor infiltración de linfocitos T en los ganglios linfáticos y reduciendo su movilidad dentro de los OLS (Burger et al., 2009).

Además de proporcionar señales de supervivencia y proliferación, las células de LLC modulan el microambiente inflamatorio para evadir la respuesta inmune. En SP, los linfocitos T CD8+ presentan un estado "pseudoexhausto", caracterizado por la expresión de PD-1 y una mayor producción de citocinas como IL-10, una citoquina inmunosupresora que favorece la expansión de Tregs (Roessner & Seiffert, 2020). Sin embargo, en ganglios linfáticos y bazo, estos linfocitos muestran un agotamiento funcional completo, con una reducción en la producción de citocinas y una mayor expresión de múltiples receptores inhibidores, lo que sugiere que el agotamiento inmunológico en la LLC ocurre principalmente en los OLS (Riches et al., 2013; Hanna et al., 2019; Vlachonikola et al., 2021).

Estas interacciones con las células T generan un microambiente que no solo favorece la expansión/proliferación del clon leucémico, sino que también debilita la respuesta inmunitaria, facilitando la progresión de la enfermedad.

1.5.2 Microambiente Estromal y *Nurse-like cells* (NLCs) en la LLC

Las células nodrizas o *nurse-like cells* (NLC, por sus siglas en inglés) LLC fueron descritas por primera vez por Burger y colaboradores en el 2000, quienes demostraron que estas células

diferencian a partir de monocitos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LLC en cultivos in-vitro, siendo células más grandes y adherentes. Posteriormente, también se encontraron in-vivo, dentro de pseudofolículos en infiltrados de tejido, confirmando un rol en la enfermedad (Burger et al., 2000).

In-vitro, las NLCs protegen a las células leucémicas contra la apoptosis espontánea mediante la producción de diversas quimiocinas e interleucinas, incluyendo SDF1, IL8, CCL2 y CXCL9, además de contacto directo célula a célula (Burger et al., 2009; Filip et al., 2013). Filip y colaboradores demostraron que el co-cultivo de células de LLC con NLCs mantuvo viable al clon leucémico hasta 14 semanas. Además, las NLCs parecen proteger las células leucémicas in vivo, como lo evidencian los mismos autores en observaciones sobre que los pacientes con menos NLCs in-vitro tienden a mostrar una mayor supervivencia global (Filip et al., 2013).

Asimismo, estas células inducen la quimiotaxis de las células leucémicas mediante la secreción de quimiocinas como CXCL12 y CXCL13, facilitando el reclutamiento de células de LLC hacia el microambiente tumoral (Burger et al., 2000; Bürkle & Niedermeier, 2007). También son productoras de quimiocinas como CCL3 y CCL4, esenciales para la atracción de monocitos y linfocitos T a los tejidos linfoides (Burger et al., 2009). Además, las NLCs pueden expresar y secretar distintos factores promotores como Plexin B1, CD31, BAFF y APRIL, los cuales activan la señalización del BCR y contribuyen a la proliferación y supervivencia de las células leucémicas de LLC (Filip et al., 2013).

Por su parte, las células estromales mesenquimales (MSC, del inglés, *Mesenchymal stromal cells*) representan también un componente fundamental del microambiente tumoral en la LLC. En condiciones normales, estas células regulan la hematopoyesis y la estructura tisular; sin embargo, en la LLC facilitan la progresión de la enfermedad al proporcionar señales de soporte tanto a través del contacto directo como mediante factores solubles (Kurtova et al., 2009; Dubois et al., 2020). Se ha observado que la frecuencia de las MSC está relacionada con un peor pronóstico, ya que su interacción con las células leucémicas previene la apoptosis espontánea y promueve la resistencia a fármacos (Ding et al., 2009; Kurtova et al., 2009; Marquez et al., 2015).

El contacto de las células de LLC con MSC de médula ósea (BM-MSC, del inglés, *bone marrow-mesenchymal stromal cells*) induce la secreción de factores como CXCL12 (SDF1) y TGF- β 1, los

cuales favorecen su supervivencia (Pontikoglou et al., 2013). A su vez, las células de LLC también pueden influir en el comportamiento de las MSC mediante la liberación de microvesículas que contienen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), lo que activa las BM-MSC y potencia su proliferación y migración a través de la vía Akt/ERK (Ding et al., 2009). Como respuesta, las MSC activadas secretan citocinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-15 y TGF- β 1, creando un entorno que favorece la persistencia y expansión del clon tumoral (Dubois et al., 2020).

Otro componente esencial del microambiente tumoral son las células endoteliales, las cuales facilitan la retención de la LLC en los tejidos y contribuyen a su activación. Estas células, que recubren la vasculatura de la médula ósea y los ganglios linfáticos, secretan factores como BAFF y APRIL, que favorecen la supervivencia de las células leucémicas (Cols et al., 2012). Se ha demostrado que la interacción con el endotelio, mediada por integrinas, protege a las células de LLC de la apoptosis inducida por fludarabina (Maffei et al., 2012).

Por su parte las células dendríticas foliculares (FDCs) desempeñan también un papel importante en la organización de los pseudofolículos linfoides y en la comunicación con las células leucémicas a través de la secreción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, CD44 y Plexin B1 (Heinig et al., 2014). Además de su función estructural, las FDCs protegen a las células de LLC de la apoptosis mediante contacto directo y la sobreexpresión de MCL-1. La interacción entre CXCR5 y CXCL13 facilita el posicionamiento de las células leucémicas dentro de los pseudofolículos y contribuye a la progresión tumoral en modelos murinos de LLC (Heinig et al., 2014). Asimismo, co-cultivos de FDCs con células de LLC inhiben la apoptosis espontánea de estas últimas a través de la interacción con CD44, promoviendo la sobreexpresión de MCL-1 (Pedersen et al., 2002).

Asimismo, se ha demostrado que los exosomas derivados de LLC son incorporados por células endoteliales y MSCs, llevando proteínas y microARNs que inducen un fenotipo inflamatorio en las células receptoras, similar al de los fibroblastos asociados al cáncer. Esto aumenta la proliferación, migración y secreción de citocinas inflamatorias. Además, la captación de exosomas por células endoteliales potencia la angiogénesis y acelera el crecimiento tumoral en modelos murinos inmunodeficientes (Paggetti et al., 2015). En este contexto, un trabajo previo de nuestro grupo demostró que los exosomas derivados del clon tumoral y portadores de la

proteína proinflamatoria S100A9 son secretados al plasma de pacientes con LLC. Este estudio mostró una asociación entre la presencia de S100A9 en las células de LLC y en el plasma, y la activación de la vía NF- κ B en células primarias de LLC obtenidas de pacientes con alta progresión neoplásica (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017).

1.6 Proteína S100A9 y su implicancia en el cáncer

Las proteínas S100 forman parte de un grupo de proteínas de bajo peso molecular asociadas con la regulación de procesos inflamatorios en diversas enfermedades autoinmunes y neoplasias (Roth et al., 2001; Srikrishna, 2012; Bresnick et al., 2015). Se consideran alarminas, también conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMP). En condiciones inflamatorias, su expresión se induce en una amplia variedad de células, como células mieloides, endoteliales, macrófagos, osteoclastos, queratinocitos y células dendríticas (Burwinkel et al., 1994; Roth et al., 2001; Srikrishna, 2012). Interesantemente, las principales células productoras de estas proteínas son los neutrófilos, donde específicamente S100A9 y S100A8 constituyen aproximadamente el 40% de las proteínas citosólicas en estas células, lo que sugiere, por su abundancia, un papel importante en las funciones efectoras de los neutrófilos (Nacken et al., 2003).

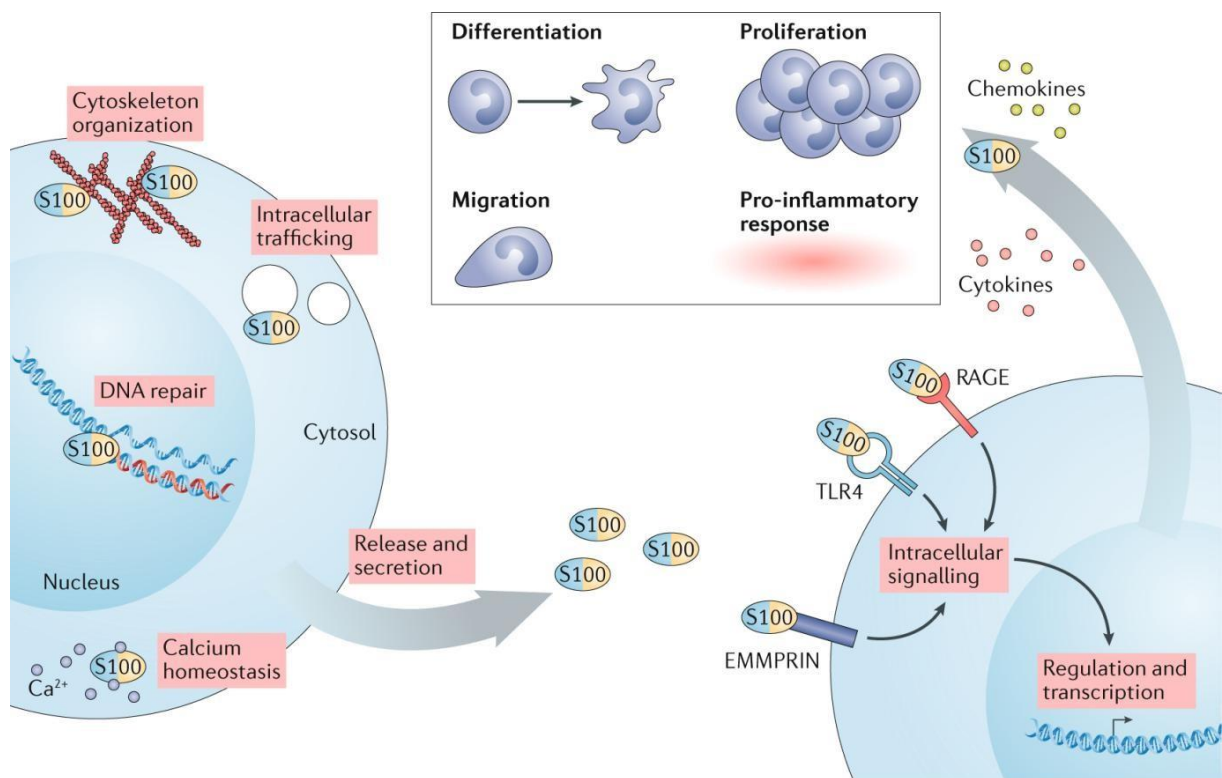


Figura 3. Funciones intracelulares y extracelulares de las proteínas S100. Dentro de la célula, las proteínas S100 participan en la homeostasis del calcio, la reparación del ADN, el tráfico de proteínas y la organización del citoesqueleto. Una vez liberadas o secretadas, interactúan con distintos receptores, activando vías proinflamatorias que favorecen la activación, migración, proliferación y diferenciación celular (Adaptado de Austermann, Spiekermann & Roth, 2018).

Específicamente S100A9 se secreta al espacio extracelular en forma de monómeros, homodímeros o un heterodímero S100A8/S100A9, conocido como calprotectina (Srikrishna, 2012) mediante un mecanismo dependiente de calcio, lo que facilita su translocación desde el citoplasma hacia la membrana celular. Una vez en el espacio extracelular puede interactuar con varios receptores celulares. Se ha reportado que S100A9 interactúa principalmente a través de *toll-like receptor* (TLR4) y *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer* (EMMPRIN), este último ha sido identificado como un receptor específico para el dímero S100A9 (Hibino et al., 2013). Por otro lado, el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) es descrito como el receptor principal para el heterodímero S100A8/S100A9, pero no para el homodímero de S100A9 (Ma et al., 2017; Ghavami et al., 2008). Además, se han descrito otros receptores que pueden interactuar con S100A9 o el heterodímero S100A8/S100A9 como CD36 (Wang et al., 2014) y CD33 (Cheng et al., 2008).

Niveles elevados de S100A9 en suero se encuentran en diversas patologías inflamatorias, como Alzheimer, psoriasis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (Roth et al., 2001; Wang et al., 2014; Inciarte-Mundo et al., 2022). Considerando el impacto que puede tener la inflamación en las neoplasias crónicas y diferentes tumores, se explica en gran medida el papel de S100A9 en la progresión y desarrollo oncológico. Diversos estudios respaldan su impacto pro-tumoral en varios cánceres sólidos. La expresión de S100A9 está desregulada en tipos de tumores como mama, próstata, colon y melanoma (Kim et al., 2009; Li et al., 2022; Hermani et al., 2005).

S100A9 podría estar involucrada en la progresión del cáncer mediante varios mecanismos. Por ejemplo, S100A9 expresada por células mieloides y células tumorales en el microambiente tumoral es importante para la acumulación y activación de células mieloides regulatorias (como las MDSC) (Srikrishna, 2012; Markowitz & Carson, 2013). Además, S100A9 tiene un papel en el reclutamiento tanto de células inflamatorias como tumorales hacia sitios metastásicos, siendo esto observado en pacientes con cáncer de próstata y melanoma agresivos y metastásicos (Lv et al., 2020; Hibino et al., 2013).

Dado su impacto en la inflamación y la progresión tumoral, S100A9 ha sido propuesto como un blanco terapéutico de gran relevancia a nivel oncológico y en enfermedades autoinmunes (Björk et al., 2009; Hibino et al., 2013; Markowitz & Carson, 2013; Wang et al., 2014). Las Quinoline-3-Carboxamidas, o compuestos Q, son una clase de moléculas que se han propuesto como inhibidores de la proteína S100A9 (Björk et al., 2009; Leanderson et al., 2015), pensando en su utilización en la terapia inmune. Estos compuestos tienen como objetivo bloquear las interacciones entre S100A9 y sus receptores, interfiriendo con las vías de señalización que S100A9 regula, lo que en consecuencia reduce los efectos inflamatorios y la progresión tumoral asociados con esta proteína. Algunos de estos inhibidores han sido evaluados en ensayos clínicos para diversas patologías: Laquinimod en esclerosis múltiple (Polman et al., 2005; Comi et al., 2008), Paquinimod en lupus eritematoso sistémico (Bengtsson et al., 2012) y Tasquinimod en cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (Mehta et al., 2016).

Tasquinimod ha demostrado efectos sobre el TME al bloquear la interacción entre S100A9 y sus receptores. Este compuesto ha mostrado resultados prometedores en diversos tipos de cáncer, incluidos el cáncer de próstata, el cáncer colorrectal y mieloma múltiple (Raymond et al., 2014;

Shen et al., 2015; Fan et al., 2023). Se ha observado que Tasquinimod inhibe la progresión y migración tumoral al interferir con la señalización mediada por S100A9, lo que impacta en la interacción entre las células tumorales y el entorno inmunológico circundante. En cuanto a ensayos clínicos, Tasquinimod ha sido previamente estudiado como agente anticancerígeno en un ensayo clínico aleatorizado de fase 3 en pacientes con cáncer de próstata metastásico, que mostró una mejora en la supervivencia libre de progresión (Sternberg et al., 2016). Actualmente, se encuentra en evaluación como terapia para diversos tumores, incluidos los de neoplasias hematológicas, en un ensayo clínico de fase I en mieloma múltiple refractario (NCT04405167), así como en mielofibrosis en pacientes con resistencia primaria o que han progresado tras el tratamiento con un inhibidor de JAK quinasa (NCT06605586). Sin embargo, hasta la fecha, no se han reportado estudios sobre su uso en la LLC.

1.7 Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN)

El receptor de S100A9, EMMPRIN (también conocido como CD147), es una glicoproteína de membrana perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. Se expresa en diversos tipos celulares, tanto en tejidos normales como en el desarrollo embrionario (Xiong et al., 2014; Tang et al., 2004). Su sobreexpresión ha sido reportada en varios tumores malignos, y se ha asociado con un comportamiento clínico agresivo y un mal pronóstico (Xin et al., 2016). En melanoma, por ejemplo, la interacción entre S100A9 y EMMPRIN ha sido vinculada con la promoción del cáncer. Además, diversos estudios han resaltado el papel de EMMPRIN en la angiogénesis mediante la estimulación de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Ghandour et al., 2024; Gabison et al., 2005; Liu et al., 2010). También interactúa con las integrinas $\alpha3\beta1$ y $\alpha6\beta1$, regulando la adhesión a proteínas de la matriz extracelular como colágeno, laminina y fibronectina (Dai et al., 2009).

En neoplasias hematológicas, se ha observado una alta expresión de EMMPRIN en células leucémicas de MO de pacientes con leucemia mieloide aguda (Fu et al., 2017). En el contexto de la LLC, el trabajo mencionado anteriormente de nuestro laboratorio (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017) mostró niveles elevados de EMMPRIN en LLC, caracterizándose sus isoformas y su interacción con S100A9, además de la activación de NF-KB como vía de progresión tumoral.

Posteriormente, Rodríguez y colaboradores reportaron que la interacción entre las células leucémicas y las células estromales aumentaba la expresión de EMMPRIN en el clon tumoral, sugiriendo su participación en la progresión (Rodríguez et al., 2020).

En cuanto a su función biológica, EMMPRIN, fue nombrado como "*extracellular matrix metalloproteinase inducer*" debido a su capacidad para inducir la producción de MMPs por las células cancerígenas, fibroblastos y células endoteliales, promueve la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal, facilitando la proliferación, invasión y metástasis tumoral (Tang et al., 2004; Gabison et al., 2005). Se ha demostrado que EMMPRIN estimula la producción de MMPs en fibroblastos vecinos, y estudios posteriores han mostrado que también puede inducir MMP en la misma población celular. Además, se ha reportado que la sobreexpresión de MMP-9 ocurre también en células LLC, y que los niveles elevados de (pro)MMP-9 intracelular se correlacionan con el estadio avanzado de esta neoplasia, así como con una mala supervivencia del paciente (Gusella et al., 2017; Redondo-Muñoz, 2006; Rodríguez et al., 2020).

1.8 S100A9/EMMPRIN como un potencial blanco terapéutico en la LLC

Los pacientes con una LLC progresora presentan un microambiente tumoral altamente activado, caracterizado por un entorno inflamatorio que favorece la proliferación y supervivencia de las células leucémicas. Evidencias recientes han demostrado que el clon tumoral no solo depende de señales autocrinas, sino que también interactúa activamente con células accesorias del microambiente, como células T, NLCs y monocitos, estableciendo un entorno que promueve la supervivencia de las células de LLC y resistencia a los tratamientos.

En este contexto, estudios previos de nuestro grupo en LLC identificaron a la proteína proinflamatoria S100A9 como un factor clave en la activación del clon tumoral (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017 y Payque, tesina de grado, 2022). Se encontró que las células B de LLC son capaces de expresar S100A9, una proteína cuya expresión no había sido previamente descrita en estas células. Profundizando aún más en esto, se identificaron exosomas derivados del clon tumoral que contenían S100A9 y eran secretados al plasma de pacientes con LLC. Finalmente, este trabajo evidencia una asociación directa entre la progresión tumoral en LLC y la presencia

de S100A9, describiendo un mecanismo de autoactivación del clon tumoral a través de la activación de la vía NF- κ B en células primarias de pacientes con alta progresión tumoral, Asimismo, se encontró que las células B leucémicas expresan niveles elevados del receptor EMMPRIN y pueden interactuar tanto con la proteína recombinante S100A9 como con exosomas plasmáticos de pacientes progresores que la contienen. Estos hallazgos, confirmados por citometría de flujo y microscopía confocal, demostraron la colocalización de S100A9 con EMMPRIN en la superficie celular (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017).

Mi trabajo de tesis de grado y, posteriormente, mi maestría se enmarca dentro de esta línea de investigación. En mi tesis, confirmamos que el receptor de S100A9, EMMPRIN, está sobreexpresado en células B leucémicas y que, además, la estimulación de células primarias de pacientes con S100A9 recombinante humana (rhS100A9) induce la fosforilación de AKT^(Ser473). Estos datos sugieren que la activación de la vía PI3K/AKT, también sería un blanco del eje S100A9/EMMPRIIN ya que su inhibición con Tasquinimod, es capaz de reducir significativamente la fosforilación de AKT (Payque, 2022).

A partir de estos hallazgos y los estudios previamente detallados, surgieron las preguntas y objetivos de mi tesis de maestría, que buscan profundizar en el papel del eje S100A9/EMMPRIIN en la progresión de la LLC. El objetivo general más amplio y ambicioso es establecer las bases teóricas para explorar el uso de inhibidores del eje S100A9/EMMPRIIN como una estrategia terapéutica en el tratamiento de la LLC.

Objetivo general e hipótesis

Caracterizar los mecanismos moleculares a través de los cuales la proteína S100A9 regula las principales vías de proliferación tumoral NF- κ B, pi3K/AKT y MAPK/JNK en la LLC; aportando datos preclínicos que validen la hipótesis del trabajo: *“Inhibir la actividad de la proteína pro-inflamatoria S100A9 podría ser un blanco terapéutico alternativo en la LLC”*

Objetivos Específicos

- 1) Caracterización molecular de EMMPRIN como único receptor del homodímero S100A9, en células de LLC.
- 2) Evaluación de las señales de progresión tumoral (sobrevida, ciclo celular y migración) en las células leucémicas luego de la activación con la proteína S100A9
- 3) Estudios de inhibición del eje S100A9/EMMPRIN como un modelo de blanco terapéutico en la LLC
- 4) Caracterización funcional *in-vivo* del rol del homodímero S100A9 en la LLC

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras de pacientes con LLC

Las muestras utilizadas en el presente trabajo fueron aprobadas por los comités institucionales del Hospital Maciel (No. 28/2017), CASMU (No. 2019/2017), el Institut Pasteur de Montevideo (No. 05/2022) y el H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute (Pro00000316_CR000003). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito, de acuerdo con las normativas éticas y los principios de la Declaración de Helsinki. El diagnóstico de LLC se basó en características celulares e inmunofenotípicas, siguiendo las guías de diagnóstico vigentes (Rawstron et al., 2018).

Una vez obtenida la sangre periférica (SP), se procedió al aislamiento de las PBMCs por centrifugación en gradiente de densidad, utilizando el reactivo Ficoll-Histopaque-1077 (Sigma), siguiendo indicaciones del proveedor e inmediatamente criopreservadas con 90% Suero Fetal Bovino (SFB) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), utilizando el recipiente de congelación Mr. Frosty™ (Thermo Scientific™), almacenadas a -80 °C y posteriormente en nitrógeno líquido.

Para los ensayos los pacientes fueron divididos y clasificados en dos grupos: **(1) progresores**, caracterizados por un tiempo de duplicación linfocitaria < 6 meses, necesidad de tratamiento antes de los 3 años, expresión de AID y LPL positiva y estado mutacional de IGVH No mutado (U-LLC), y **(2) indolentes**, caracterizados por un tiempo de duplicación linfocitaria > 6 meses, sin necesidad de tratamiento antes de 4 años, estado mutacional de IGVH mutado (M-LLC) y ausencia de expresión de AID y LPL en SP. La tabla con las características clínicas y moleculares de cada paciente se encuentran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Caracterización clínica y molecular de los pacientes con LLC estudiados.

	Edad	Sexo	Estadio Binet	LBC (células/uL)	IGVH	AID	LPL	Reordenamiento IGVH	Estado clínico de la enfermedad
1	79	M	A	31000	M	(-)	(-)	VH3-21*01	Indolente
2	61	F	A	42620	M	(-)	(-)	VH4-34*01 y *02	Indolente
3	55	F	A	22900	M	(-)	(-)	VH5-51*01	Indolente
4	50	M	A	40000	M	(-)	(-)	VH4-34*01	Indolente
5	61	M	A	42700	M	(+)	(-)	VH4-59*01	Indolente
6	67	F	A	21570	M	(-)	(-)	VH3-33*01	Indolente
7	79	F	A	22520	M	(-)	(-)	VH3-48*03	Indolente
8	54	M	B	30060	M	(-)	(-)	VH3-7*01	Indolente
9	49	F	A	57000	M	(-)	(-)	VH2-05*02	Indolente
10	76	M	A	28680	M	(-)	(+)	VH4-34*02	Indolente
11	71	M	A	35700	UM	(-)	(-)	VH1-3*01	Indolente
12	55	M	A	14400	M	(-)	(-)	VH3-23*01	Indolente
13	55	F	A	16000	M	(-)	(-)	VH4-34*01	Indolente
14	74	M	A	16580	M	(-)	(-)	VH1-2*02	Indolente
15	72	M	A	22100	M	(-)	(-)	VH2-5*02	Indolente
16	62	M	C	170000	UM	(-)	(+)	VH1-18*01	Activa/Progresiva
17	63	M	B	86000	UM	(+)	(+)	VH3-30*18	Activa/Progresiva
18	79	M	C	213300	M	(+)	(+)	VH3-48*04	Activa/Progresiva
19	52	M	C	421000	UM	(+)	(+)	VH1-69*01	Activa/Progresiva
20	57	M	B	59000	UM	(+)	(-)	VH3-74*01	Activa/Progresiva
21	69	M	C	6816	UM	(+)	(+)	VH3-21*01	Activa/Progresiva
22	77	M	B	137780	M	(+)	(+)	VH3-23*01	Activa/Progresiva
23	33	M	C	400000	UM	(+)	(+)	VH4-39	Activa/Progresiva
24	51	M	C	120000	UM	(-)	(-)	VH1-69*12	Activa/Progresiva
25	74	M	C	303000	UM	(-)	(+)	V4-39*01	Activa/Progresiva
26	63	F	C	102400	UM	(+)	(+)	VH4-61*02	Activa/Progresiva
27	50	M	C	143630	M	(+)	(+)	VH3-7*01	Activa/Progresiva
28	59	M	C	85460	M	(-)	(-)	VH2-5	Activa/Progresiva
29	63	M	IB	31980	UM	(+)	(+)	VH1-2*02	Activa/Progresiva
30	61	M	C	215800	UM	(+)	(+)	VH1-69*13	Activa/Progresiva

Para cada paciente se incluyó: Clasificación clínica de Binet; Recuento linfocitario (10x10³ células/uL) en SP; Perfil mutacional IgVH: Mutado o No mutado; Reordenamiento IGVH; Expresión de AID y LPL.

2.2 Análisis de expresión de EMMPRIN por Western Blot

PBMCs ($5-10 \times 10^6$) se lisaron en buffer RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*, Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM, 1% NP-40, 0.1% desoxicolato de sodio, SDS 0.1%, NaCl 140mM, diluido en dH₂O) con inhibidores de proteasas (Roche, Cat. N° 11873580001), ajustando el volumen del buffer según el número de células. Se incubaron las células con el buffer RIPA por 10 minutos en hielo y se prosiguió con la lisis utilizando un homogeneizador ultrasónico con micro-punta, aplicando 4 pulsos ultrasónicos de 30% de amplitud, cada 10 segundos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,500 rcf por 15 minutos a 4°C, recolectando el sobrenadante que contiene las proteínas solubles. La concentración de proteínas se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher). Previo al sembrado, las muestras se diluyeron en buffer de carga (β -mercaptoetanol 25%, SDS 2.5%, Glicerol 50%, Buffer Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, Azul de Bormofenol 0.1 mg/mL), y se calentaron a 95°C por 10 minutos para su reducción.

Posteriormente, se cargaron 50ug de proteína por muestra y se separaron mediante electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 10%. La migración se efectuó fijando la corriente eléctrica en 25 mA constantes por gel. Posteriormente, se realizó electrotransferencia húmeda en membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Amersham, G&E) durante 1:30hs a una corriente eléctrica constante de 150 mA. Para confirmar la correcta transferencia de proteínas se tiñeron las membranas con el colorante rojo ponceau 0,2% v/v en 5% de ácido acético. Luego de confirmar la transferencia, se procedió a bloquear la membrana con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 0.3% a 37°C durante 1h, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C en agitación suave con un anticuerpo anti-EMMPRIN humano conjugado a HRP (Santa Cruz) a una dilución de 1:200 en PBS-Tween 20 0,3%, -Leche 3%. Los anticuerpos utilizados para WB se encuentran detallados en la tabla 4. Al día siguiente se lavó la membrana 3 veces con PBS-Tween 20 0,3% y las bandas de proteína se detectaron mediante quimioluminiscencia (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Kit*, Thermo Scientific™), la señal se capturó usando el fotodocumentador Image Quant 800 (Amersham Biosciences, Amersham, Reino Unido).

Una vez obtenidas las imágenes para EMMPRIN se utilizó como control de carga proteica para poder evaluar semicuantitativamente la expresión del receptor, un anticuerpo específico para la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para ello, se realizó el protocolo de remoción de anticuerpos (*stripping*) incubando la membrana con 7 M de cloruro de guanidina durante 7 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Luego, se realizaron tres lavados de 2 minutos con PBS-Tween 20 0.3%, se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 0.3% durante 1h a 37°C, y se retomó el protocolo utilizando el anticuerpo anti-GAPDH seguido del anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (Tabla 4).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western Blot

Anticuerpo	Compañía	Clon	Dilución
Anti-EMMPRIN-HRP (CD147)	Santa Cruz #21746	8D6	1:200
Anti-GAPDH	Abcam #ab37168	Policlonal	1:5000
Anti-conejo IgG HRP (Ac. secundario)	Sigma-Aldrich A0545	Policlonal	1:10000

Los resultados obtenidos de WB se analizaron de forma semicuantitativa midiendo la intensidad óptica de las bandas de interés se cuantificó utilizando el software ImageJ. Los valores de las señales de EMMPRIN se normalizaron dividiéndolos por los de GAPDH, obteniendo así cantidades relativas.

2.2.1 Ensayo de desglicosilación de EMMPRIN

El tipo de glicosilación de EMMPRIN ha sido previamente caracterizado en distintos tipos de cánceres, mostrando que esta glicoproteína de membrana presenta diferentes grados de N-glicosilación, los cuales pueden influir en su función biológica y en su interacción con otros receptores o ligandos (Tang et al., 2004; Bai et al., 2014).

Para evaluar el tipo de glicosilación de EMMPRIN en las células de LLC se realizó un ensayo de desglicosilación desnaturalizante utilizando la enzima N-glicosidasa F (PNGasa F, Promega Cat. NºV4831) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esta enzima remueve específicamente las N-glicosilaciones. Se usaron 20 µg de lisado de proteínas en buffer RIPA, añadiendo SDS 5%, DTT 1M, y desnaturalizando a 95°C 5 minutos. A continuación, a temperatura ambiente se añadió buffer fosfato de sodio 0.5M (pH 7.5), NP-40 10%, y PNGasa F, se incubó durante 3 horas a 37°C. Luego, se agregó buffer de carga y los productos desglicosilados se analizaron mediante WB siguiendo el protocolo mencionado anteriormente.

2.3 Análisis de expresión basal de EMMPRIN y RAGE por citometría de flujo

PBMCs (10×10^6) de pacientes con LLC se descongelaron y fueron incubadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células/pozo en un volumen de 200µL de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y antibióticos a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Se evaluó la expresión de EMMPRIN luego de la activación con diferentes estímulos: CpG-ODN (A una concentración final, Cf: 2µM) más IL-15 (Cf: 15ng/ml, Peprotech, Cranbury, NJ); o anti-IgM (Cf: 20mg/ml, Jackson Laboratory) ambos durante 48 horas, y CD40L soluble humano (Cf: 1µg/ml, Peprotech) más IL-4 (Cf: 5ng/ml, Peprotech) durante seis días. Las células no estimuladas cosechadas luego de los tiempos específicos para cada estimulación fueron utilizadas como control. Posteriormente, se analizó la expresión de EMMPRIN por WB siguiendo el protocolo mencionado en el punto 2.2 y por citometría de flujo.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para el análisis de EMMPRIN y RAGE por citometría de flujo

Anticuerpo	Compañía	Clon	Fluorocromo	Dilución
Anti-CD19	Biolegend #302228	HIB19	PerCP	1:50
Anti-CD5	Biolegend #300606	UCH2	FITC	1:50
Anti- RAGE	Santa Cruz #5563	H-300	No conjugado	1:40
Anti-rabbit IgG	Invitrogen #A10523	Policlonal	APC	1:1000
Anti- EMMPRIN	Biolegend #306216	HIM6	PE/Cy7	1:10

Para la adquisición de los datos, se utilizaron controles de fluorescencia menos uno (FMO), es decir, muestras marcadas con todos los anticuerpos menos el blanco a analizar. Los análisis de citometría de flujo se realizaron en el citómetro Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y los datos fueron procesados con el software FlowJo (BD Biosciences, versión 10.8.1).

2.4 Estimulación de PBMCs *in-vitro* y evaluación de EMMPRIN

PBMCs (10×10^6) de pacientes con LLC se descongelaron y fueron incubadas en placas de 96 pocillos a una densidad de 100.000 células/pozo en un volumen de 200 μ L de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y antibióticos a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Se evaluó la expresión de EMMPRIN luego de la activación con CpG-ODN (A una concentración final, CF, de 2 μ M) más IL-15 (Cf: 15ng/ml, Peprotech, Cranbury, NJ), anti-IgM (Cf: 20mg/ml, Jackson Laboratory) durante 48 horas, y CD40L soluble humano (Cf: 1 μ g/ml, Peprotech) más IL-4 (Cf: 5ng/ml, Peprotech) durante seis días. Las células no estimuladas obtenidas luego de los tiempos específicos para cada estimulación fueron utilizadas como control. Posteriormente, se analizó la expresión de EMMPRIN por WB y por citometría de flujo como fue descrito previamente.

Para el protocolo de citometría de flujo se colocaron las células de cada condición en una placa de 96 pocillos, se tiñeron inicialmente con el marcador de viabilidad *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* (Biolegend) diluido 1:1000 y se incubaron en oscuridad 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS 1X y se prosiguió a realizar el marcaje extracelular con los anticuerpos anti-CD5^{-FITC} y anti-CD147^{-PECy7} en las condiciones descritas previamente. Luego de esta etapa, las células fueron fijadas y permeabilizadas con el kit Cyto-Fast/Perm (BioLegend) para permitir la detección de proteínas intracelulares. En esta fase, se realizó la marcación intracelular con anti-IgM^{-PE} (1:50) y se volvió a marcar CD147-PECy7 para cuantificar tanto la expresión en la membrana celular como la presencia de su forma inmadura dentro del retículo endoplasmático. Todos los marcadores se determinaron utilizando controles de FMO.

Los anticuerpos y sus respectivas diluciones se encuentran detallados en la tabla 5. La adquisición se realizó en el citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y los datos se analizaron con el software FlowJo (BD Biosciences), versión 10.8.1.

2.5 Evaluación de la expresión de proteínas implicadas en la activación de las vías NF- κ B, Pi3K/AKT y MAPK/JNK luego de la activación *in-vitro* con S100A9

PBMCs de pacientes con LLC con diferente evolución clínica (progresores e indolentes) se descongelaron en medio RPMI-1640 con 10% de FBS y se ajustó la concentración celular final a 2×10^6 células/mL. En todos los tratamientos aplicados, las células se sembraron en placas de cultivo de 48 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pozo por condición en un volumen de 500 μ l. Las células fueron incubadas con 10 μ g/mL S100A9 humana recombinante (rhS100A9) (MyBioSource, San Diego, CA) en medio RPMI-1640-10% de FBS y antibióticos a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂. La evaluación del estado dimérico de la proteína S100A9 del proveedor fue realizado en la Unidad de Proteínas Recombinantes del IPMont, mediante gel filtración, datos no mostrados. Posteriormente, se realizó citometría de flujo para evaluar las proteínas anti-apoptóticas MCL-1 y BCL-2, así como fosfo-retinoblastoma 1 después de 48 horas. La fosforilación de AKT1^(Ser473 y Thr308), IKK α/β ^(Ser176/180) y *c-Jun N-terminal kinase* (JNK^(Thr183/185)) se analizó después de 72 horas. Como fue descrito previamente la fosforilación en estos residuos son evidencia del estado de activación de estas vías (Nishina, Wada & Katada, 2004; Arcaro & Guerreiro, 2007; Zhuang et al., 2010; Kim, Hawke & Baldwin, 2006).

Para los experimentos en los que se añadieron los inhibidores *in-vitro*, se utilizó como inhibidores de S100A9 Tasquinimod (TasQ) (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ) o Paquinimod (PaQ) (MedChemExpress) a Cf:10 μ M. El anticuerpo bloqueador de EMMPRIN (Ansell, Bayport, MN. Clon UM-8D6, Cat. 376-020) a Cf:10 μ g/mL y el inhibidor AC-73 (Cf:1 μ M, MedChemExpress), que se une específicamente a EMMPRIN e interrumpe su dimerización impidiendo su función (Fu ZG et al., 2016). Las células no estimuladas al tiempo final del experimento fueron utilizadas como control.

Luego de la incubación *in-vitro* las células se analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica. Las células leucémicas tratadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 300.000 células por pozo. Se centrifugaron por 5 minutos y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, se marcaron con el marcador de viabilidad *Zombie Violet™ Fixable Viability Kit* (Biolegend), diluido 1:1000, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La marcación con anti-CD5-^{PECy7} diluido 1:100 la fijación y permeabilización para el posterior marcaje con el anti-IgM-^{PE} se realizaron como fue previamente descrito. Los anticuerpos intracelulares para las moléculas blanco específicas (MCL-1 y BCL-2, pRB-1, AKT1^(Ser473 y Thr308), IKK α/β ^(Ser176/180) y JNK^(Thr183/185) fueron utilizados como se detallan en la lista de anticuerpos en la Tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados para el análisis de proteínas implicadas en la activación de las vías NF- κ B, Pi3K/AKT y MAPK/JNK.

Anticuerpo	Proveedor	Clon	Fluorocromo	Dilución
Anti-pAKT ^(Ser473)	Invitrogen #17-9715-42	SDRNR	APC	1:200
Anti-pAKT ^(Thr308)	Cell Signaling #43506S	D25E6	Alexa Fluor 488	1:100
Anti-pIKK α/β ^(Ser176/180)	Cell Signaling #2078S	16A6	No conjugado	1:200
Anti-JNK ^(Thr183/185)	Cell Signaling #9257S	G9	Alexa Fluor 647	1:100
MCL-1	Cell Signaling #78471S	D2W9E	Alexa Fluor 647	1:100
BCL-2	Biolegend #658706	Péptido sintético	Alexa Fluor 647	1:100
phospho-Rb ^(Ser807/811)	Cell Signaling #8974S	D20B12	Alexa Fluor 647	1:100
Anti-rabbit IgG (Ac. secundario)	Invitrogen #A10523	Policlonal	APC	1:1000

Para llevar a cabo la compensación de fluorescencia, se prepararon controles con perlas UltraComp eBeads™ Compensation Beads (Invitrogen), cada uno marcado con un único fluorocromo empleado en la marcación. Todos los marcadores se determinaron utilizando controles FMO. La adquisición se realizó en el citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y los datos se analizaron con el software FlowJo (BD Biosciences), versión 10.8.1.

2.6 Análisis de muerte celular mediada por Caspasa-3/7 en células activadas con rhS100A9 por citometría de flujo

PBMCs (1×10^6) de LLC fueron incubadas *in-vitro* en medio RPMI-1640-10% de FBS y antibióticos con o sin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rhS100A9. Las células se mantuvieron en un incubador con una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂ por 48 hs. Posteriormente, se realizaron experimentos para determinar el porcentaje de células apoptóticas utilizando el kit *Caspase-3/7 Flow Cytometry Assay* (Invitrogen). Este kit permite la detección de caspasa-3 y caspasa-7 activadas en células apoptóticas e incluye el marcador de viabilidad SYTOX™ AADvanced™ Dead Cell.

Se colocaron 0.5×10^6 células de cada condición en una placa de 96 pocillos, se lavaron con PBS 1X y se realizó el marcaje de superficie utilizando los anticuerpos CD5-^{PE-Cy7} y CD19-^{PB}, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Posteriormente, se lavaron las células con PBS 1X y se agregaron 50 μL del reactivo A del kit Caspase 3/7-FITC, diluido 1/1000, y se incubó durante 25 minutos a 37°C, protegido de la luz. A continuación, se agregaron 50 μL de reactivo B SytoxAADvanced, diluido 1/500, por 5 minutos a 37°C, protegido de la luz. Después de la incubación, se agrega 50 μL de PBS 1X para completar un volumen total de 150 μL . Finalmente, se evaluaron los porcentajes de células CD19+CD5+ viables, apoptóticas y necróticas por citometría de flujo en el citómetro Cytek® Aurora (Cytek, USA), y los datos se analizaron con el software FlowJo (BD Biosciences), versión 10.8.1.

2.7 Análisis de expresión de mRNA por PCR cuantitativa (qPCR)

La extracción de ARN se realizó a partir de 5×10^6 PBMCs de LLC utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, el RNA obtenido se cuantificó por absorbancia a 260nm en el NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A partir de 1µg de RNA se realizó la síntesis de cDNA, empleando la enzima M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Invitrogen, 28025). Se utilizó como cebador oligo dT, para retro-transcribir las moléculas de ARN mensajero (ARNm) presentes en ese momento en las células tumorales. La amplificación por PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando SYBR Green (Roche, Basel, Suiza) en el sistema QuantStudio3 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los primers utilizados se muestran en la tabla 7.

Las reacciones de PCR de EMMPRIN, SP1, p27, CCL3, CCL4, MMP2, MMP9 y GAPDH, este último se utilizó como control endógeno fueron realizadas de la siguiente manera: se mezcló 1µL del cDNA, con los reactivos correspondientes (Master Mix ROCHE, H2O y primers). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, seguidos de un paso combinado de *annealing* y extensión a 60 °C durante 1 minuto. Específicamente, para la PCR de SP1 la temperatura de *annealing* fue de 58°C durante 1 minuto.

Tabla 7. Primers utilizados para análisis por PCR cuantitativa (qPCR)

	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
EMMPRIN	AGG AAT AGG AAT CAT GGC GGC	CGT GCT GGT GGT AGG TGG CG
SP1	GAC GTT GAT GCC ACT GTT GGC AAG	TCA AGA CCC ACC AGA ATA AGA AGG GAG
p27	CCG GCT AAC TCT GAG GAC AC	AGA AGA ATC GTC GGT TGC AG
CCL3	GAC ACT CGA GCC CAC ATT CCG	CCC CTC AGG CAC TCA GCT CC
CCL4	CCA CCA ATA CCA TGA AGC TCT G	CCT AAT ACA ATA ACA CGG CAC ATA A
MMP2	AGC GAG TGG ATG CCG CCT TTA A	CAT TCC AGG CAT CTG GAT GAG
MMP9	GGT CCC AGA CCT GGG CAG ATT	GGT CCC AGA CCT GGG CAG ATT
GAPDH	TCG GAG TCA ACG GAT TTG	CCT GGA AGA TGG TGA TGG

Para el análisis se calculó la expresión relativa. Primero se utilizó GAPDH como control endógeno, restando el threshold cycle (Ct) de las muestras corridas por duplicado de cada gen objetivo al Ct de las muestras duplicadas de GAPDH, calculando el ΔCt promedio. Los valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$ se determinaron utilizando el ΔCt de las células no estimuladas de cada paciente, y la diferencia del factor de expresión se calculó mediante $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (*fold change*).

2.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad v10.1.2, y los resultados se presentan como media \pm desviación estándar (SD) o media \pm error estándar de la media (SEM). Para las comparaciones entre dos grupos, se aplicó la prueba t de Student para muestras pareadas o no pareadas. El análisis de múltiples grupos se realizó mediante ANOVA de una vía. Para los análisis de correlación, se empleó regresión lineal y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

3.1 Análisis de la expresión de EMMPRIN en células de LLC de pacientes con diferente evolución clínica

La proteína S100A9, conocida por su papel en la inflamación y la progresión tumoral, puede interactuar con varios receptores, incluidos TLR4, RAGE, EMMPRIN y CD33, y CD69. Además, en su forma unida a calcio, S100A9 se asocia con ácido araquidónico, elementos del citoesqueleto como los filamentos intermedios de queratina, MMPs y fibronectina (Markowitz & Carson, 2013).

Dentro de estos receptores, CD33 es un receptor expresado principalmente en células mieloides progenitoras (Möller et al., 2023), mientras que CD69, una proteína de activación temprana en linfocitos, participa en la regulación de la respuesta inflamatoria y su interacción con el complejo S100A8/S100A9 contribuye a la diferenciación de células T reguladoras (Lin et al., 2015). RAGE se ha reportado principalmente por su interacción con el dímero S100A8/S100A9, mientras que TLR4, además de reconocer este complejo, muestra una baja expresión en las células de LLC (Barcellini et al., 2014; Skorka et al., 2021). A diferencia de estos receptores, estudios previos han identificado a EMMPRIN como receptor específico para la forma dimérica de S100A9 (Hibino et al., 2013). La cual fue encontrada en exosomas séricos de pacientes progresores con LLC (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017). De esta manera el estudio del eje S100A9/EMMPRIN en la LLC adquiere particular relevancia.

EMMPRIN se ha asociado con distintas neoplasias, donde se ha demostrado que su sobreexpresión está asociada con un fenotipo más agresivo, mayor actividad de las MMPs y una progresión acelerada de la enfermedad (Hibino et al., 2013; Weidle et al., 2010; Nabeshima et al., 2006; Rodríguez et al., 2020). En la LLC, Rodríguez y colaboradores reportaron que la presencia de EMMPRIN se asocia con un aumento en la actividad de las MMPs y un comportamiento tumoral más agresivo (Rodríguez et al., 2020). Estos hallazgos, sumados a los resultados de mi trabajo final de carrera que evidenciaron niveles elevados de EMMPRIN en muestras de pacientes con LLC en comparación con donantes sanos (Payque, 2022), nos motivaron a profundizar en su caracterización en este estudio. Para esto, nos planteamos evaluar por citometría de flujo la expresión de EMMPRIN en células B de pacientes con LLC de distinta evolución clínica: progresiva e indolente, y compararlos con

células B de donantes sanos.

Como puede observarse en la figura 4, el análisis de expresión del receptor EMMPRIN por citometría de flujo revela un incremento significativo en células B de LLC (CD19⁺/CD5⁺) de los pacientes con una evolución más agresiva de la enfermedad, grupo de pacientes **progresores** (media: 24.909, n=15) en comparación con las células B tumorales del grupo de pacientes **indolentes** (media: 12.500, n=15). Las células B (CD19⁺) de donantes sanos adultos muestran una media similar a la del grupo indolente (media MFI: 11.662, n=5).

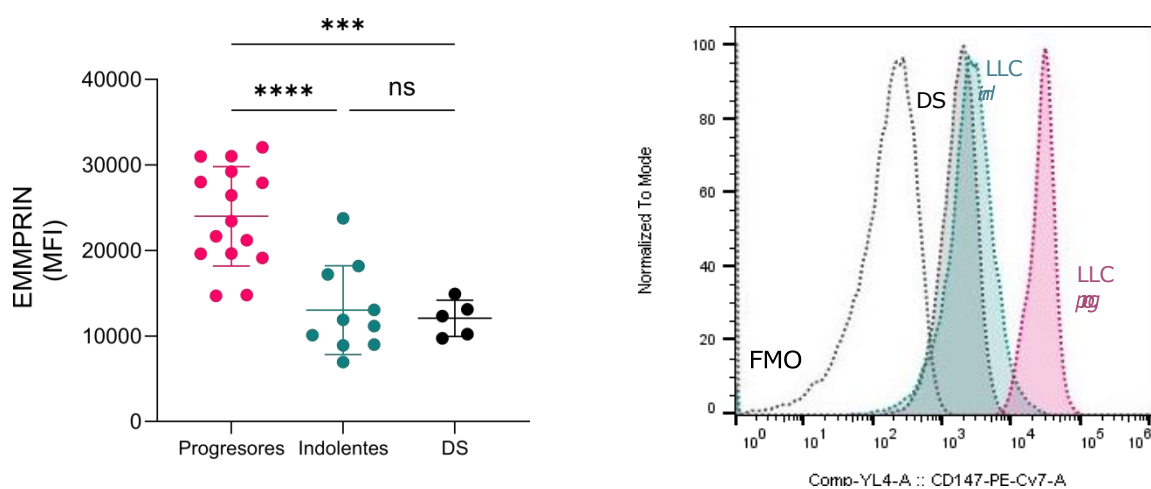


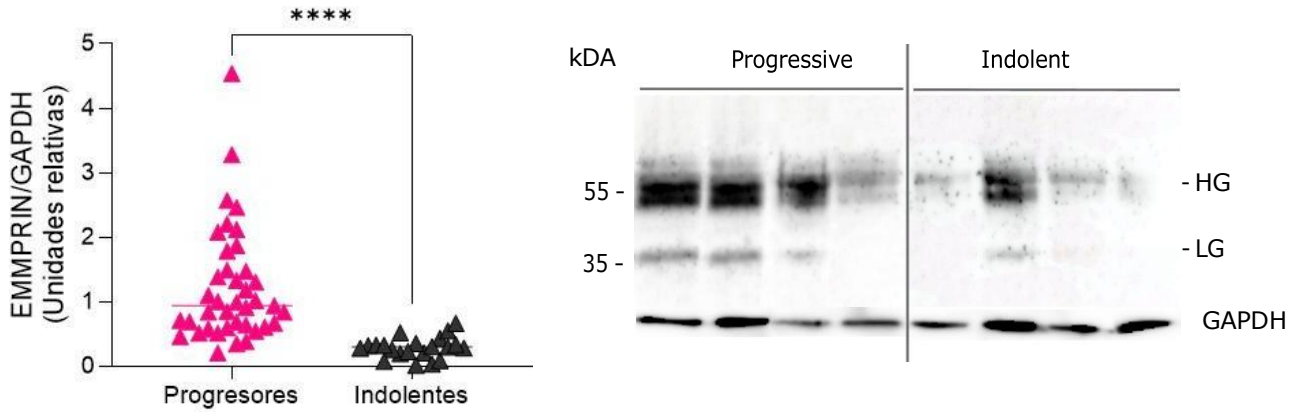
Figura 4. Niveles de EMMPRIN evaluados por citometría de flujo en células B de pacientes con LLC progresores, indolentes y donantes sanos (DS). PBMCs de pacientes con LLC con diferente evolución clínica y de DS fueron descongeladas y marcadas con anticuerpos específicos para la detección de EMMPRIN, como se detalla en la sección 2.3. Se muestran los niveles de EMMPRIN medidos en MFI y los histogramas representativos de EMMPRIN en un paciente progresor, uno indolente y un DS. La línea punteada negra indica el control de fluorescencia menos uno (FMO), utilizado para definir los límites de positividad (ns: no significativo, p: ***<0.0005, ****<0.0001, ANOVA de una vía).

Para continuar con la caracterización del receptor EMMPRIN y considerando los trabajos previos que describen altos niveles de glicosilación asociados con la progresión tumoral en otros tipos de cáncer (Tang et al., 2004; Bai et al., 2014), creímos interesante estudiar el perfil de glicosilación de esta molécula en muestras de pacientes con LLC y diferente evolución clínica.

EMMPRIN es una glicoproteína con un core proteico de aproximadamente 27 kDa, y se han descrito hasta el momento dos principales glicofomas: una altamente glicosilada o *high glycosylated* (HG-EMMPRIN) de ~40-60 kDa, y otra menos glicosilada o *low glycosylated* (LG-EMMPRIN) de aproximadamente 32 kDa (Tang et al., 2004). La forma glicosilada madura HG-EMMPRIN es la que se transloca a la membrana plasmática y es biológicamente funcional (Bai et al., 2014). Esta forma (HG) ha sido asociada con la progresión tumoral en linfoma y parece estar especialmente relacionada con la inducción y regulación de las MMPs, facilitando la carcinogénesis, el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis (Tang et al., 2004; Bai et al., 2014).

Las variables de HG o LG de EMMPRIN fueron explorados por primera vez en mi tesis de grado y validadas en este trabajo en un mayor número de pacientes estudiados. Como puede observarse en la figura 5, panel A, el análisis semicuantitativo mediante WB revela un incremento significativo de la forma altamente glicosilada de EMMPRIN en las células de LLC de pacientes progresores, en comparación con el grupo indolente. En el panel B se muestra de manera representativa el perfil de glicosilación revelado con un anticuerpo específico anti-EMMPRIN. Al correlacionar estos hallazgos con el estadio clínico de Binet pudimos observar que los pacientes con estadios más avanzados (B y C) presentan mayor expresión del receptor EMMPRIN, en comparación con aquellos en estadio A (Figura 5, panel C). Esto refuerza la hipótesis previamente planteada por nuestro laboratorio (Prieto and Seija et al., Blood, 2017) acerca de la activación del eje S100A9/EMMPRIN en la célula leucémica durante la progresión de la enfermedad.

(A)



(B)

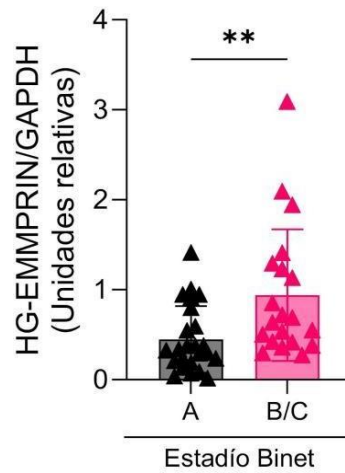


Figura 5. Expresión de EMMPRIN en células de LLC y su asociación al estadio Binet. A) Expresión de EMMPRIN en pacientes progresores e indolentes Blot representativo de EMMPRIN en pacientes con LLC progresiva e indolente. Las PBMCs de pacientes con distinto estadio clínico se lisaron en buffer RIPA con inhibidores de proteasas. Las proteínas (50 μ g) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron con anticuerpo anti-EMMPRIN-HRP. La cuantificación relativa se realizó por densitometría (ImageJ) y se normalizó con GAPDH. ($p \leq 0.05$, *t-test* no pareado). En el Blot representativo se visualiza el perfil migratorio de EMMPRIN en ambos grupos de pacientes B) El gráfico muestra la expresión de HG-EMMPRIN en unidades relativas según el estadio Binet de los pacientes estudiados (p : ** < 0.005 , **** < 0.0001 , ANOVA de una vía).

3.2 Evaluación del tipo de glicosilación (N/O-glicosilación) del receptor EMMPRIN en células de LLC

Como evidenciamos previamente, EMMPRIN no solo muestra una mayor cantidad de expresión del receptor en el grupo de pacientes progresores, sino también un perfil de glicosilación diferente, donde las formas HG son mayoritarias en comparación con las formas LG. Dado que estudios previos describen una asociación entre el tipo de glicosilación de este receptor y diferentes tipos de cáncer (Nabeshima et al., 2006; Bai et al., 2014), decidimos evaluar el tipo de glicosilación de este receptor en las células de LLC. EMMPRIN presenta tres sitios de glicosilación N-ligada en Asn (Asn44, Asn152 y Asn186) en su extremo N-terminal (Cui et al., 2018; Li et al., 2016). Aprovechando esta característica, llevamos a cabo un ensayo de desglicosilación utilizando la enzima N-glicosidasa PNGasa F, que hidroliza los oligosacáridos unidos a asparagina, eliminando específicamente N-glicanos de tipo complejo, híbrido o de alta manosa.

Los resultados obtenidos revelaron mediante Western Blot que, luego del tratamiento con PNGasa F, las formas glicosiladas de EMMPRIN (HG y LG) desaparecieron, dando lugar a una nueva banda cercana a 27 kDa, correspondiente al núcleo de la proteína (*Core*) (Figura 6).

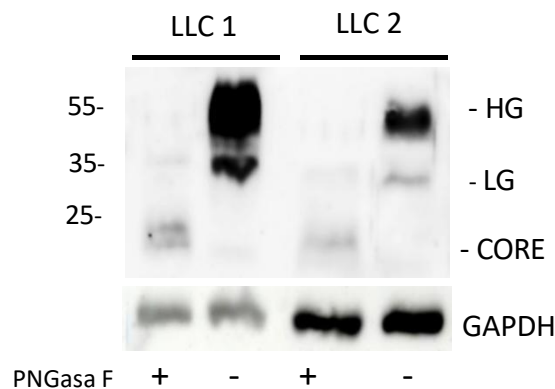


Figura 6. Análisis del tipo de glicosilación de EMMPRIN en células de pacientes con LLC. Se analizaron lisados de proteínas de LLC tratados con N-glicosidasa F (PNGasa F) para evaluar la glicosilación de EMMPRIN. Los lisados (20 µg) fueron desnaturalizados en SDS 5%, DTT 1M a 95°C por 5 minutos, luego incubados con PNGasa F a 37°C durante 3 horas. Después del tratamiento, se analizó EMMPRIN por WB utilizando GAPDH como control de carga. Las glicofomas (HG y LG) se observaron en las muestras no tratadas, mientras que el core proteico se visualizó después del tratamiento con PNGasa F.

Previamente se ha demostrado que la falta de glicosilación de la molécula está asociada a la pérdida de función (Cui et al., 2018; Li et al., 2016). Nuestros resultados muestran una alta carga de glicosilación, sugiriendo que, en las células de LLC, el receptor EMMPRIN sería funcional. Sin embargo, se necesitan más estudios analizando un mayor número de pacientes y estudios de glicosilación más detallados para llegar a una conclusión final.

3.3 Impacto de señales del microambiente tumoral en la regulación de EMMPRIN.

Considerando que los pacientes con LLC progresiva presentan normalmente un microambiente tumoral más activado que las formas indolentes de la enfermedad, y que, a su vez, la glicosilación es un proceso post-transcripcional estrechamente regulado por el microambiente tumoral (Bai et al., 2014), planteamos investigar si algunas de las señales clásicas del microambiente en la LLC influyen en la expresión de EMMPRIN. Para esto, estimulamos *in-vitro* células de LLC de pacientes progresores e indolentes con señales típicas de la inmunidad adaptativa, como CD40L+IL-4 (emulando señales de activación dependientes de células T en los ganglios linfáticos), o señales activadoras del BCR con un anticuerpo anti-IgM. Ambas estimulaciones han sido ampliamente utilizadas en el estudio de la activación tumoral de las células de LLC (Grdisa, 2003; Guarini et al., 2008; Haselager et al., 2020). Por otro lado, también utilizamos señales activadoras más relacionadas con la inmunidad innata, como CPG+IL-15, estimulando el receptor TLR9, previamente descrito como un importante estímulo activador del clon tumoral en LLC (Decker et al., 2000).

Luego de las diferentes activaciones se evaluaron los niveles de expresión de EMMPRIN por citometría de flujo (panel A, Figura 7), así como también el perfil de glicosilación (HG o LG) en pacientes correspondientes a ambos grupos de la enfermedad (panel B, Figura 7).

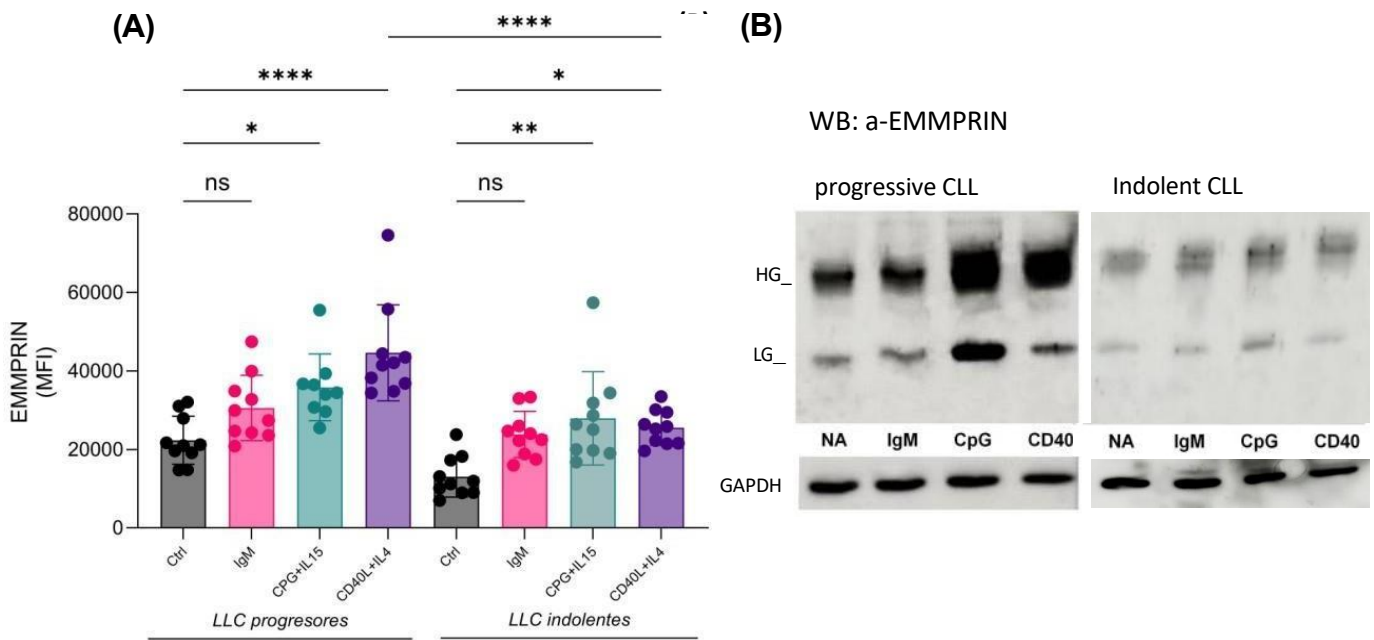


Figura 7. Efecto de señales del microambiente tumoral en la regulación de EMMPRIN. Los niveles de EMMPRIN se evaluaron luego de la estimulación *in-vitro* con señales dependientes de células T (CD40L+IL4), dependientes del BCR activando con un anticuerpo Anti-IgM, e independientes de células T (CPG+IL15) como se describe en la sección 2.4. Se analizaron muestras de pacientes progresores e indolentes. ANOVA de una vía (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$).

Luego de la estimulación, observamos que las señales CPG+IL15 y CD40L+IL4 incrementaron la expresión de EMMPRIN en las células de LLC de ambos grupos de pacientes. En contraste, la estimulación con el anticuerpo anti-IgM no produjo un aumento significativo en la expresión de EMMPRIN en comparación con las condiciones basales. Cabe destacar que la estimulación con CD40L+IL4 generó un incremento de aproximadamente el doble en los niveles de EMMPRIN en las células de los pacientes progresores en comparación con las de los pacientes indolentes. Estos resultados indican que las señales del microambiente tumoral, particularmente aquellas dependientes de células T, juegan un papel importante en la regulación de EMMPRIN, con un mayor efecto en aquellos pacientes con una enfermedad más activa.

Sin embargo, es importante considerar que la respuesta a la activación por CD40L parece ser heterogénea entre los pacientes. Diversos estudios han mostrado diferentes porcentajes de pacientes que responden o no a esta activación, y se ha sugerido que la respuesta podría

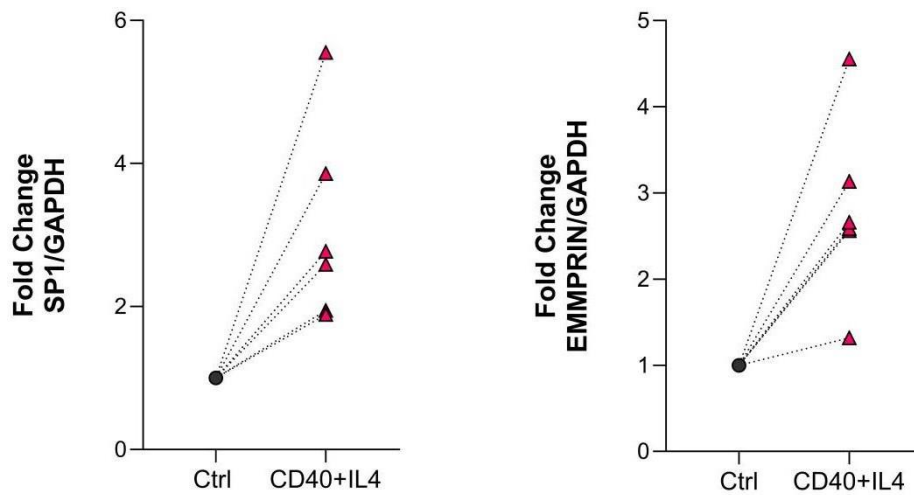
depender de la expresión del receptor CD40 en las células tumorales. Artículos como los de Brugnani et al. (1995), Buske et al. (1997), Granziero et al. (2001), Bhattacharya et al. (2015), y Borge et al. (2014) discuten cómo la presencia o ausencia de CD40 en las células de LLC influye en la capacidad de respuesta a la activación por CD40L. Esto subraya la complejidad de la regulación del microambiente tumoral y la importancia de identificar factores que modulen la respuesta terapéutica en estos pacientes.

3.4 Correlación entre el factor de transcripción SP1 y EMMPRIN

Debido a las claras diferencias en la expresión del receptor EMMPRIN luego de las activaciones *in vitro* del clon tumoral, nos propusimos investigar algunos de los factores de transcripción del gen codificante para la proteína EMMPRIN que podrían estar modulando su expresión. En diversos tipos de cáncer, como el de mama, hepatocarcinoma y pulmonar, se ha reportado que SP1 (*Specificity Protein 1*) es un factor de transcripción involucrado en la regulación de EMMPRIN. Hasta el momento, se han descrito tres sitios de unión para SP1 en las regiones flanqueantes 3' y 5' del gen EMMPRIN (Kong et al., 2010 y 2016). Con este enfoque, decidimos estudiar la asociación entre las expresiones de SP1 y EMMPRIN en las células de LLC. Para ello, decidimos utilizar las muestras de pacientes que habían sido activadas *in-vitro* durante 6 días con CD40L+IL4, ya que nuestros resultados previos mostraban claros cambios en la expresión del receptor en esta condición. De esta manera, se evaluó la expresión génica tanto de EMMPRIN como de SP1 mediante qPCR, utilizando GAPDH como control interno.

Nuestros resultados muestran que luego de la activación existe un aumento significativo en la expresión de SP1 y EMMPRIN (Figura 8A). Al analizar la expresión basal en muestras no estimuladas de 13 pacientes tanto progresores como indolentes, se identificó una correlación positiva significativa entre ambos, lo que sugiere que SP1 podría estar regulando la expresión de EMMPRIN en LLC (Figura 8B). Estos resultados coinciden con los estudios previos en otros tipos de cáncer, donde se ha demostrado que SP1 es responsable de la regulación transcripcional de EMMPRIN, contribuyendo a procesos como la proliferación, migración e invasión celular (Kong et al., 2014; Kong et al., 2016).

(A)



(B)

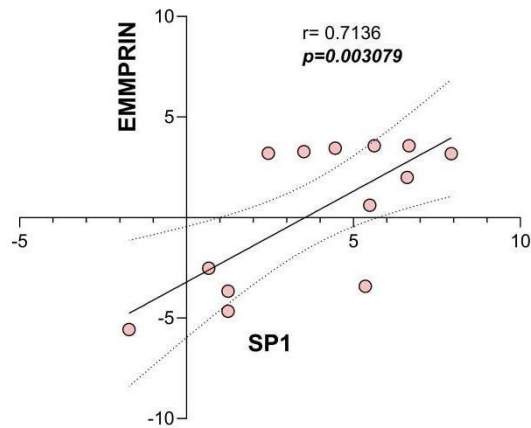


Figura 8. Correlación entre el factor de transcripción SP1 y EMMPRIN en muestras de pacientes con LLC. A) PBMCs de pacientes se activaron *in-vitro* con CD40L+IL-4 durante 6 días. Posteriormente, se determinó la expresión génica de EMMPRIN y SP1 mediante qPCR, utilizando GAPDH como *house-keeping*. Los valores de Delta Ct ($\Delta Ct = Ct[EMMPRIN \text{ o } SP1] - Ct[GAPDH]$) se calcularon para cada muestra ($p \leq 0.05$, *t-test* pareado). B) Correlación entre SP1 y EMMPRIN, utilizando las muestras no estimuladas (expresión basal). El análisis estadístico se realizó mediante Ct [regresión lineal, obteniendo el coeficiente de correlación de pearson (r)].

3.5 Efecto de la activación del eje S100A9/EMMPRIN en la fosforilación de proteínas directamente vinculadas a vías clásicas de supervivencia y progresión tumoral en LLC

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que los exosomas aislados del plasma de pacientes con LLC progresiva contienen niveles elevados de la proteína proinflamatoria S100A9 y pueden activar la vía NF- κ B en células primarias de LLC (Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017). Además, en mi tesis de grado observamos que la incubación de células de LLC con S100A9 *in-vitro* también conduce a la activación de la vía PI3K/AKT en estas mismas células (Payque, 2022).

Dado que la activación de NF- κ B y PI3K/AKT es crucial para la supervivencia de las células B tumoral (Talab et al., 2010; O'Donnel et al., 2023; Balakrishnan et al., 2015; Palacios et al., 2015), decidimos profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la activación del eje S100A9/EMMPRIN durante la progresión leucémica. Para ello ampliamos no solo el número de pacientes estudiados, sino también la vía MAPK/ERK–JNK debido a su rol preponderante en la progresión tumoral en LLC (Shukla et al., 2017) y a resultados obtenidos en el modelo *in-vivo* que serán detallados más adelante.

En este sentido, cultivamos PBMCs de pacientes con LLC de diferente evolución clínica (progresores e indolentes) con rhS100A9 recombinante humana y analizamos phospho-IKK α / β α / β ^{ser176/180}, phospho-AKT^{ser473}, phospho-AKT^{thr308} y phospho-JNK^{thr182/185} por citometría de flujo, comparando las respuestas entre ambos grupos. Los resultados muestran que las células de pacientes con una enfermedad más progresiva presentan incrementos significativos en la fosforilación de AKT1^(Ser473 y Thr308), IKK α / β α / β ^(Ser176/180) y JNK^(Thr183/185) luego de la estimulación con S100A9, en particular, se observó un aumento considerable en la fosforilación de AKT (residuos Ser473 y Thr308) en el grupo progresor comparado con el indolente (Figura 9).

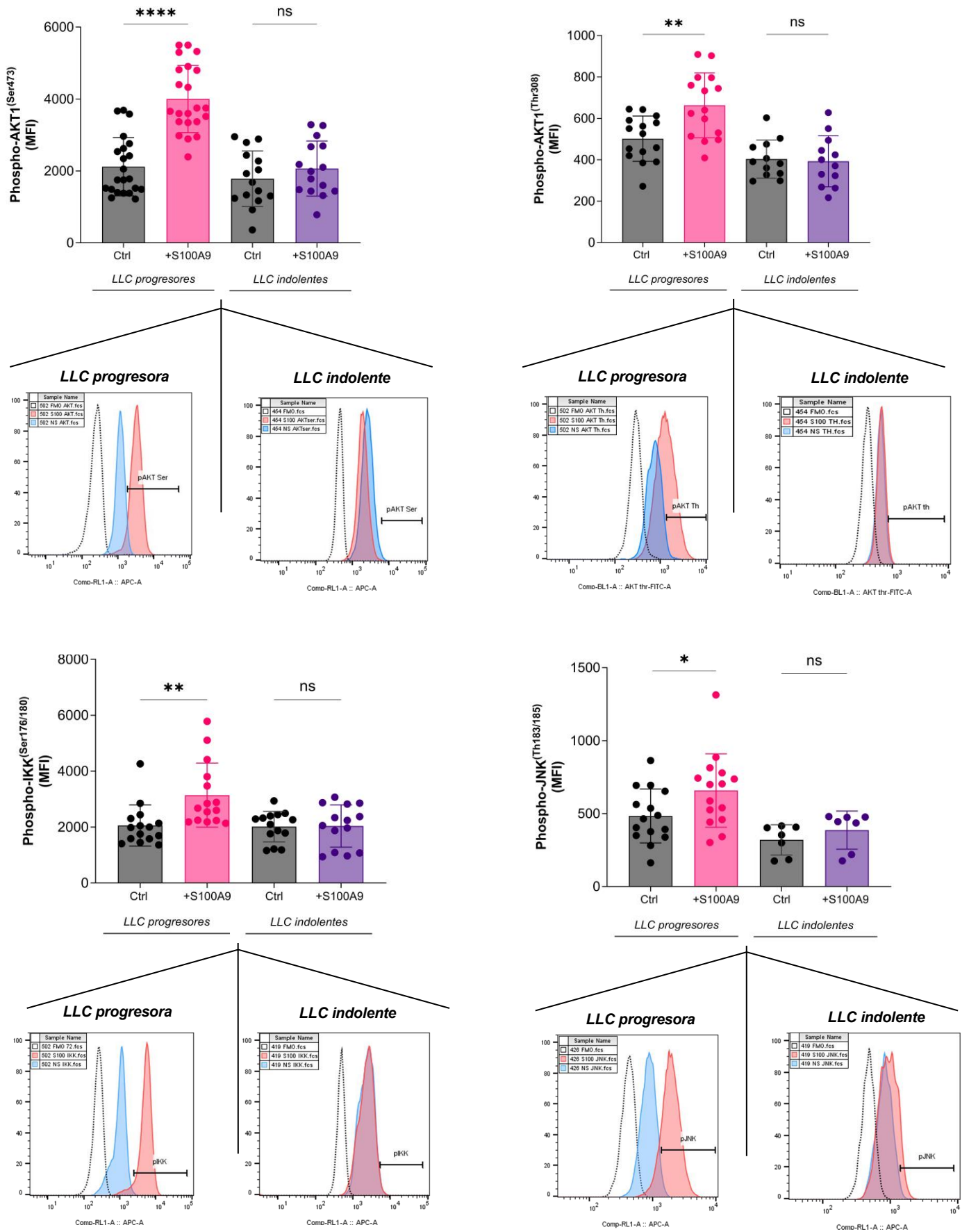


Figura 9. Efecto de S100A9 sobre la expresión y fosforilación de proteínas en células de LLC. PBMCs de pacientes con LLC, tanto indolente como progresora, fueron incubadas en medio RPMI-1640 con 10% de FBS y tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rhS100A9 a 37°C y 5% CO_2 . Luego de 72 horas, se evaluó la

fosforilación de AKT1, IKK α/β y JNK mediante citometría de flujo. Para el análisis, se seleccionaron células viables mediante el uso de Zombie Violet™ y se identificaron las células B leucémicas como CD5+IgM+. Se presentan los niveles de fosforilación de AKT1 (Ser473 y Thr308), IKK α/β (Ser176/180) y JNK (Thr183/185), comparando la condición estimulada con S100A9 frente al control no estimulado (Ctrl). Los histogramas muestran resultados representativos de un paciente con LLC progresora y otro con LLC indolente para cada proteína evaluada. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, considerando diferencias significativas con * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ y **** $p < 0.0001$.

Estos resultados sugieren por primera vez un papel relevante para la vía S100A9/EMMPRIN en la activación de las vías de señalización NF- κ B, PI3K/AKT y MAPK/JNK en células de LLC. Estas vías parecen ser más fácilmente activadas en pacientes progresores, donde el componente inflamatorio es más prominente.

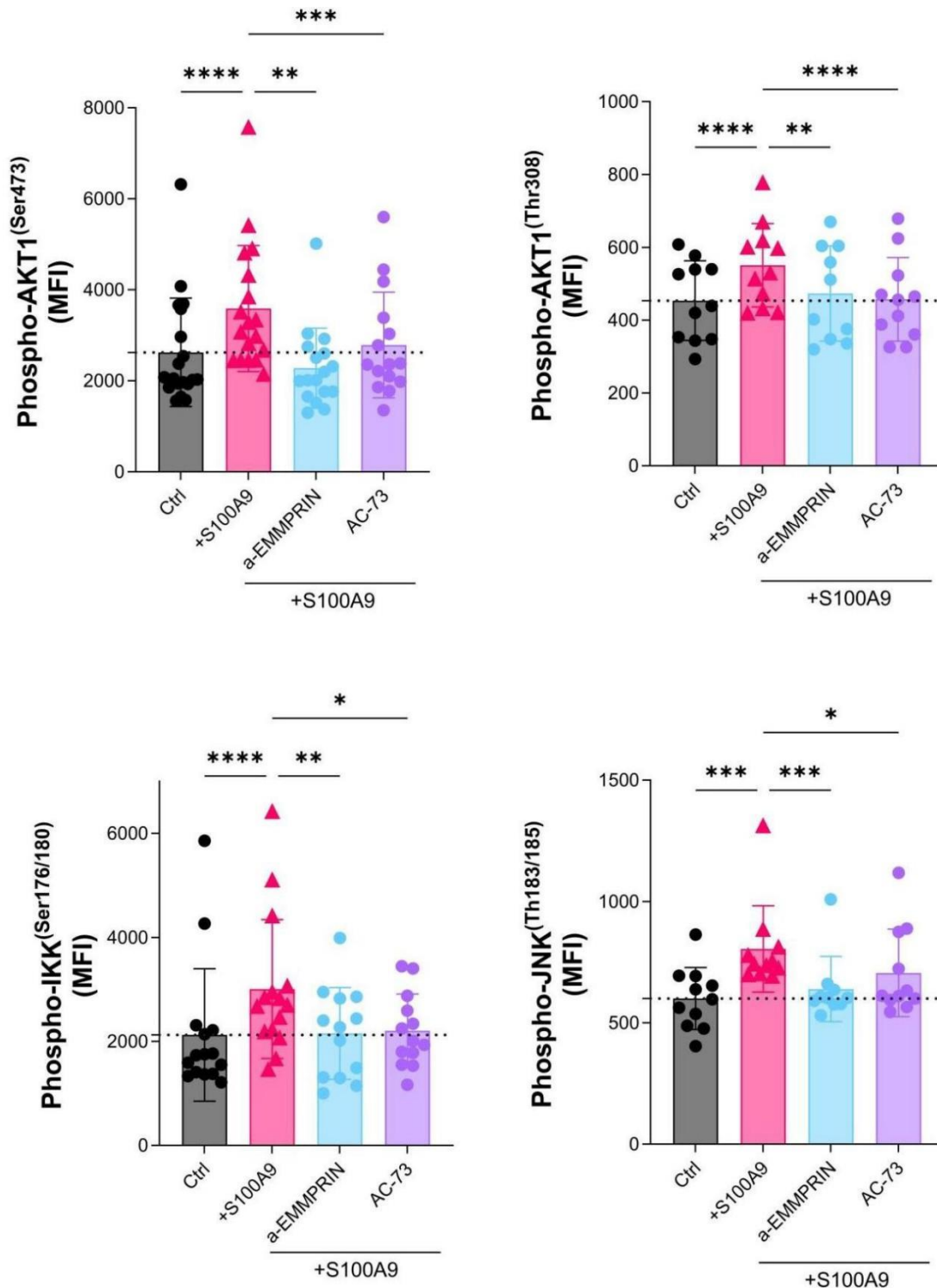
3.6 Identificación del eje S100A9/EMMPRIN en la activación de las principales vías de supervivencia, y proliferación tumoral en la LLC

Dado que los resultados previamente mostrados sugieren un rol para el dímero S100A9 en la activación de las vías PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK/JNK y la progresión de la enfermedad decidimos confirmar si dicha activación se generaba específicamente a través del eje S100A9/EMMPRIN, algo no descrito aún en la LLC. Para ello, evaluamos cómo la inhibición de ambas moléculas podría modificar el comportamiento de activación de las vías PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK/JNK en células primarias de pacientes con una enfermedad progresora. Utilizamos TasQ y Paquinimod (PaQ), dos inhibidores de S100A9.

Por otra parte, nos propusimos inhibir EMMPRIN utilizando dos estrategias: un anticuerpo bloqueante dirigido contra EMMPRIN que impide la unión de ligandos, y AC-73, un inhibidor específico recientemente reportado que se une a EMMPRIN e interrumpe específicamente su dimerización, impidiendo la activación celular *downstream*.

En este trabajo, PBMC de pacientes con LLC fueron estimuladas con rhS100A9 y luego tratadas con estos inhibidores durante 72 horas. La activación de las vías de señalización

fueron evaluadas por citometría de flujo verificando la fosforilación de AKT1^(Ser473 y Thr308), IKK $\alpha/\beta/\beta$ ^(Ser176/180) y JNK^(Thr183/185). Los resultados muestran que tanto los inhibidores de S100A9 como los bloqueadores de EMMPRIN reducen significativamente la fosforilación de estas proteínas, indicando que la inhibición de este eje podría tener un efecto modulador sobre las vías que regulan la supervivencia, la migración y la proliferación tumoral en LLC.



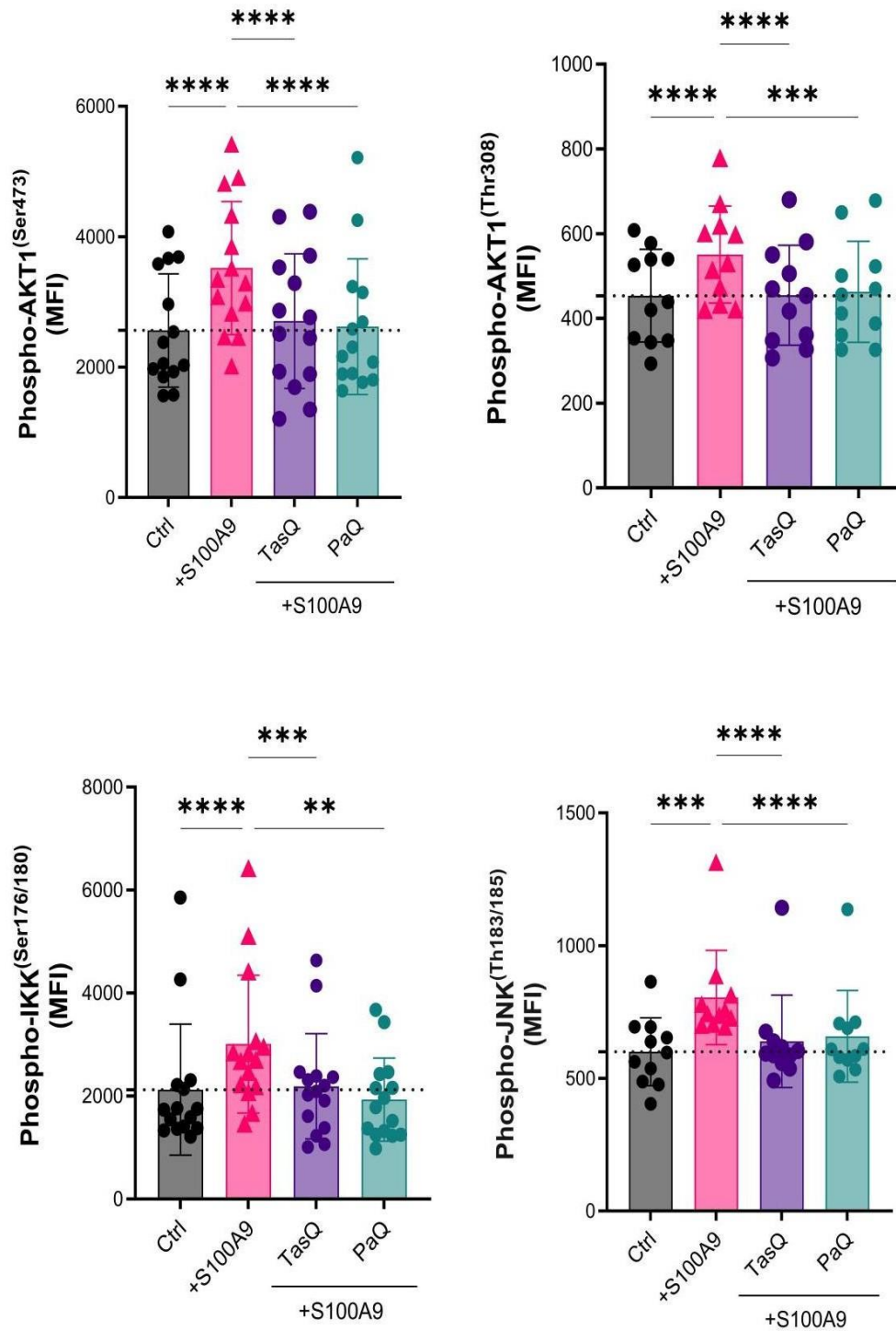


Figura 10. Inhibición *in-vitro* del eje S100A9/EMMPRIN en células primarias de LLC. Las células de LLC fueron estimuladas con S100A9 y tratadas con los inhibidores de S100A9 (Tasquinimod/Paquinimod a 10 μ M), un anticuerpo bloqueante de EMMPRIN, o el inhibidor de EMMPRIN AC-73 (1 μ M) durante 72 horas. Se evaluó la fosforilación de AKT1 (Ser473 y Thr308), IKK α / β α / β (Ser176/180) y JNK (Thr183/185) mediante citometría de flujo en células IgM⁺CD5⁺. Se utilizaron células sin estimulación con S100A9 como control (Ctrl). Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una vía, considerando diferencias significativas con * p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0005 y **** p <0.0001.

3.7 Efecto del bloqueo de RAGE con un inhibidor específico en la activación de las vías PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK/JNK.

Nuestros resultados previos mostraron que en las células de LLC también existe una alta expresión de RAGE, otro de los receptores previamente descritos de la proteína S100A9 (Hermani et al., 2006). A pesar de que RAGE se une principalmente al dímero S100A8/S100A9 (Ma et al., 2017), su alta expresión en las células de LLC nos llevó a preguntarnos si podría estar involucrado también en la modulación de las vías PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK/JNK por S100A9. En primer lugar, confirmamos la expresión de RAGE en un número mayor de pacientes, analizando tanto células de pacientes con LLC como de donantes sanos mediante citometría de flujo. Este análisis confirmó una alta expresión de RAGE en las células de los pacientes con LLC.

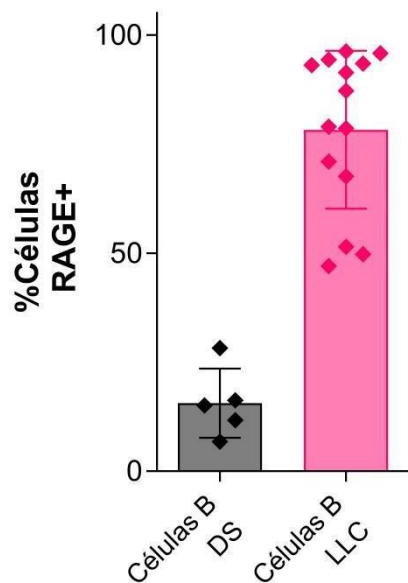


Figura 11. Expresión de RAGE en células de pacientes con LLC y donantes sanos. La expresión de RAGE se evaluó en células B de donantes sanos y células CD19⁺CD5⁺ pacientes con LLC mediante citometría de flujo, y los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas para RAGE (**** $p < 0,0001$, *t-test* no pareado).

Continuando con el objetivo de identificar el eje de señalización (S100A9/EMMPRIN) en la progresión leucémica para las vías antes mencionadas, investigamos si el bloqueo de RAGE tendría algún efecto sobre las mismas. Para ello, activamos células de LLC con rhS100A9 en presencia de FPS-ZM1, un inhibidor específico de RAGE que funciona como antagonista, inhibiendo la interacción de RAGE con sus ligandos (Hong et al., 2016; Kwak et al., 2017). Los resultados muestran que el tratamiento con FPS-ZM1 no redujo significativamente la

fosforilación de los residuos analizados en ninguna de las vías, PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK/JNK, en comparación con las células estimuladas solo con S100A9 (Figura 12). Este hallazgo sugiere que, aunque RAGE está presente en las células de LLC, la activación de las tres vías estudiadas al momento estaría mediada, en la célula LLC, por el receptor EMMPRIN, y no por el receptor RAGE.

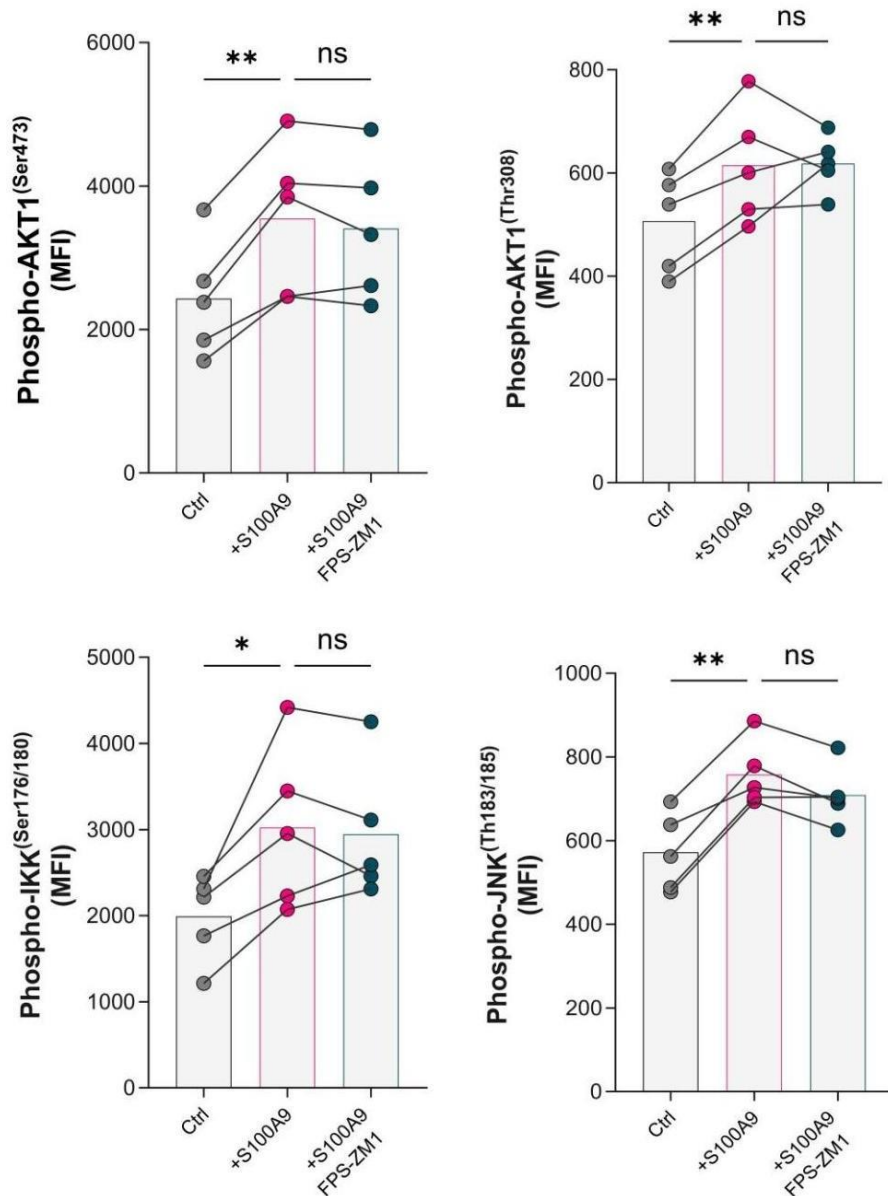


Figura 12. Efecto del bloqueo de RAGE en la activación de vías celulares en células de LLC. PBMCS de LLC de pacientes progresores fueron incubadas en RPMI-1640 con 10% de FBS con 10 μ g/mL de rhS100A9 y tratadas con el inhibidor de RAGE FPS-ZM1 a 37°C, 5% CO₂, y se evaluó la fosforilación de AKT1^(Ser473 y Thr208), IKK α/β ^(Ser176/180) y JNK^(Thr183/185) a las 72 horas mediante citometría de flujo. El análisis estadístico se realizó utilizando un test ANOVA de una vía (* p<0.05, ** p<0.005).

3.8 Evaluación de la expresión de moléculas asociadas a la supervivencia, al ciclo celular y la migración tumoral luego de la activación del eje S100A9/EMMPRIN

3.8.1 Análisis de las moléculas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-2

Las proteínas antiapoptóticas *myeloid cell leukemia 1* (MCL-1) y *b-cell leukemia/lymphoma 2* (BCL-2) han sido ampliamente reportadas en la LLC como esenciales para inhibir la apoptosis y contribuir a la resistencia de las células tumorales a los mecanismos de muerte celular, promoviendo la persistencia neoplásica (Petlickovski et al., 2005; Karjalainen et al., 2019). Se ha reportado que las células leucémicas presentan una activación constitutiva de la vía PI3K/AKT, promoviendo la proliferación y resistencia a la apoptosis mediante la regulación de MCL-1, BCL-xL y XIAP (Petlickovski et al., 2005; Longo et al., 2008). En base a esto, decidimos investigar el efecto de la activación S100A9/EMMPRIN en la regulación de estas moléculas en la LLC.

Nuestros resultados se muestran a continuación en la Figura 13. Como puede observarse, luego de la activación del eje S100A9/EMMPRIN, encontramos un aumento significativo en la expresión de ambas proteínas (MCL-1 y BCL-2). Esto confirma que la estimulación de EMMPRIN a través de la proteína S100A9 es capaz de activar las vías PI3K/AKT, NF- κ B o MAPK/JNK, promoviendo la supervivencia celular en LLC al regular positivamente estas moléculas antiapoptóticas. Estudios más detallados utilizando inhibidores específicos de estas vías podrían proporcionarnos un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados en la progresión de estos pacientes.

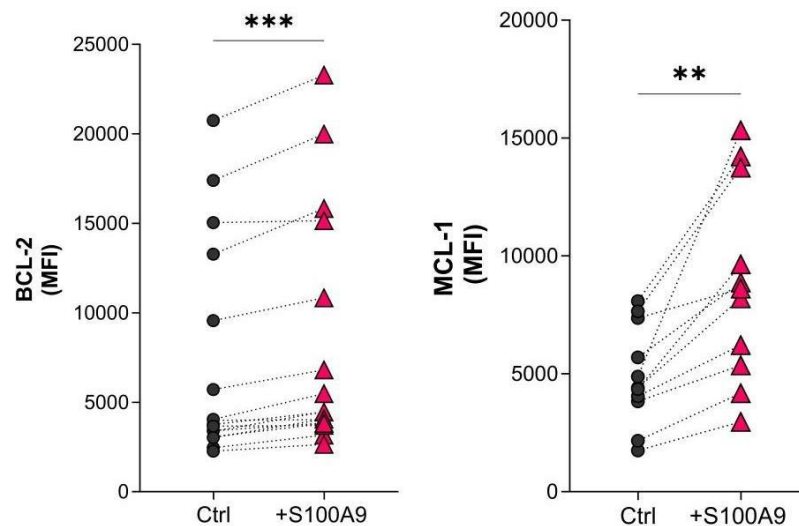


Figura 13. Análisis de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-2 luego de la estimulación con rhS100A9. Las células fueron estimuladas con rhS100A9 durante 48 horas durante 48 horas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS, posteriormente se evaluó la expresión de MCL-1 y BCL-2 en la subpoblación IgM⁺CD5⁺ mediante citometría de flujo. Los datos fueron analizados utilizando un t-test no pareado, considerando diferencias significativas con $p \leq 0.05$.

3.8.2 Análisis de moléculas relacionadas con el ciclo celular Rb-1 y p27.

Considerando que S100A9, a través de EMMPRIN, parece influir también en la supervivencia de las células tumorales, exploramos la expresión y fosforilación de moléculas implicadas en el ciclo celular. Una de las características de la fracción quiescente y mayoritaria del clon leucémico en la LLC es la sobreexpresión constitutiva del inhibidor del ciclo celular p27 (Sanchez-Beato et al., 1997; Vrhovac et al., 1998). Esta molécula es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CKI) y actúa como un regulador negativo, promoviendo la quiescencia celular y frenando la proliferación (Møller et al., 2000; Decker et al., 2002). Por otro lado, también decidimos evaluar el estado de activación de la proteína Retinoblastoma 1 (Rb-1), cuya hiperfosforilación inactiva su función supresora de tumores al impedir su capacidad de unirse a factores de transcripción, facilitando así la transición de la fase G1 a la fase S y permitiendo la progresión del ciclo celular (Zarkowska et al., 1997). Para evaluar el comportamiento de ambas proteínas, analizamos la expresión y fosforilación de p27 y Rb-1 luego de la estimulación con rhS100A9.

Los resultados muestran un aumento significativo en la fosforilación de pRb en las células estimuladas con S100A9- En línea con esta observación, los niveles de ARNm de p27, mostraron una disminución significativa luego de la estimulación con S100A9.

En su conjunto estos resultados sugieren que S100A9 podría estar promoviendo la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, aumentando la proliferación del clon leucémico al reducir, además, la expresión de p27.

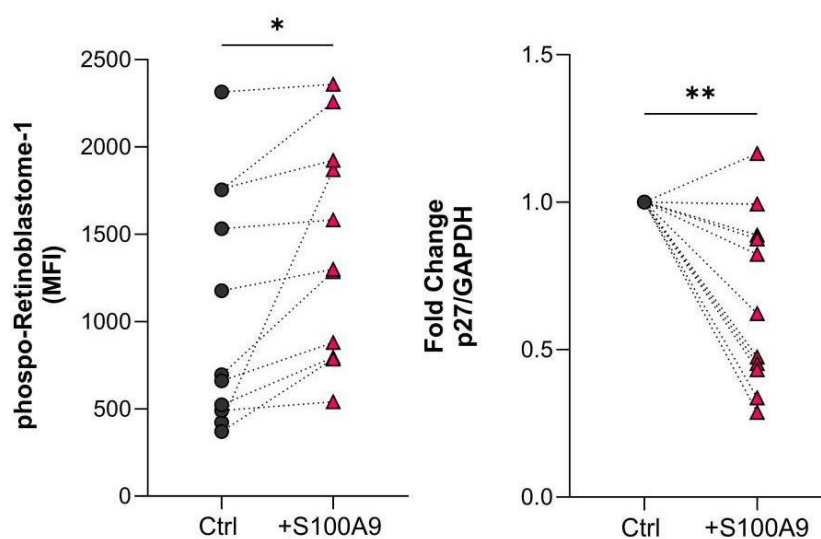


Figura 14. Análisis de las proteínas relacionadas al ciclo celular pRb-1 y p27 luego de la estimulación con rhS100A9. Las células de LLC fueron estimuladas con rhS100A9 durante 48 horas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Luego de la estimulación, la fosforilación de la proteína retinoblastoma1 (pRb-1^{Ser807/811}) se evaluó mediante citometría de flujo, mientras que la expresión de p27 se cuantificó por qPCR. Los datos fueron analizados mediante un t-test pareado, considerándose diferencias significativas con *p<0.05 y **p<0.005.

3.8.3 Efecto del eje S100A9/EMMPRIN en la inhibición de la apoptosis en células de LLC.

Dado el efecto observado de S100A9 en la regulación de moléculas antiapoptóticas, analizamos directamente su impacto en la apoptosis de células de LLC luego de la estimulación *in-vitro* con rhS100A9 mediante *CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay*. Este ensayo mide la actividad de las caspasas 3 y 7, ejecutoras en el proceso de apoptosis. La activación de estas caspasas indica la presencia de células apoptóticas, ya que

su actividad es esencial para la disfunción celular y la fragmentación del ADN en el proceso de muerte celular programada.

El aumento observado en el porcentaje de células viables, y la reducción de la apoptosis y necrosis en las células de LLC en comparación con las células no tratadas confirman que S100A9 tiene un efecto antiapoptótico, promoviendo la viabilidad celular y protegiendo a las células de LLC del proceso de muerte celular programada y de necrosis.

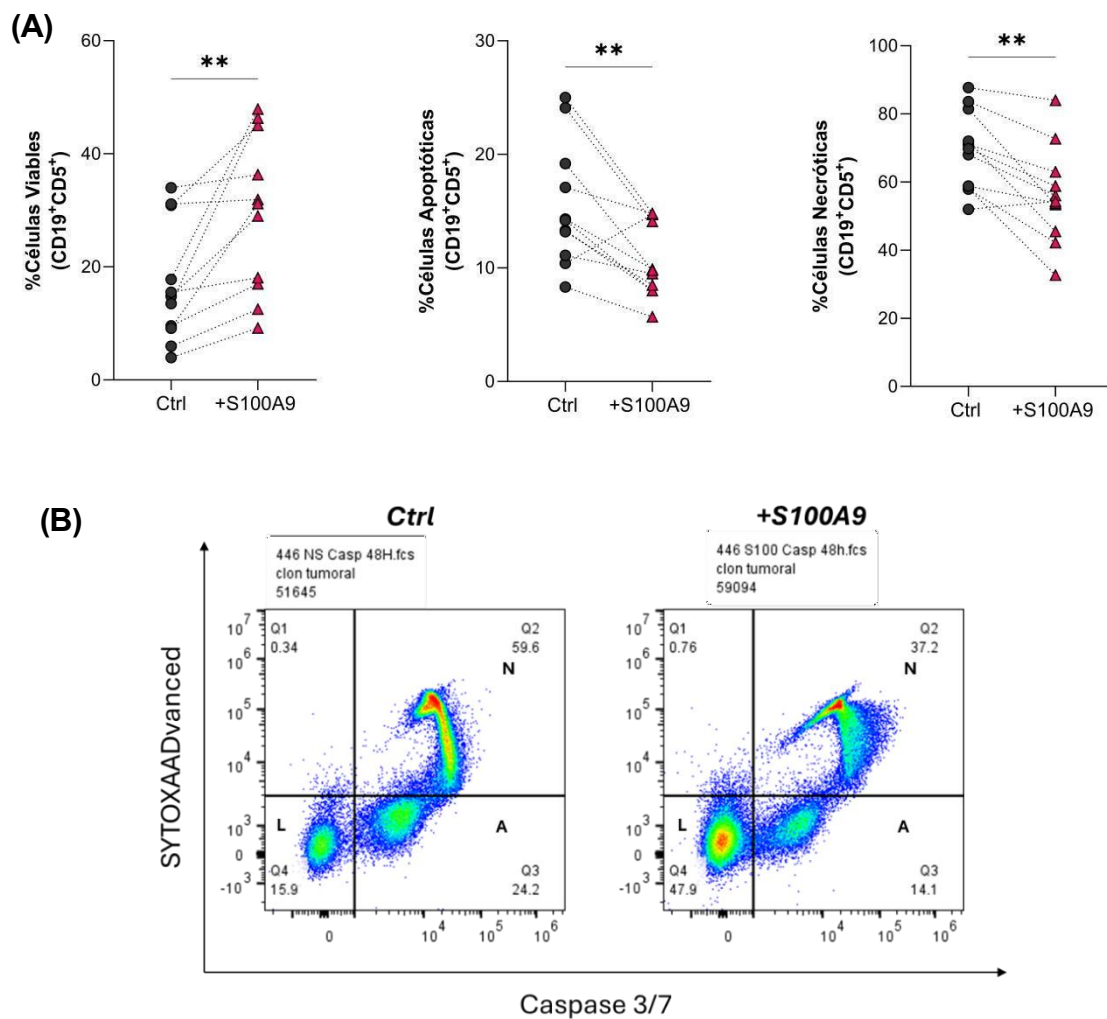


Figura 15. Efecto de S100A9 en la apoptosis de las células de LLC. A) Las células de pacientes con LLC fueron incubadas con o sin rhS100A9 (10µg/mL) durante 48 horas. La apoptosis se determinó utilizando el kit CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay (Invitrogen). Se evaluaron los porcentajes de células CD19+CD5+ viables, apoptóticas y necróticas. Se observa un aumento en la viabilidad celular y una disminución en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas **p<0,005 (*t-test* *pareado*). B) Resultado representativo de uno de los once experimentos. A= células apoptóticas, L= células viables, N= células necróticas.

3.8.4 Análisis del rol de la vía S100A9/EMMPRIN en la migración y progresión tumoral en LLC

Una de las primeras funciones descritas para el receptor EMMPRIN en células inmunes fue inducir la expresión de MMPs, lo cual le otorgó su nombre comúnmente reconocido (Gabison et al., 2005). Las dos MMPs más estudiadas en el contexto oncológico son MMP2 y MMP9, ambas esenciales para la degradación de la matriz extracelular, lo que permite la migración del clon tumoral a otros órganos (Hingorani et al., 2018). Específicamente en LLC, Rodríguez y colaboradores reportaron la sobreexpresión y el aumento en la actividad de MMP9/MMP2 en plasma de pacientes con alta progresión (Rodríguez et al. 2020). Durante la progresión tumoral, la infiltración de células de LLC en la médula ósea y órganos linfoides secundarios es facilitada por la MMP9 (Gusella et al., 2017; Redondo-Muñoz et al., 2010). Niveles elevados de MMP9 en plasma se asocian con mayor linfocitosis, invasividad tumoral y peor pronóstico (Gusella et al., 2017), además de favorecer la supervivencia leucémica (Redondo-Muñoz et al., 2010).

Además, como fue mencionado previamente otra de las características de un microambiente activado en la LLC es la producción de las quimiocinas CCL3 (MIP-1 α) y CCL4 (MIP-1 β), quienes parecen jugar un papel relevante en la progresión tumoral, (Burger et al., 2009). Estas moléculas son ligandos de los receptores CCR1 y CCR5, los cuales se expresan en células del microambiente como células estromales, monocitos y macrófagos, facilitando la interacción entre las células de LLC y su entorno. Al presente se ha descrito que la interacción de las células leucémicas con las NLCs en los ganglios linfáticos y la médula ósea induce la producción de CCL3 y CCL4, lo que no solo recluta células inmunosupresoras, sino que también refuerza la retención de la LLC en nichos protectores, prolongando su supervivencia y resistencia a terapias (Sivina et al., 2011; Burger et al., 2009; Hartmann et al., 2015). Conociendo estos antecedentes creímos interesante evaluar la expresión de estas MMPs y CLL3 y 4 en células de LLC luego de la activación in vitro con rhS100A9.

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la expresión de ambas MMPs en las células tratadas con S100A9 en comparación con las células no estimuladas, (Figura 16).

Los resultados muestran que la activación de las células LLC con S100A9 incrementa los niveles de expresión del ARNm de MMP2 y MMP9 (Figura 16A), sugiriendo que S100A9 también podría promover la invasión y migración celular al interactuar con EMMPRIN e inducir la expresión de MMPs por parte de células de LLC. Interesantemente, nuestros resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión de CCL3 y CCL4 luego de la estimulación con S100A9 (Figura 16B). Las primeras, MMP2 y MMP9, están directamente involucradas en la migración de las células tumorales hacia los nichos de proliferación (Redondo-Muñoz et al., 2010), mientras que las segundas, CCL3 y CCL4, están asociadas a la permanencia del clon tumoral en los OLS (Burger et al., 2009). En ambos casos, la sobreexpresión de estas moléculas se ha vinculado con la progresión tumoral.

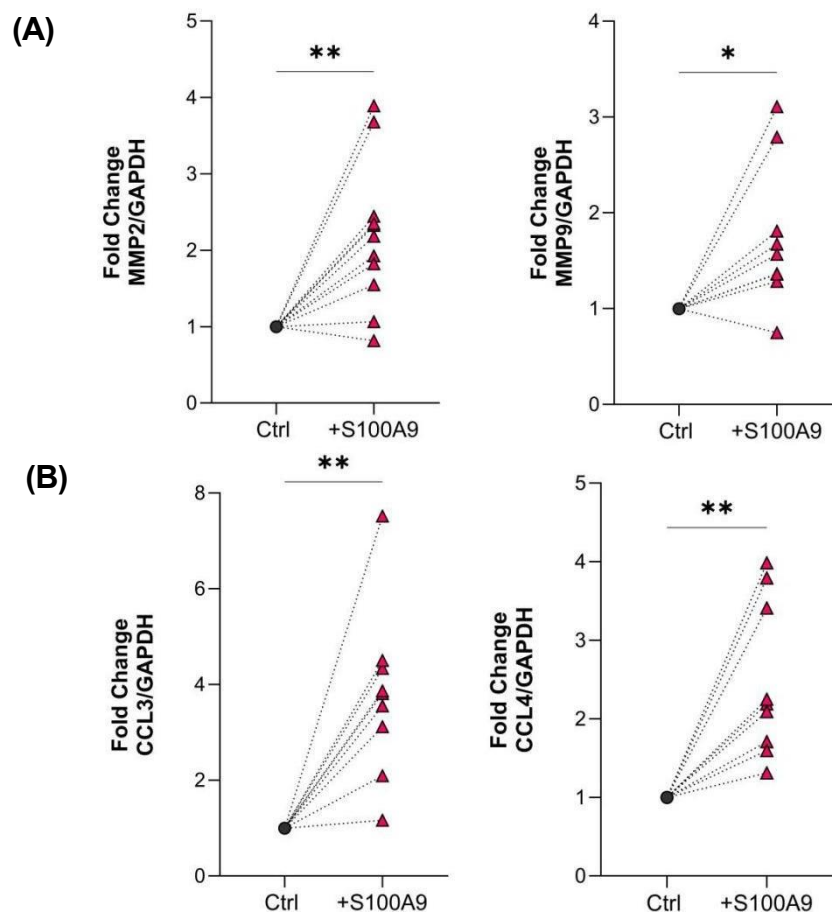


Figura 16. Análisis de las metaloproteinasas de matriz MMP2 y MMP9, y de las quimiocinas CCL3 y CCL4, asociadas a la migración y homing tumoral luego de la estimulación con rhS100A9. Las células fueron estimuladas con rhS100A9 durante 48 horas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Posteriormente, se extrajo el ARN total y se evaluó la expresión de MMP2, MMP9, CCL3 y CCL4 mediante qPCR. Los datos fueron analizados mediante un t-test pareado, considerándose diferencias significativas con * $p < 0.05$ y ** $p < 0.005$.

3.9 ARTICULO EN REVISIÓN

Esta última parte del trabajo se realizó en colaboración con el Departamento de Inmunología del H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, liderado por el Dr. Pinilla-Ibarz, a través de una colaboración científica establecida en nuestro laboratorio. Mi participación en esta colaboración ha sido principalmente intelectual, incluyendo reuniones científicas, el diseño de experimentos con el modelo murino y el trabajo experimental con células primarias de pacientes con LLC, donde confirmamos los hallazgos obtenidos en el nuevo modelo. Dado que forma parte de esta Tesis, en el contexto de la línea de investigación del laboratorio y del artículo en revisión en la revista Blood Advances (Ver Anexo), en las páginas siguientes se mencionan brevemente los resultados obtenidos con el modelo *in-vivo* E μ -TTCL1/S100A9^{-/-}.

3.9.1 Caracterización funcional *in-vivo* de S100A9 como un blanco terapéutico en la LLC

Teniendo en cuenta los datos preliminares ya en la tesis y el posible rol del eje S100A9/EMMPRIN en la LLC, se genera esta colaboración con el objetivo de profundizar nuestros hallazgos en un modelo murino de LLC (E μ -TCL1), para finalmente, intentar obtener más evidencias a favor de proponer un nuevo blanco terapéutico en esta leucemia. El modelo transgénico E μ -TCL1 sobreexpresa el gen *T cell leukemia/lymphoma 1* bajo la regulación del promotor de células B de cadenas pesadas IgM de inmunoglobulinas (Bichi et al., 2001). La sobreexpresión del gen TCL1 en este contexto desarrolla una LLC con un fenotipo similar al de una leucemia progresiva con un perfil de genes IgVH no mutado, caracterizado por leucocitosis y esplenomegalia a partir de los 10-13 meses de edad (Bresin et al., 2016; Chen et al., 2014).

El principal objetivo de esta colaboración se centró en la generación de dos modelos transgénicos. Por un lado, sobreexpresar la proteína S100A9 en el contexto leucémico de la cepa TCL1 y el segundo por la generación de un modelo “*knock-out*”, en donde el gen *S100A9* es deletado en el contexto TCL1.

A continuación, se detallan brevemente los resultados obtenidos en el modelo E μ -TCL1/S100A9^{-/-}, que fue el enfoque principal de la mayoría de los experimentos incluidos en el artículo previamente mencionado. Como primer resultado relevante, se observó una mayor supervivencia global en este modelo en comparación con el modelo TCL1 original, lo que refuerza la hipótesis sobre el papel de S100A9 en la progresión leucémica y su potencial como blanco terapéutico (Anexo, Fig. 4C y D). Además, la transferencia adoptiva (TA) de células leucémicas E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mostró una disminución en la progresión de la enfermedad en comparación con su contraparte tumoral (TA de células leucémicas TCL1). Esto se evidencia en la Fig. 4G del Anexo, donde se observa una infiltración significativamente menor de células leucémicas en el bazo, resultando en una disminución de su peso y volumen. En el mismo sentido, la Fig. 4H muestra que la TA de células leucémicas KO para S100A9 no logra establecer un clon tumoral con alta linfocitosis, a diferencia de las células del modelo TCL1. En conjunto, estos resultados se traducen en una mayor supervivencia de los animales E μ -TCL1/S100A9^{-/-} en comparación con el modelo E μ -TCL1 (Anexo, Fig. 4I).

Estudios posteriores mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS) confirmaron que la ausencia del gen S100A9 en las células leucémicas se correlaciona con una disminución en la expresión de genes involucrados en las vías MAPK/JNK y NF- κ B, como JUN y FOS, respaldando los resultados previos en células leucémicas humanas que vinculan a S100A9 con la activación de estas cascadas de señalización (Anexo, Fig. 4K). Para seguir explorando el potencial de S100A9 como blanco terapéutico en la LLC, se realizó una transferencia adoptiva (TA) de células leucémicas (E μ -TCL1) en ratones C57BL/6. Una vez que el clon leucémico fue establecido, se administraron los inhibidores de S100A9, TasQ y PaQ. Nuevos análisis por NGS y el seguimiento de la supervivencia de los animales mostraron nuevamente una disminución en la expresión génica de ARN mensajero asociado con las vías de progresión tumoral, como JUN, FOS y c-MYC, así como una disminución de la quimiocina CCL4, implicada directamente en la migración y progresión del clon LLC.

Si bien existen diferencias reconocidas entre las respuestas génicas de la LLC en humanos y los modelos murinos utilizados para su estudio (Chen & Chiorazzi, 2014; Floerchinger & Seiffert, 2024), es interesante encontrar que algunos de los genes involucrados en la

regulación del eje S100A9/EMMPRIN en humanos también se encuentran implicados en el modelo E μ -TCL-1/S100A9^{-/-}, así como en las células del modelo E μ -TCL1 tratadas con inhibidores de S100A9 (Anexo, Fig. 5F y G). Como resultado confirmatorio de nuestra hipótesis general, el bloqueo in-vivo de S100A9 mediante los inhibidores TasQ y PaQ en el modelo E μ -TCL1 redujo la carga tumoral, la esplenomegalia y la infiltración leucémica, aumentando la supervivencia de los ratones tratados en comparación con los controles (Anexo, Fig. 5A-E).

Finalmente, con el objetivo de seguir profundizando en esta hipótesis, se evaluó la actividad terapéutica de TasQ en un modelo de xenoinjerto derivado de pacientes (PDX), una estrategia preclínica en la que se implantan células tumorales o tejido de pacientes con LLC en ratones inmunodeficientes. Este modelo, que incorpora PBMCs del paciente junto con sus células T activadas, ha demostrado ser una herramienta valiosa para estudiar la progresión de la enfermedad y la respuesta a tratamientos en un entorno in vivo que refleja mejor las características del tumor humano (Patten et al., 2021; Chen et al., 2023). Para nuestro estudio, utilizamos células de un paciente con IGVH mutado y otro no mutado, ambos sin tratamiento previo, pero de alta linfocitosis en el bazo (Anexo, Fig. 6A). En ambos casos, previa confirmación de la presencia del clon tumoral en el bazo, se administró el tratamiento con TasQ. El análisis de los resultados muestra que la inhibición de S100A9 reduce significativamente la esplenomegalia y la infiltración de células de LLC humanas en el modelo murino (Anexo, Fig. 6C-F).

La utilización de esta técnica (PDX), así como los resultados expuestos en células primarias de LLC y su posterior estudio con la generación del modelo E μ -TCL-1/S100A9^{-/-}, destacan a S100A9 como un potencial objetivo terapéutico en el tratamiento de la LLC.

DISCUSIÓN

A pesar de los avances en terapias dirigidas con inhibidores de BTK y antiapoptóticos, la resistencia al tratamiento y la toxicidad siguen siendo desafíos clínicos importantes en la LLC. En una conferencia reciente, al ser consultado sobre si la LLC podría considerarse una enfermedad curable, el Dr. Michael Hallek respondió: "Es posible que ya podamos curar a una fracción sustancial de pacientes mediante la combinación de agentes específicos (60% de los pacientes de bajo riesgo, 30% del total). Sin embargo, aún queda trabajo por hacer en los pacientes de alto riesgo" (conferencia oral en el 4th LAG-CLL, 2022).

Actualmente, los mayores esfuerzos en el ámbito científico buscan abordar la resistencia en pacientes refractarios o no respondedores a las terapias disponibles (Robak, 2017). Para ello, se están desarrollando ensayos clínicos dirigidos a evaluar nuevas combinaciones de fármacos existentes (Figura 1) o para identificar nuevos blancos terapéuticos. En este último contexto se enmarca la línea de investigación de nuestro laboratorio y, en particular, los objetivos de esta tesis.

Los pacientes con LLC progresiva presentan un microambiente tumoral inflamatorio que favorece la proliferación y supervivencia de las células leucémicas. Este entorno permite que el clon tumoral interactúe activamente con células accesorias del microambiente, posiblemente contribuyendo a la resistencia a los tratamientos. Por lo tanto, creemos que comprender los mecanismos involucrados en la progresión de la LLC, especialmente aquellos relacionados con la inflamación crónica y las vías de señalización que promueven la supervivencia celular en el contexto inmune, es clave para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas.

En esta línea, estudios previos del laboratorio identificaron a la proteína proinflamatoria S100A9 como un factor clave en la activación del clon tumoral. Se observó que los exosomas del plasma de pacientes progresores contienen altos niveles de S100A9, que activa la vía NF- κ B en células de LLC e interactúa directamente con su receptor EMMPRIN. En estudios preliminares y en mi tesis de grado, se profundizó en esta interacción, demostrando que EMMPRIN está sobreexpresado en células de LLC y que la activación del eje S100A9/EMMPRIIN estimula las vías NF- κ B y PI3K/AKT, particularmente en pacientes con un fenotipo clínico progresor. Interesantemente, al menos *in-vitro* y en menor número de pacientes, nuestros estudios con células primarias sugieren que esta activación puede ser

inhibida al bloquear la interacción S100A9/EMMPRIN mediante un inhibidor de la proteína S100A9 TasQ (Payque, 2022).

A partir de estos hallazgos, el objetivo principal del trabajo de maestría fue caracterizar los mecanismos moleculares por los cuales S100A9 regularía las vías de proliferación tumoral NF- κ B, PI3K/AKT y MAPK/JNK en la LLC, aportando evidencia para respaldar la hipótesis de que la inhibición del eje S100A9/EMMPRIN podría ser una estrategia terapéutica alternativa para pacientes con alta progresión y/o resistencia a los tratamientos actuales.

Como primer paso, nos propusimos caracterizar la expresión y funcionalidad de EMMPRIN, receptor de S100A9, enfocándonos en su estado de glicosilación y en la activación de las vías downstream en la célula leucémica que contribuyen a la progresión tumoral. El grado de glicosilación y la proporción entre ambas formas son clave para su función biológica, de EMMPRIN, su localización en la membrana, la modulación de MMPs y su función general (Cui et al., 2018; Tang et al., 2004; Bai et al., 2014). La N-glicosilación de EMMPRIN, evaluada en este trabajo, revela la presencia de dos glicofomas principales en las células de LLC: una de baja glicosilación (LG-EMMPRIN) y otra de mayor peso molecular (HG-EMMPRIN). Nuestros estudios muestran que los pacientes con LLC progresiva presentan una mayor expresión de este receptor, junto con un aumento de su forma altamente glicosilada (HG), en comparación con aquellos con enfermedad indolente, correlacionándose con un estadio Binet avanzado (B/C). En mieloma múltiple, estudios previos han demostrado que una mayor expresión de las formas glicosiladas de EMMPRIN se asocia directamente con la proliferación y metástasis tumoral (Arendt et al., 2012; Voigt et al., 2009). Estos hallazgos respaldan nuestros resultados, sugiriendo que una alta expresión de EMMPRIN y de sus formas HG podría estar asociada a una mayor progresión leucémica

A nivel molecular, investigamos los factores que regulan la expresión de EMMPRIN en la LLC, encontrando una correlación positiva entre una alta expresión del factor de transcripción SP1 y el incremento en la expresión del receptor EMMPRIN. Diferentes trabajos sugieren que SP1 es uno de los principales factores de transcripción que regula la expresión de EMMPRIN, y esto ha sido demostrado en cánceres epiteliales y de pulmón (Ke et al., 2014; Kong et al., 2011). Un estudio reciente demostró que el microARN-22, c-MYC y SP1

interactúan en la región promotora de EMMPRIN, formando un loop regulador positivo que modula su expresión y favorece la invasión y metástasis en cáncer de mama (Kong et al., 2011). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron una mayor expresión del oncogén c-MYC en pacientes progresores con alta expresión de AID, particularmente en células de LLC más proliferantes (Palacios et al., 2010).

Interesantemente, esta fracción proliferante con alta expresión de c-MYC también muestra sobreexpresión del microARN-22. Estudios posteriores demostraron que el microARN-22 regula negativamente PTEN, un supresor tumoral que mantiene inactiva la vía PI3K/AKT (Palacios et al., 2015). Así, el modelo propuesto en estos trabajos sugiere que la sobreexpresión de microARN-22 reduce PTEN, promoviendo la activación de PI3K/AKT y aumentando la proliferación tumoral (Palacios et al., 2015). Dado el loop positivo entre c-MYC, SP1 y microARN-22 sería relevante profundizar su impacto en la progresión tumoral y su vínculo con el eje S100A9/EMMPRIN. Estudios en este sentido ya han sido iniciados.

Nuestros resultados a su vez sugieren que la regulación de EMMPRIN en la LLC no solo podría depender de factores intrínsecos, como la acción de SP1, sino también de estímulos extrínsecos derivados del TME. En particular, las señales provenientes de células T, como CD40L, parecen potenciar su expresión. Un microambiente tumoral activo, caracterizado por estas y otras interacciones, parecería entonces favorecer la sobreexpresión de EMMPRIN y su glicofoma funcional altamente glicosilada en las células leucémicas, facilitando su interacción con S100A9 y la activación de este eje.

Teniendo en cuenta estos resultados y los datos sugiriendo la activación de las vías NF- κ B y PI3K/AKT en células de LLC, decidimos estudiarlas en mayor detalle e incluir también la vía MAPK/JNK, cuya regulación por S100A9 también había sido puesta en evidencia por los resultados de transcriptómica en el modelo murino TCL1/S100A9^{-/-}.

En este contexto, se decidió utilizar la proteína recombinante humana S100A9 para realizar ensayos *in-vitro* de estimulación y analizar las vías mencionadas. La primera observación relevante fue que esta activación solo se detectó en pacientes progresores, pero no en aquellos con una forma más indolente. Esto podría explicarse, al menos en parte, por la menor expresión de EMMPRIN en la superficie celular y/o por la reducción en los niveles de

las formas HG descritas en este trabajo. Resultados previos de nuestro laboratorio respaldan esta idea, al demostrar que S100A9, presente en los exosomas séricos de pacientes con LLC progresiva, activa la vía NF- κ B (Prieto, Sotelo y Sejia et al., 2017), en contraste con lo observado en pacientes con enfermedad indolente.

Además de detectar diferencias en la fosforilación de proteínas clave en las vías NF- κ B, PI3K/AKT y MAPK/JNK, decidimos evaluar diferentes “*read outs*” de las mismas para validar nuestros resultados. Entre ellos, analizamos la expresión de proteínas antiapoptóticas como MCL-1 y BCL-2, esenciales para la resistencia a la apoptosis y la persistencia de las células leucémicas. Observando un aumento en la expresión de estas proteínas al incubar las células leucémicas de pacientes progresores con rhS100A9. Esto resulta relevante considerando que, en leucemia mieloide aguda (AML), la inhibición de S100A9 ha demostrado aumentar la sensibilidad a venetoclax, reduciendo la expresión de BCL-2 y c-MYC (Fan et al., 2023). Además, en otros tipos de cáncer, como el hipofaríngeo, su inhibición disminuye la fosforilación de NF- κ B y los niveles de BCL-2, reforzando su papel en la regulación de la supervivencia celular (Wu et al., 2017).

Posteriormente, los resultados de activación con rhS100A9 en células primarias de pacientes con LLC se reforzaron al observar una disminución en la actividad de las caspasas 3/7 luego de la estimulación. Al evaluar los porcentajes de células CD19+CD5+, se observó un aumento significativo en la viabilidad celular, acompañado de una reducción en los niveles de apoptosis y necrosis en comparación con las células no estimuladas. La activación de caspasas ha sido documentada en células B-CLL inducidas a apoptosis mediante fármacos quimioterapéuticos (King et al., 1998; Stoetzer et al., 1999). La activación de las caspasas parece estar regulada al menos en parte por la familia de proteínas BCL, ya que su inhibición induce la liberación de citocromo C desde las mitocondrias y activa la caspasa-3 en células de LLC (King et al., 1998). Es interesante mencionar que estudios previos han demostrado que una alta expresión de EMMPRIN reduce la activación de las caspasas 3/9, y que esto se asocia con una mayor expresión de MAPK y fosforilación de AKT en células de cáncer de mama HER2-positivas (Xiong et al., 2016).

En relación con otras funciones de este eje, observamos que S100A9 podría contribuir a la regulación de ciclinas relevantes en el ciclo celular. Nuestros resultados muestran un

aumento en la fosforilación de pRb-1 y una disminución en la expresión de p27, sugiriendo que la activación de las células de LLC con S100A9 podría favorecer la transición de G1 a S, promoviendo así la expansión del clon leucémico. Hallazgos similares han sido reportados por Cheng y colaboradores en células de osteosarcoma, donde la inhibición de S100A9 redujo el crecimiento tumoral al inactivar las vías MAPK y NF- κ B, promoviendo la expresión de p27 e inhibiendo CDK2 y CDK4 (Cheng et al., 2016). De manera similar, en mieloma múltiple, el tratamiento con tasquinimod disminuyó la proliferación, asociado con la inhibición de c-MYC y aumentado p27 (Fan et al., 2023).

Una estrategia para confirmar que S100A9/EMMPRIN es una vía funcional en la LLC y reforzar los resultados previos es inhibir uno o ambos interactores de este eje. Con esta idea, no solo bloqueamos el dímero S100A9 con análogos de quinolina-3-carboxamida, como TasQ y PaQ, sino también su receptor, EMMPRIN, mediante un anticuerpo anti-EMMPRIN o el inhibidor específico AC-73.

TasQ, como se ha mencionado, es un inhibidor específico del dímero S100A9 (Björk et al., 2009) que ha sido evaluado en un ensayo clínico de fase III en cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, donde su administración oral aumentó la supervivencia libre de progresión (Sternberg et al., 2016). En mieloma múltiple, el tratamiento con TasQ redujo la carga tumoral y la angiogénesis en un modelo murino. Adicionalmente, en ratones S100A9KO tratados con este inhibidor, no se observó una mejor supervivencia frente al grupo control, lo que sugiere que su efecto antitumoral se debe a la inhibición selectiva de S100A9 y no a un impacto directo sobre el tumor (Ramachandran et al., 2014). En este contexto, TasQ, solo o en combinación con el tratamiento estándar, está siendo evaluado en un ensayo clínico de fase I para pacientes con enfermedad en recaída o refractaria, cuyos resultados preliminares son alentadores, aunque se espera la finalización del estudio para obtener conclusiones definitivas (NCT04405167). Además, TasQ está siendo evaluado en pacientes con mielofibrosis que han mostrado resistencia o progresión tras el tratamiento con inhibidores de JAK quinasa (NCT06605586). Por último, un estudio de fase II está en desarrollo para evaluar su efecto en mielofibrosis primaria, post-policitemia vera o post-trombocitemia esencial (NCT06327100).

Con respecto a la inhibición del receptor, el inhibidor AC-73 fue evaluado por Spinello y col., quienes describieron que la inhibición de la actividad de EMMPRIN reduce la tasa de proliferación celular al bloquear la vía ERK-STAT3, inducir autofagia y aumentar la sensibilidad a la quimioterapia en células de pacientes con leucemia linfocítica aguda (Spinello et al., 2019). Sin embargo, dado que EMMPRIN se expresa ampliamente en células hematopoyéticas normales y actúa como antígeno activador de linfocitos T (Koch et al., 1999), el uso de este inhibidor debe ser evaluado cuidadosamente.

De esta manera, los ensayos *in-vitro* con células primarias de pacientes previamente activadas con S100A9 mostraron que los inhibidores específicos tanto de S100A9 como de EMMPRIN lograron disminuir la activación de las vías de señalización, impidiendo la fosforilación en residuos clave de NF- κ B, PI3K/AKT y MAPK/JNK (Figura 10). En conjunto, estos resultados destacan el papel del eje S100A9/EMMPRIIN en una LLC activa con un alto componente inflamatorio, en donde vías clásicas de supervivencia y proliferación como PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK, parecen ser activadas.

Finalmente, para confirmar la especificidad de S100A9/EMMPRIIN como un nuevo eje de señalización y descartar la posible participación del receptor RAGE en las vías estudiadas, repetimos experimentos de activación en células primarias de LLC utilizando S100A9 y el inhibidor específico de RAGE, FPS-ZM1 (Hong et al., 2016; Kwak et al., 2017). Si bien se sabe que RAGE se une principalmente al heterotetramero S100A8/A9 (Hermani et al., 2005; Ghavami et al. 2008; Ma et al., 2017), consideramos relevante evaluar su impacto en las vías PI3K/AKT, NF- κ B y MAPK, dado su papel reportado en la progresión de la LLC (Jia et al., Blood, 2014). Nuestros resultados mostraron que FPS-ZM1 no reduce la activación de estas vías en comparación con las células estimuladas solo con S100A9. Esto sugiere que, aunque RAGE presenta una alta expresión en las células de LLC (Jia et al., 2014 y resultados de esta tesis), las vías relacionadas con la supervivencia, migración y proliferación en esta patología parecen ser mediadas, al menos en parte, por el eje S100A9/EMMPRIIN y no por el eje S100A9/RAGE.

En este trabajo también analizamos aspectos estructurales y funcionales de EMMPRIN que podrían influir en su función biológica. Como fue mencionado previamente, el grado de glicosilación y la proporción de sus diferentes glicofomas son determinantes en su función.

Una de sus principales funciones es modular la inducción de MMPs y, en consecuencia, regular procesos en la progresión y metástasis tumoral (Cui et al., 2018; Tang et al., 2004; Bai et al., 2014).

La sobreexpresión de la forma HG ha sido directamente asociada con la inducción de MMPs y parece estar favorecida por la interacción de EMMPRIN con el microambiente tumoral (Rodríguez et al., 2020). En este estudio, se describe que en células de LLC la expresión de EMMPRIN y la actividad de proMMP2 aumentan tras la interacción con fibroblastos, además de reportarse una mayor actividad de MMP9/MMP2 en muestras de suero de pacientes en comparación con sujetos sanos (Rodríguez et al., 2020). Por otra parte, Hibino y colaboradores observaron que células de melanoma que sobreexpresan EMMPRIN migran hacia la piel en respuesta a la expresión de S100A9 en la epidermis, mientras que aquellas con baja expresión de EMMPRIN no migran ni metastatizan en presencia de S100A9. En línea con estos hallazgos, el mismo estudio reporta una mayor degradación de la membrana basal en áreas donde EMMPRIN y S100A9 se coexpresan, un efecto atribuido a la activación del eje S100A9/EMMPRIN, que promueve la expresión de MMPs en células cancerosas a través de EMMPRIN (Hibino et al., 2013).

Estos estudios respaldan nuestros hallazgos en LLC, donde la activación de células leucémicas con S100A9 incrementó la expresión de diferentes moléculas asociadas a la migración celular, incluyendo MMPs y las quimiocinas CCL3 y CCL4, estas últimas involucradas específicamente en el homing de células leucémicas (Davids MS y Burger JA, 2012). Si bien estos hallazgos podrían parecer contradictorios, pueden interpretarse en función de la capacidad adaptativa del clon tumoral, que le permite interactuar con moléculas de señalización clave para su supervivencia y proliferación. De este modo, la célula LLC podría, a través del eje S100A9/EMMPRIN, aumentar su migración hacia los OLS mediante la activación de MMPs y, una vez allí, favorecer su retención a través de las quimiocinas CCL3/4, para recibir señales de supervivencia y proliferación. En ambos casos parecería estar implicado el eje S100A9/EMMPRIN. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para profundizar en los mecanismos específicos mediante los cuales la activación de este eje contribuye a este proceso en la LLC.

Todos estos resultados sugieren que la activación mediada, al menos en parte, por el eje S100A9/EMMPRIN de las vías de señalización NF- κ B, PI3K/AKT y MAPK tiene efectos *downstream* que influyen en procesos celulares como la supervivencia, la progresión y la migración celular, favoreciendo un ambiente propicio para la expansión tumoral. Este eje no solo parece estar contribuyendo a la resistencia a la apoptosis, sino que podría facilitar la capacidad de las células leucémicas para migrar hacia los nichos proliferativos de la LLC, lo que contribuye directamente a la progresión de la enfermedad.

Estos efectos funcionales en el clon leucémico se investigaron en mayor profundidad en colaboración con el Departamento de Inmunología del H. Lee Moffitt Cancer Center mediante un modelo murino de LLC (E μ -TCL1). Como se presentó anteriormente en la sección de resultados, se generó un modelo transgénico *knockout* de S100A9 (E μ -TCL1/S100A9^{-/-}). En este modelo se observó una mayor supervivencia y una progresión leucémica más lenta en comparación con E μ -TCL1, con menor esplenomegalia e infiltración tumoral. La transferencia adoptiva de células S100A9^{-/-} redujo la proliferación del clon leucémico y la linfocitosis, aumentando la supervivencia. La inhibición de S100A9 también disminuyó la expresión de CCL4 e IL-10 en células murinas, modulando la inflamación y el microambiente tumoral, en concordancia con el aumento de CCL3 y CCL4 después de estimular PBMCs de pacientes con rhS100A9. Finalmente, en un modelo PDX, el tratamiento con TasQ redujo la infiltración leucémica y la esplenomegalia en PBMCs de pacientes con LLC, independientemente del estado de mutación IGHV.

En su conjunto estos hallazgos refuerzan la idea de que el eje S100A9/EMMPRIN desempeña un papel clave en la progresión de la LLC y podría ser un blanco terapéutico de interés a ser evaluado en la LLC. Desde una perspectiva clínica, resulta relevante evaluar el papel del eje S100A9/EMMPRIN en el contexto de terapias actuales como ibrutinib. Este inhibidor induce el egreso de células de LLC desde los nichos protectores en OLS hacia la SP, donde pierden señales de supervivencia y mueren. Dado que S100A9/EMMPRIN podría estar implicado en el proceso migratorio, es interesante investigar si su inhibición potencia el efecto de ibrutinib al impedir el reingreso de las células a los nichos proliferativos, favoreciendo así su eliminación. Como una extensión de los hallazgos de este trabajo, se están llevando a cabo experimentos en nuestro laboratorio con muestras de pacientes tratados con ibrutinib, con el objetivo de profundizar en esta posible interacción y sus implicancias terapéuticas.

En conclusión, nuestros resultados confirman el papel clave de S100A9 en la progresión de la LLC, destacando su interacción con EMMPRIN como un factor relevante en este proceso. Este estudio sugiere, por primera vez, que la inhibición de S100A9 podría reprogramar las células B-LLC hacia un fenotipo menos inflamatorio, lo que podría impactar en la progresión de la enfermedad. En este contexto, el uso de inhibidores de S100A9 ha impulsado la implementación de ensayos clínicos en distintas enfermedades hematológicas e inflamatorias, reforzando el interés en esta estrategia terapéutica.

Considerando nuestros hallazgos preclínicos y los resultados clínicos prometedores en otras neoplasias, los inhibidores de S100A9 emergen como una opción terapéutica potencial para la LLC. Futuros estudios deberían evaluar su uso en monoterapia o en combinación con terapias dirigidas, lo que podría abrir nuevas alternativas para el manejo de la enfermedad.

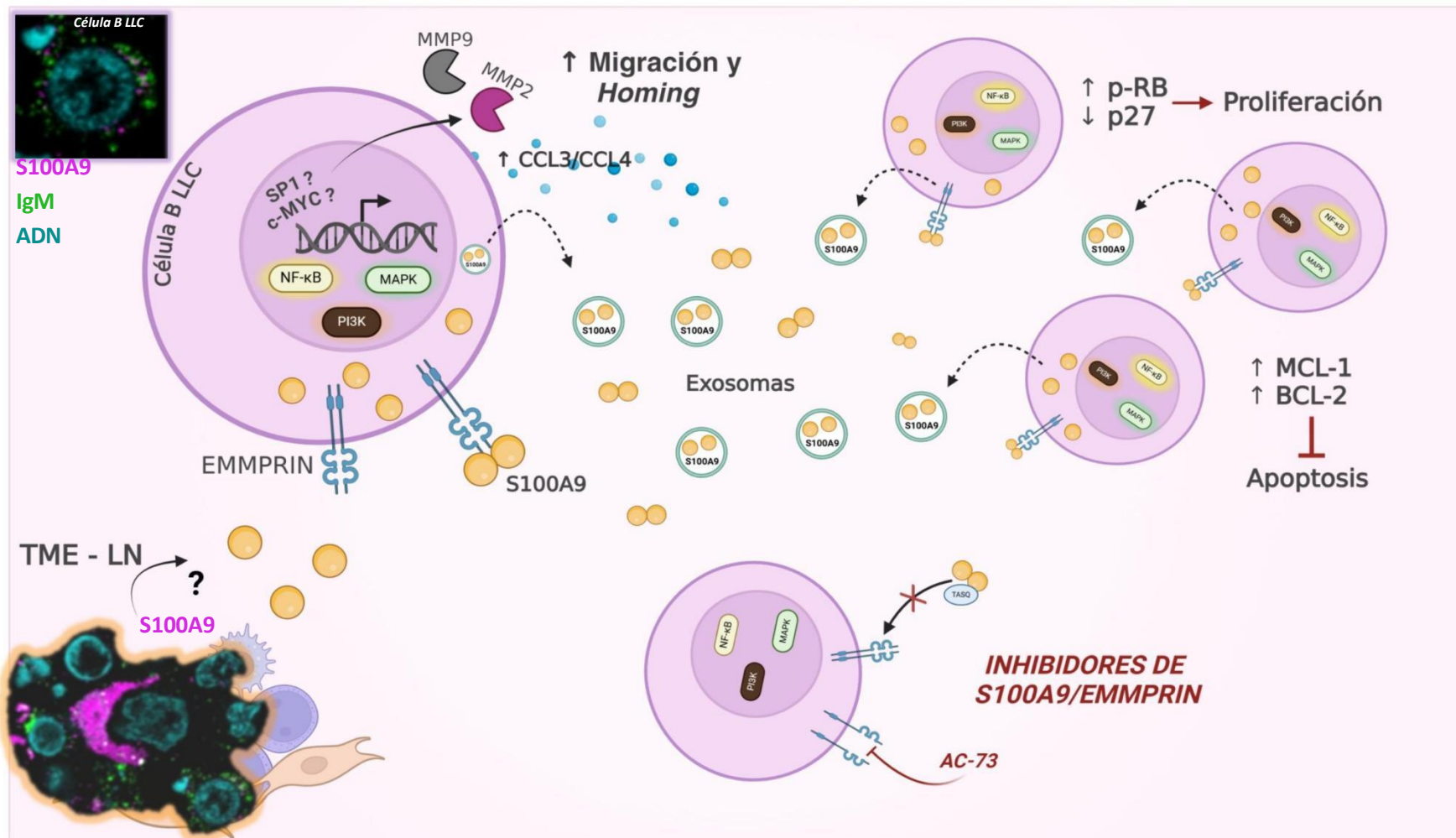


Figura 17. Modelo propuesto: S100A9/EMMPRIN como nuevo eje en la progresión tumoral de la LLC. Las células B de LLC, que expresan altos niveles de EMMPRIN, interactúan con la proteína S100A9, activando vías de señalización clave como PI3K/AKT, NF-κB y MAPK/JNK. Esta activación promueve la secreción de S100A9 en exosomas, que a su vez interactúan con EMMPRIN en otras células de LLC, generando un *loop* positivo de activación. Como consecuencia, se modulan moléculas *downstream* involucradas en la supervivencia celular, proliferación, migración y *homing* tumoral. Además, el TME también contribuye a este *loop* a través de la producción de S100A9. En las imágenes obtenidas por microscopía confocal, se observa en la esquina superior izquierda una célula B-LLC típica, proveniente de PBMCs de un paciente con LLC progresora, marcada con IgM^{-FITC} (verde), con el ADN teñido en cian y la expresión de S100A9 evidenciada en magenta. En la esquina inferior izquierda, representando el microambiente tumoral, se muestra una imagen de PBMCs derivadas de un ganglio linfático del mismo paciente, donde una célula con morfología de monocito exhibe una alta expresión de S100A9, lo que sugiere su papel en la regulación del entorno leucémico (Adaptado de Prieto, Sotelo y Seija et al., 2017). Finalmente, los inhibidores de S100A9, como TasQ, o de EMMPRIN, como AC-73, podrían bloquear esta interacción y frenar la activación de estas vías, posicionándose como una potencial estrategia terapéutica en la LLC.

Referencias

Al-Sawaf, O., Robrecht, S., Zhang, C., Olivieri, S., Chang, Y. M., Fink, A. M., Tausch, E., Schneider, C., Ritgen, M., Kreuzer, K. A., Sivchev, L., Niemann, C. U., Schwarzer, A., Loscertales, J., Weinkove, R., Strumberg, D., Kilfoyle, A., Manzoor, B. S., Jawaid, D., Emechebe, N., ... Fischer, K. (2024). Venetoclax-obinutuzumab for previously untreated chronic lymphocytic leukemia: 6-year results of the randomized phase 3 CLL14 study. *Blood*, *144*(18), 1924–1935. <https://doi.org/10.1182/blood.2024024631>

Arendt, B. K., Walters, D. K., Wu, X., Tschumper, R. C., Huddleston, P. M., Henderson, K. J., Dispenzieri, A., & Jelinek, D. F. (2012). Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in multiple myeloma: role in regulation of myeloma cell proliferation. *Leukemia*, *26*(10), 2286–2296. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.91>

Arcaro, A., & Guerreiro, A. S. (2007). The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Current genomics*, *8*(5), 271-306.

Ahn, I. E., Underbayev, C., Albitar, A., Herman, S. E., Tian, X., Maric, I., Arthur, D. C., Wake, L., Pittaluga, S., Yuan, C. M., Stetler-Stevenson, M., Soto, S., Valdez, J., Nierman, P., Lotter, J., Xi, L., Raffeld, M., Farooqui, M., Albitar, M., & Wiestner, A. (2017). Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *129*(11), 1469–1479. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-719294>

An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2016;*17*(6):779–790.

Austermann, J., Spiekermann, C. & Roth, J. S100 proteins in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* *14*, 528–541 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0058-9>

Bagnara, D., Kaufman, M. S., Calissano, C., Marsilio, S., Patten, P. E., Simone, R., Chum, P., Yan, X. J., Allen, S. L., Kolitz, J. E., Baskar, S., Rader, C., Mellstedt, H., Rabbani, H., Lee, A., Gregersen, P. K., Rai, K. R., & Chiorazzi, N. (2011). A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood*, *117*(20), 5463–5472. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324210>

Bai, Y., Huang, W., Ma, L. T., Jiang, J. L., & Chen, Z. N. (2014). Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *International journal of molecular sciences*, *15*(4), 6356–6377. <https://doi.org/10.3390/ijms15046356>

Balakrishnan, K., Peluso, M., Fu, M., Rosin, N. Y., Burger, J. A., Wierda, W. G., Keating, M. J., Faia, K., O'Brien, S., Kutok, J. L., & Gandhi, V. (2015). The phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-delta and gamma inhibitor, IPI-145 (Duvelisib), overcomes signals from the PI3K/AKT/S6 pathway and promotes apoptosis in CLL. *Leukemia*, *29*(9), 1811–1822. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.105>

Barcellini, W., Imperiali, F. G., Zaninoni, A., Reda, G., Consonni, D., Fattizzo, B., Lonati, S., Nobili, L., Zanella, A., & Cortezzi, A. (2014). Toll-like receptor 4 and 9 expression in B-

chronic lymphocytic leukemia: relationship with infections, autoimmunity and disease progression. *Leukemia & lymphoma*, 55(8), 1768–1773. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.856426>

Bauer, K., Rancea, M., Roloff, V., Elter, T., Hallek, M., Engert, A., & Skoetz, N. (2012). Rituximab, ofatumumab and other monoclonal anti-CD20 antibodies for chronic lymphocytic leukaemia. *The Cochrane database of systematic reviews*, 11(11), CD008079. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008079.pub2>

Bailón, E., Ugarte-Berzal, E., Amigo-Jiménez, I., Van den Steen, P., Opdenakker, G., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2014). Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *Journal of leukocyte biology*, 96(2), 185–199. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0913-521R>

Bengtsson, A. A., Sturfelt, G., Lood, C., Rönblom, L., van Vollenhoven, R. F., Axelsson, B., Sparre, B., Tuveesson, H., Ohman, M. W., & Leanderson, T. (2012). Pharmacokinetics, tolerability, and preliminary efficacy of paquinimod (ABR-215757), a new quinoline-3-carboxamide derivative: studies in lupus-prone mice and a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, repeat-dose, dose-ranging study in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 64(5), 1579–1588. <https://doi.org/10.1002/art.33493>

Bhattacharya, N., Reichenzeller, M., Caudron-Herger, M., Haebe, S., Brady, N., Diener, S., Nothing, M., Döhner, H., Stilgenbauer, S., Rippe, K., & Mertens, D. (2015). Loss of cooperativity of secreted CD40L and increased dose-response to IL4 on CLL cell viability correlates with enhanced activation of NF-κB and STAT6. *International journal of cancer*, 136(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/ijc.28974>

Binet, J. L., Lepage, M., Dighiero, G., Charron, D., D'Athis, P., Vaugier, G., Beral, H. M., Natali, J. C., Raphael, M., Nizet, B., & Follezu, J. Y. (1977). A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*, 40(2), 855–864. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197708\)40:2<855::aid-cnrc2820400239>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197708)40:2<855::aid-cnrc2820400239>3.0.co;2-1)

Björk, P., Björk, A., Vogl, T., Stenström, M., Liberg, D., Olsson, A., Roth, J., Ivars, F., & Leanderson, T. (2009). Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. *PLoS biology*, 7(4), e97. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000097>

Boissard, F., Fournié, J. J., Quillet-Mary, A., Ysebaert, L., & Poupot, M. (2015). Nurse-like cells mediate ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood cancer journal*, 5(10), e355. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.74>

Borogovac, A., & Siddiqi, T. (2024). Advancing CAR T-cell therapy for chronic lymphocytic leukemia: exploring resistance mechanisms and the innovative strategies to overcome them. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, 7, 18. <https://doi.org/10.20517/cdr.2023.100>

Bresin, A., D'Abundo, L., Narducci, M. G., Fiorenza, M. T., Croce, C. M., Negrini, M., & Russo, G. (2016). TCL1 transgenic mouse model as a tool for the study of therapeutic targets

and microenvironment in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cell death & disease*, 7(1), e2071. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.419>

Braish, J., Cerchione, C., & Ferrajoli, A. (2024). An overview of prognostic markers in patients with CLL. *Frontiers in oncology*, 14, 1371057. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1371057>

Bresnick, A., Weber, D. & Zimmer, D. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 96–109 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrc3893>

Brizard, F., Dreyfus, B., Guilhot, F., Tanzer, J., & Brizard, A. (1997). 11q13 rearrangement in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 25(5–6), 539–43.

Brown, J. R., Byrd, J. C., Coutre, S. E., Benson, D. M., Flinn, I. W., Wagner-Johnston, N. D., Spurgeon, S. E., Kahl, B. S., Bello, C., Webb, H. K., Johnson, D. M., Peterman, S., Li, D., Jahn, T. M., Lannutti, B. J., Ulrich, R. G., Yu, A. S., Miller, L. L., & Furman, R. R. (2014). Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123(22), 3390–3397. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-535047>

Buhl, A. M., Jurlander, J., Geisler, C. H., Pedersen, L. B., Andersen, M. K., Josefsson, P., Petersen, J. H., & Leffers, H. (2006). CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *European journal of haematology*, 76(6), 455–464. <https://doi.org/10.1111/j.0902-4441.2005.t01-1-EJH2530.x>

Burger, J. A., & Kipps, T. J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107(5), 1761–1767. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3182>

Burger, J. A., & O'Brien, S. (2018). Evolution of CLL treatment - from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nature reviews. Clinical oncology*, 15(8), 510–527. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0037-8>

Burger, J. A., Landau, D. A., Taylor-Weiner, A., Bozic, I., Zhang, H., Sarosiek, K., Wang, L., Stewart, C., Fan, J., Hoellenriegel, J., Sivina, M., Dubuc, A. M., Fraser, C., Han, Y., Li, S., Livak, K. J., Zou, L., Wan, Y., Konoplev, S., Sougnez, C., ... Wu, C. J. (2016). Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nature communications*, 7, 11589. <https://doi.org/10.1038/ncomms11589>

Burger, J. A., Quiroga, M. P., Hartmann, E., Bürkle, A., Wierda, W. G., Keating, M. J., & Rosenwald, A. (2009). High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood*, 113(13), 3050–3058. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170415>

Burger, J. A., Tedeschi, A., Barr, P. M., Robak, T., Owen, C., Ghia, P., Bairey, O., Hillmen, P., Bartlett, N. L., Li, J., Simpson, D., Grosicki, S., Devereux, S., McCarthy, H., Coutre, S., Quach, H., Gaidano, G., Maslyak, Z., Stevens, D. A., Janssens, A., ... RESONATE-2 Investigators (2015). Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*, 373(25), 2425–2437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509388>

Burger, J. A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N. J., Dell'Aquila, M., & Kipps, T. J. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, *96*(8), 2655–2663.

Burwinkel, F., Roth, J., Goebeler, M., Bitter, U., Wrocklage, V., Vollmer, E., Roessner, A., Sorg, C., & Böcker, W. (1994). Ultrastructural localization of the S-100-like proteins MRP8 and MRP14 in monocytes is calcium-dependent. *Histochemistry*, *101*(2), 113–120. <https://doi.org/10.1007/BF00269357>

Byrd, J. C., Furman, R. R., Coutre, S. E., Flinn, I. W., Burger, J. A., Blum, K. A., Grant, B., Sharman, J. P., Coleman, M., Wierda, W. G., Jones, J. A., Zhao, W., Heerema, N. A., Johnson, A. J., Sukbuntherng, J., Chang, B. Y., Clow, F., Hedrick, E., Buggy, J. J., James, D. F., ... O'Brien, S. (2013). Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, *369*(1), 32–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215637>

Caligaris-Cappio F. (2011). Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *96*(3), 353–355. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.039446>

Catovsky, D., Wechsler, A., & Cherchi, M. (1981). Characterization of B-cell leukemias: a tentative immunomorphological scheme. *Blood*, *58*(2), 410–411.

Cerreto, M., Foà, R., & Natoni, A. (2023). The Role of the Microenvironment and Cell Adhesion Molecules in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers*, *15*(21), 5160. <https://doi.org/10.3390/cancers15215160>

Charkhizadeh, S., Imani, M., Gheibi, N., Shabaani, F., Nikpajouh, A., & Rezvany, M. R. (2020). In Vitro Inhibitory Effect of Recombinant Human Calprotectin on Nalm6 Leukemia Cell Line. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, *20*(8), 951–962. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200331101209>

Chen, S. S., & Chiorazzi, N. (2014). Murine genetically engineered and human xenograft models of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology*, *51*(3), 188–205. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2014.05.001>

Chen, S. S., Barrientos, J. C., Ferrer, G., King-Richards, M., Chen, Y. J., Ravichandran, P., Ibrahim, M., Kieso, Y., Waters, S., Kutok, J. L., Peluso, M., Sharma, S., Weaver, D. T., Pachter, J. A., Rai, K. R., & Chiorazzi, N. (2023). Duvelisib Eliminates CLL B Cells, Impairs CLL-Supporting Cells, and Overcomes Ibrutinib Resistance in a Xenograft Model. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *29*(10), 1984–1995. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-2386>

Cheng, P., Corzo, C. A., Lueteteke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M. M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., Roth, J., & Gaborilovich, D. I. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine*, *205*(10), 2235–2249. <https://doi.org/10.1084/jem.20080132>

Cheng, S., Zhang, X., Huang, N., Qiu, Q., Jin, Y., & Jiang, D. (2016). Down-regulation of S100A9 inhibits osteosarcoma cell growth through inactivating MAPK and NF- κ B signaling pathways. *BMC cancer*, *16*, 253. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2294-1>

Chiorazzi, N., & Stevenson, F. K. (2020). Celebrating 20 Years of IGVH Mutation Analysis in CLL. *HemaSphere*, *4*(1), e334. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000334>

Cols, M., Barra, C. M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D. M., Dillon, S. R., Leonard, J. P., Furman, R. R., Chen, K., & Cerutti, A. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(12), 6071–6083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102066>

Comi, G., Abramsky, O., Arbizu, T., Boyko, A., Gold, R., Havrdová, E., Komoly, S., Selmaj, K., Sharrack, B., Filippi, M., & LAQ/5063 Study Group (2010). Oral laquinimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: 36-week double-blind active extension of the multi-centre, randomized, double-blind, parallel-group placebo-controlled study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *16*(11), 1360–1366. <https://doi.org/10.1177/1352458510378127>

Condoluci, A., Terzi di Bergamo, L., Langerbeins, P., Hoechstetter, M. A., Herling, C. D., De Paoli, L., Delgado, J., Rabe, K. G., Gentile, M., Doubek, M., Mauro, F. R., Chiodin, G., Mattsson, M., Bahlo, J., Cutrona, G., Kotaskova, J., Deambrogi, C., Smedby, K. E., Spina, V., Brusca, G., ... Rossi, D. (2020). International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *135*(21), 1859–1869. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003453>

Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marcé, S., López-Guillermo, A., Campo, E., & Montserrat, E. (2003). ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, *348*(18), 1764–1775. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa023143>

Crombie J, Davids MS. Venetoclax for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol.* 2017;*13*(14):1223–1232. doi: 10.2217/fon-2017-0031

Cui, J., Huang, W., Wu, B., Jin, J., Jing, L., Shi, W. P., Liu, Z. Y., Yuan, L., Luo, D., Li, L., Chen, Z. N., & Jiang, J. L. (2018). N-glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V enhances the interaction of CD147/basigin with integrin β 1 and promotes HCC metastasis. *The Journal of pathology*, *245*(1), 41–52. <https://doi.org/10.1002/path.5054>

Dai, J. Y., Dou, K. F., Wang, C. H., Zhao, P., Lau, W. B., Tao, L., Wu, Y. M., Tang, J., Jiang, J. L., & Chen, Z. N. (2009). The interaction of HAb18G/CD147 with integrin α 6 β 1 and its implications for the invasion potential of human hepatoma cells. *BMC cancer*, *9*, 337. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-337>

Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., Lichtman, S. M., Schulman, P., Vinciguerra, V. P., Rai, K. R., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1999). Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1840–1847.

Dauids, M. S., & Burger, J. A. (2012). Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open journal of hematology*, 3(S1), -3. https://doi.org/10.13055/ojhmt_3_s1_03.120221

Deane, R., Singh, I., Sagare, A. P., Bell, R. D., Ross, N. T., LaRue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R. J., Thiyagarajan, M., Zarcone, T., Fritz, G., Friedman, A. E., Miller, B. L., & Zlokovic, B. V. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*, 122(4), 1377–1392. <https://doi.org/10.1172/JCI58642>

Decker, T., Schneller, F., Hipp, S., Miething, C., Jahn, T., Duyster, J., & Peschel, C. (2002). Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia*, 16(3), 327–334. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402389>

Delgado, J., Nadeu, F., Colomer, D., & Campo, E. (2020). Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*, 105(9), 2205–2217. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.236000>

De Veirman, K., De Beule, N., Maes, K., Menu, E., De Bruyne, E., De Raeve, H., ... & Van Valckenborgh, E. (2017). Extracellular S100A9 protein in bone marrow supports multiple myeloma survival by stimulating angiogenesis and cytokine secretion. *Cancer immunology research*, 5(10), 839-846.

Dighiero, G., & Hamblin, T. J. (2008). Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet (London, England)*, 371(9617), 1017–1029. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60456-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60456-0)

Dighiero G. (2003). Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*, 17(12), 2385–2391. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403154>

Ding, W., Nowakowski, G. S., Knox, T. R., Boysen, J. C., Maas, M. L., Schwager, S. M., Wu, W., Wellik, L. E., Dietz, A. B., Ghosh, A. K., Secreto, C. R., Medina, K. L., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Call, T. G., & Kay, N. E. (2009). Bi-directional activation between mesenchymal stem cells and CLL B-cells: implication for CLL disease progression. *British journal of haematology*, 147(4), 471–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07868.x>

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M., & Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 343(26), 1910–1916. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>

Dohner, H., Stilgenbauer, S., James, M. R., Benner, A., Weilguni, T., Bentz, M., Fischer, K., Hunstein, W., & Lichter, P. (1997). 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 89(7), 2516–2522.

Dubois, N., Crompton, E., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L., & Stamatopoulos, B. (2020). Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Frontiers in oncology*, 10, 1422. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01422>

Fan, R., Satilmis, H., Vandewalle, N., Verheye, E., De Bruyne, E., Menu, E., De Beule, N., De Becker, A., Ates, G., Massie, A., Kerre, T., Törngren, M., Eriksson, H., Vanderkerken, K., Breckpot, K., Maes, K., & De Veirman, K. (2023). Targeting S100A9 protein affects mTOR-ER stress signaling and increases venetoclax sensitivity in Acute Myeloid Leukemia. *Blood cancer journal*, 13(1), 188. <https://doi.org/10.1038/s41408-023-00962-z>

Fan, R., Satilmis, H., Vandewalle, N., Verheye, E., Vlummens, P., Maes, A., Muylaert, C., De Bruyne, E., Menu, E., Evans, H., Chantry, A., De Beule, N., Hose, D., Törngren, M., Eriksson, H., Vanderkerken, K., Maes, K., Breckpot, K., & De Veirman, K. (2023). Tasquinimod suppresses tumor cell growth and bone resorption by targeting immunosuppressive myeloid cells and inhibiting c-MYC expression in multiple myeloma. *Journal for immunotherapy of cancer*, 11(1), e005319. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005319>

FDA approves Imbruvica (ibrutinib) to treat chronic lymphocytic leukemia. [Internet]. Disponible desde: <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-imbruvica-ibrutinib-chronic-lymphocytic-leukemia-4007.html>.

Fenaux, P., Preudhomme, C., Lai, J. L., Quiquandon, I., Jonveaux, P., Vanrumbeke, M., Sartiaux, C., Morel, P., Loucheux-Lefebvre, M. H., Bauters, F., & et al. (1992). Mutations of the p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a report on 39 cases with cytogenetic analysis. *Leukemia*, 6(4), 246–250.

Filip, A. A., Ciseł, B., Koczkodaj, D., Wąsik-Szczepanek, E., Piersiak, T., & Dmoszyńska, A. (2013). Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages?. *Blood cells, molecules & diseases*, 50(4), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2012.12.003>

Fischer, K., Bahlo, J., Fink, A. M., Goede, V., Herling, C. D., Cramer, P., Langerbeins, P., von Tresckow, J., Engelke, A., Maurer, C., Kovacs, G., Herling, M., Tausch, E., Kreuzer, K. A., Eichhorst, B., Böttcher, S., Seymour, J. F., Ghia, P., Marlton, P., Kneba, M., Hallek, M. (2016). Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*, 127(2), 208–215. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-06-651125>

Fu, J., Fu, J., Chen, X., Zhang, Y., Gu, H., & Bai, Y. (2010). CD147 and VEGF co-expression predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Japanese journal of clinical oncology*, 40(11), 1046–1052. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyq098>

Fu, Z. G., Wang, L., Cui, H. Y., Peng, J. L., Wang, S. J., Geng, J. J., Liu, J. D., Feng, F., Song, F., Li, L., Zhu, P., Jiang, J. L., & Chen, Z. N. (2016). A novel small-molecule compound targeting CD147 inhibits the motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 7(8), 9429–9447. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6990>

Fraietta, J. A., Lacey, S. F., Orlando, E. J., Pruteanu-Malinici, I., Gohil, M., Lundh, S., Boesteanu, A. C., Wang, Y., O'Connor, R. S., Hwang, W. T., Pequignot, E., Ambrose, D. E., Zhang, C., Wilcox, N., Bedoya, F., Dorfmeier, C., Chen, F., Tian, L., Parakandi, H., Gupta, M., Melenhorst, J. J. (2018). Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Nature medicine*, 24(5), 563–571. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0010-1>

Fürstenau, M., Hallek, M., & Eichhorst, B. (2019). Sequential and combination treatments with novel agents in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, *104*(11), 2144–2154. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.208603>

Gabison, E. E., Hoang-Xuan, T., Mauviel, A., & Menashi, S. (2005). EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie*, *87*(3-4), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.023>

Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M. I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., Bomben, R., Dal-Bo, M., Luciano, F., Rossi, F. M., Degan, M., Amadori, S., & Del Poeta, G. (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *111*(2), 865–873. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092486>

Ghandour, F., Kassem, S., Simanovich, E., & Rahat, M. A. (2024). Glucose Promotes EMMPRIN/CD147 and the Secretion of Pro-Angiogenic Factors in a Co-Culture System of Endothelial Cells and Monocytes. *Biomedicines*, *12*(4), 706. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040706>

Ghavami, S., Rashedi, I., Dattilo, B. M., Eshraghi, M., Chazin, W. J., Hashemi, M., Wesselborg, S., Kerkhoff, C., & Los, M. (2008). S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of leukocyte biology*, *83*(6), 1484–1492. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607397>

Ghia, P., & Rawstron, A. (2018). Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. *Leukemia*, *32*(6), 1307–1316. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0109-x>

Ghia, P., Ferreri, A. M., & Caligaris-Cappio, F. (2007). Chronic lymphocytic leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, *64*(3), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.04.008>

Ghosh, A. K., Secreto, C. R., Knox, T. R., Ding, W., Mukhopadhyay, D., & Kay, N. E. (2010). Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*, *115*(9), 1755–1764. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-242719>

Grdisa, M. (2003). Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL cells in vitro. *Leukemia research*, *27*(10), 951–956.

Grass, G. D., & Toole, B. P. (2015). How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. *Bioscience reports*, *36*(1), e00283. <https://doi.org/10.1042/BSR20150256>

Guiyedi, K., Parquet, M., Aoufouchi, S., Chauzeix, J., Rizzo, D., Al Jamal, I., Feuillard, J., Gachard, N., & Peron, S. (2024). Increased c-MYC Expression Associated with Active IGH Locus Rearrangement: An Emerging Role for c-MYC in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers*, *16*(22), 3749. <https://doi.org/10.3390/cancers16223749>

Guarini, A., Chiaretti, S., Tavoraro, S., Maggio, R., Peragine, N., Citarella, F., Ricciardi, M. R., Santangelo, S., Marinelli, M., De Propriis, M. S., Messina, M., Mauro, F. R., Del Giudice, I., & Foà, R. (2008). BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood*, 112(3), 782–792. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127688>

Gusella, M., Bolzonella, C., Paolini, R., Rodella, E., Bertolaso, L., Scipioni, C., Bellini, S., Cuneo, A., Pasini, F., & Ramazzina, E. (2017). Plasma matrix metalloprotease 9 correlates with blood lymphocytosis, leukemic cell invasiveness, and prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Tumor Biology*, 39(2). <https://doi.org/10.1177/1010428317694325>

Hallek, M. (20-21 de mayo de 2022). *Special Conference with Professor Michael Hallek*. Congreso 4th LAG-CLL2022. Latin American Group on Chronic Lymphocytic Leukemia Meeting. Dr. Carlos Sergio Chiattono. (Moderador). Virtual. <https://abhheventos.com.br/lag-cll2022/>

Hallek, M., & Al-Sawaf, O. (2021). Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *American journal of hematology*, 96(12), 1679–1705. <https://doi.org/10.1002/ajh.26367>

Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, M., Montserrat, E., Chiorazzi, N., Stilgenbauer, S., Rai, K. R., Byrd, J. C., Eichhorst, B., O'Brien, S., Robak, T., Seymour, J. F., & Kipps, T. J. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131(25), 2745–2760. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806398>

Hallek, M., Wanders, L., Ostwald, M., Busch, R., Senekowitsch, R., Stern, S., Schick, H. D., Kuhn-Hallek, I., & Emmerich, B. (1996). Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leukemia & lymphoma*, 22(5-6), 439–447. <https://doi.org/10.3109/10428199609054782>

Hallek M. (2025). Chronic Lymphocytic Leukemia: 2025 Update on the Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy. *American journal of hematology*, 100(3), 450–480. <https://doi.org/10.1002/ajh.27546>

Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94(6), 1848–1854.

Hamblin, T. J. (1997). Trisomy 12 in CLL revisited. *Leuk Res*, 21(11–12), 1025–1026.

Hanna, B. S., Roessner, P. M., Yazdanparast, H., Colomer, D., Campo, E., Kugler, S., Yosifov, D., Stilgenbauer, S., Schmidt, M., Gabriel, R., Lichter, P., & Seiffert, M. (2019). Control of chronic lymphocytic leukemia development by clonally-expanded CD8+ T-cells that undergo functional exhaustion in secondary lymphoid tissues. *Leukemia*, 33(3), 625–637. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0250-6>

Hartmann, E. M., Rudelius, M., Burger, J. A., & Rosenwald, A. (2015). CCL3 chemokine expression by chronic lymphocytic leukemia cells orchestrates the composition

of the microenvironment in lymph node infiltrates. *Leukemia & Lymphoma*, 57(3), 563–571. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1068308>

Haselager, M. V., Kater, A. P., & Eldering, E. (2020). Proliferative Signals in Chronic Lymphocytic Leukemia; What Are We Missing?. *Frontiers in oncology*, 10, 592205. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.592205>

Heinig, K., Gätjen, M., Grau, M., Stache, V., Anagnostopoulos, I., Gerlach, K., Niesner, R. A., Cseresnyes, Z., Hauser, A. E., Lenz, P., Hehlhans, T., Brink, R., Westermann, J., Dörken, B., Lipp, M., Lenz, G., Rehm, A., & Höpken, U. E. (2014). Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer discovery*, 4(12), 1448–1465. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0096>

Heintel, D., Kroemer, E., Kienle, D., Schwarzinger, I., Gleiss, A., Schwarzmeier, J., Marculescu, R., Le, T., Mannhalter, C., Gaiger, A., Stilgenbauer, S., Döhner, H., Fonatsch, C., Jäger, U., & German CLL Study Group (2004). High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 18(4), 756–762. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403294>

Hermani, A., De Servi, B., Medunjanin, S., Tessier, P. A., & Mayer, D. (2006). S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Experimental cell research*, 312(2), 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.013>

Hermani, A., Hess, J., De Servi, B., Medunjanin, S., Grobholz, R., Trojan, L., Angel, P., & Mayer, D. (2005). Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(14), 5146–5152. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0352>

Hingorani DV, Lippert CN, Crisp JL, Savariar EN, Hasselmann JPC, et al. (2018) Impact of MMP-2 and MMP-9 enzyme activity on wound healing, tumor growth and RACPP cleavage. *PLOS ONE* 13(9): e0198464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198464>

Hibino, T., Sakaguchi, M., Miyamoto, S., Yamamoto, M., Motoyama, A., Hosoi, J., Shimokata, T., Ito, T., Tsuboi, R., & Huh, N. H. (2013). S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer research*, 73(1), 172–183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3843>

Honjo T. (2002). Does AID need another aid?. *Nature immunology*, 3(9), 800–801. <https://doi.org/10.1038/ni0902-800>

Hong, Y., Shen, C., Yin, Q. et al. Effects of RAGE-Specific Inhibitor FPS-ZM1 on Amyloid- β Metabolism and AGEs-Induced Inflammation and Oxidative Stress in Rat Hippocampus. *Neurochem Res* 41, 1192–1199 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1814-8>

Huh, Y. O., Lin, K. I., Vega, F., Schlette, E., Yin, C. C., Keating, M. J., Luthra, R., Medeiros, L. J., & Abruzzo, L. V. (2008). MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis. *British journal of haematology*, 142(1), 36–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07152.x>

Ichikawa, M., Williams, R., Wang, L., Vogl, T., & Srikrishna, G. (2011). S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Molecular cancer research : MCR*, 9(2), 133–148. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0394>

Jiang, Y., Chen, H. C., Su, X., Thompson, P. A., Liu, X., Do, K. A., Wierda, W., Keating, M. J., & Plunkett, W. (2016). ATM function and its relationship with ATM gene mutations in chronic lymphocytic leukemia with the recurrent deletion (11q22.3-23.2). *Blood cancer journal*, 6(9), e465. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.69>

Jia, L., Clear, A., Liu, F. T., Matthews, J., Uddin, N., McCarthy, A., Hoxha, E., Durance, C., Iqbal, S., & Gribben, J. G. (2014). Extracellular HMGB1 promotes differentiation of nurse-like cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123(11), 1709–1719. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-529610>

Kaderi, M. A., Kanduri, M., Buhl, A. M., Sevov, M., Cahill, N., Gunnarsson, R., Jansson, M., Smedby, K. E., Hjalgrim, H., Jurlander, J., Juliusson, G., Mansouri, L., & Rosenquist, R. (2011). LPL is the strongest prognostic factor in a comparative analysis of RNA-based markers in early chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 96(8), 1153–1160. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.039396>

Ke, X., Fei, F., Chen, Y., Xu, L., Zhang, Z., Huang, Q., Zhang, H., Yang, H., Chen, Z., & Xing, J. (2012). Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 α and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors. *Carcinogenesis*, 33(8), 1598–1607. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs196>

Zhuang, J., Hawkins, S. F., Glenn, M. A., Lin, K., Johnson, G. G., Carter, A., Cawley, J. C., & Pettitt, A. R. (2010). Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition. *Haematologica*, 95(1), 110–118. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.010272>

King, D., Pringle, J., Hutchinson, M. *et al.* Processing/activation of caspases, -3 and -7 and -8 but not caspase-2, in the induction of apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 12, 1553–1560 (1998). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401153>

Kim, H. J., Hawke, N., & Baldwin, A. S. (2006). NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 738-747.

Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., O'Brien, S., Gribben, J., & Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 16096. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.96>

Kipps T. J. (1988). Immunoglobulin V gene utilization in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's B cell lymphomas. *Nouvelle revue francaise d'hematologie*, 30(5-6), 293–298.

Kipps T. J. (2021). Mining the Microenvironment for Therapeutic Targets in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 27(4), 306–313. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000536>

Kong, L. M., Liao, C. G., Fei, F., Guo, X., Xing, J. L., & Chen, Z. N. (2010). Transcription factor Sp1 regulates expression of cancer-associated molecule CD147 in human lung cancer. *Cancer science*, 101(6), 1463–1470. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01554.x>

Kong, L. M., Liao, C. G., Zhang, Y., Xu, J., Li, Y., Huang, W., Zhang, Y., Bian, H., & Chen, Z. N. (2014). A regulatory loop involving miR-22, Sp1, and c-MYC modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis. *Cancer research*, 74(14), 3764–3778. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3555>

Kong, L. M., Yao, L., Lu, N., Dong, Y. L., Zhang, J., Wang, Y. Q., Liu, L., Zhang, H. L., Huang, J. G., & Liao, C. G. (2016). Interaction of KLF6 and Sp1 regulates basigin-2 expression mediated proliferation, invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(19), 27975–27987. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8564>

Kurtova, A. V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M. P., Sivina, M., Wierda, W. G., Estrov, Z., Keating, M. J., Shehata, M., Jäger, U., Gandhi, V., Kay, N. E., Plunkett, W., & Burger, J. A. (2009). Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*, 114(20), 4441–4450. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-233718>

Kwak, T., Drews-Elger, K., Ergonul, A. *et al.* Targeting of RAGE-ligand signaling impairs breast cancer cell invasion and metastasis. *Oncogene* 36, 1559–1572 (2017). <https://doi.org/10.1038/onc.2016.324>

Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C., & Stryckmans, P. (1998). Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*, 91(7), 2387–2396.

Lampson, B. L., Kasar, S. N., Matos, T. R., Morgan, E. A., Rassenti, L., Davids, M. S., Fisher, D. C., Freedman, A. S., Jacobson, C. A., Armand, P., Abramson, J. S., Arnason, J. E., Kipps, T. J., Fein, J., Fernandes, S., Hanna, J., Ritz, J., Kim, H. T., & Brown, J. R. (2016). Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. *Blood*, 128(2), 195–203. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-707133>

Laouedj, M., Tardif, M. R., Gil, L., Raquil, M. A., Lachhab, A., Pelletier, M., Tessier, P. A., & Barabé, F. (2017). S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood*, 129(14), 1980–1990. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-738005>

Leanderson, T., Liberg, D., & Ivars, F. (2015). S100A9 as a Pharmacological Target Molecule in Inflammation and Cancer. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*, 15(2), 97–104. <https://doi.org/10.2174/1871530315666150316123854>

Li, J., Shu, X., Xu, J., Su, S. M., Chan, U. I., Mo, L., Liu, J., Zhang, X., Adhav, R., Chen, Q., Wang, Y., An, T., Zhang, X., Lyu, X., Li, X., Lei, J. H., Miao, K., Sun, H., Xing, F., Zhang, A., Xu, X. (2022). S100A9-CXCL12 activation in BRCA1-mutant breast cancer promotes an immunosuppressive microenvironment associated with resistance to immunotherapy. *Nature communications*, 13(1), 1481. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29151-5>

Li, J. H., Huang, W., Lin, P., Wu, B., Fu, Z. G., Shen, H. M., Jing, L., Liu, Z. Y., Zhou, Y., Meng, Y., Xu, B. Q., Chen, Z. N., & Jiang, J. L. (2016). N-linked glycosylation at Asn152 on CD147 affects protein folding and stability: promoting tumour metastasis in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*, 6, 35210. <https://doi.org/10.1038/srep35210>

Lin, C. R., Wei, T. Y., Tsai, H. Y., Wu, Y. T., Wu, P. Y., & Chen, S. T. (2015). Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(12), 5006–5017. <https://doi.org/10.1096/fj.15-273987>

Losada, A. P., Wessman, M., Tiainen, M., Hopman, A. H., Willard, H. F., Sole, F., Caballin, M. R., Woessner, S., & Knuutila, S. (1991). Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study. *Blood*, 78(3), 775–779.

Lv, Z., Li, W., & Wei, X. (2020). S100A9 promotes prostate cancer cell invasion by activating TLR4/NF- κ B/integrin β 1/FAK signaling. *OncoTargets and therapy*, 13, 6443–6452. <https://doi.org/10.2147/OTT.S192250>

Ma, L.; Sun, P.; Zhang, J.-C.; Zhang, Q.; Shang -Long, Y. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int. J. Mol. Med.* 2017, 40, 31–38.

Ma, S., Chan, R. J., Gu, L., Xing, G., Rajakumaraswamy, N., Ruzicka, B. B., & Wagner-Johnston, N. D. (2021). Retrospective Analysis of the Impact of Adverse Event-Triggered Idelalisib Interruption and Dose Reduction on Clinical Outcomes in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 21(5), e432–e448. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2020.12.016>

Maffei, R., Fiorcari, S., Bulgarelli, J., Martinelli, S., Castelli, I., Deaglio, S., Debbia, G., Fontana, M., Coluccio, V., Bonacorsi, G., Zucchini, P., Narni, F., Torelli, G., Luppi, M., & Marasca, R. (2012). Physical contact with endothelial cells through β 1- and β 2- integrins rescues chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug-induced apoptosis and induces a peculiar gene expression profile in leukemic cells. *Haematologica*, 97(6), 952–960. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.054924>

Malcikova, J., Pavlova, S., Baliakas, P., Chatzikonstantinou, T., Tausch, E., Catherwood, M., Rossi, D., Soussi, T., Tichy, B., Kater, A. P., Niemann, C. U., Davi, F., Gaidano, G., Stilgenbauer, S., Rosenquist, R., Stamatopoulos, K., Ghia, P., & Pospisilova, S. (2024). ERIC

recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-2024 update. *Leukemia*, 38(7), 1455–1468. <https://doi.org/10.1038/s41375-024-02267-x>

Maloum, K., Davi, F., Merle-Béral, H., Pritsch, O., Magnac, C., Vuillier, F., Dighiero, G., Troussard, X., Mauro, F. F., & Bénichou, J. (2000). Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 96(1), 377–379.

Markowitz, J., & Carson, W. E., 3rd (2013). Review of S100A9 biology and its role in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1835(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.003>

Marquez, M. E., Hernández-Uzcátegui, O., Cornejo, A., Vargas, P., & Da Costa, O. (2015). Bone marrow stromal mesenchymal cells induce down regulation of CD20 expression on B-CLL: implications for rituximab resistance in CLL. *British journal of haematology*, 169(2), 211–218. <https://doi.org/10.1111/bjh.13286>

Mehta, A. R., & Armstrong, A. J. (2016). Tasquinimod in the treatment of castrate-resistant prostate cancer - current status and future prospects. *Therapeutic advances in urology*, 8(1), 9–18. <https://doi.org/10.1177/1756287215603558>

Meng, L., Tang, Q., Zhao, J., Wang, Z., Wei, L., Wei, Q., Yin, L., Luo, S., & Song, J. (2021). S100A9 Derived From Myeloma Associated Myeloid Cells Promotes TNFSF13B/TNFRSF13B-Dependent Proliferation and Survival of Myeloma Cells. *Frontiers in oncology*, 11, 691705. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.691705>

Morande, P. E., Sivina, M., Uriepero, A., Seija, N., Berca, C., Fresia, P., Landoni, A. I., Di Noia, J. M., Burger, J. A., & Oppezzo, P. (2019). Ibrutinib therapy downregulates AID enzyme and proliferative fractions in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 133(19), 2056–2068. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-876292>

Moreno, C., & Montserrat, E. (2008). New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*, 22(4), 211–219.

Møller M. B. (2000). P27 in cell cycle control and cancer. *Leukemia & lymphoma*, 39(1-2), 19–27. <https://doi.org/10.3109/10428190009053535>

Möller, A., Jauch-Speer, S. L., Gandhi, S., Vogl, T., Roth, J., & Fehler, O. (2023). The roles of toll-like receptor 4, CD33, CD68, CD69, or CD147/EMMPRIN for monocyte activation by the DAMP S100A8/S100A9. *Frontiers in immunology*, 14, 1110185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1110185>

Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J., & Kikuchi, M. (2006). Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathology international*, 56(7), 359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01972.x>

Nacken, W., Roth, J., Sorg, C., & Kerkhoff, C. (2003). S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity. *Microscopy research and technique*, 60(6), 569–580. <https://doi.org/10.1002/jemt.10299>

Newcomb, E. W., Rao, L. S., Giknavorian, S. S., & Lee, S. Y. (1995). Alterations of multiple tumor suppressor genes (p53 (17p13), p16INK4 (9p21), and DBM (13q14)) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Carcinog*, *14*(3), 141–146.

Oppezzo, P., Vasconcelos, Y., Settegrana, C., Jeannel, D., Vuillier, F., Legarff-Tavernier, M., Kimura, E. Y., Bechet, S., Dumas, G., Brissard, M., Merle-Béral, H., Yamamoto, M., Dighiero, G., Davi, F., & French Cooperative Group on CLL (2005). The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *106*(2), 650–657. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3344>

Oppezzo, P., Vuillier, F., Vasconcelos, Y., Dumas, G., Magnac, C., Payelle-Brogard, B., Pritsch, O., & Dighiero, G. (2003). Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood*, *101*(10), 4029–4032. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3175>

Os, A., Bürgler, S., Ribes, A. P., Funderud, A., Wang, D., Thompson, K. M., Tjønnfjord, G. E., Bogen, B., & Munthe, L. A. (2013). Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells. *Cell reports*, *4*(3), 566–577. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.011>

Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, Y. J., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., Berchem, G., & Moussay, E. (2015). Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood*, *126*(9), 1106–1117. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618025>

Palacios, F., Moreno, P., Morande, P., Abreu, C., Correa, A., Porro, V., Landoni, A. I., Gabus, R., Giordano, M., Dighiero, G., Pritsch, O., & Oppezzo, P. (2010). High expression of AID and active class switch recombination might account for a more aggressive disease in unmutated CLL patients: link with an activated microenvironment in CLL disease. *Blood*, *115*(22), 4488–4496. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257758>.

Palacios, F., Prieto, D., Abreu, C., Ruiz, S., Morande, P., Fernández-Calero, T., Libisch, G., Landoni, A. I., & Oppezzo, P. (2015). Dissecting chronic lymphocytic leukemia microenvironment signals in patients with unmutated disease: microRNA-22 regulates phosphatase and tensin homolog/AKT/FOXO1 pathway in proliferative leukemic cells. *Leukemia & lymphoma*, *56*(5), 1560–1565. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.990900>

Palacios, F., Abreu, C., Prieto, D., Morande, P., Ruiz, S., Fernández-Calero, T., Naya, H., Libisch, G., Robello, C., Landoni, A. I., Gabus, R., Dighiero, G., & Oppezzo, P. (2015). Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*, *29*(1), 115–125. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.158>

Parikh, S. A., & Shanafelt, T. D. (2016). Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in oncology*, *43*(2), 233–240. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.02.009>

Pascutti, M. F., Jak, M., Tromp, J. M., Derks, I. A., Remmerswaal, E. B., Thijssen, R., van Attekum, M. H., van Bochove, G. G., Luijckx, D. M., Pals, S. T., van Lier, R. A., Kater, A. P., van Oers, M. H., & Eldering, E. (2013). IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can

induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood*, 122(17), 3010–3019. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-467670>

Patten, P. E. M., Ferrer, G., Chen, S. S., Kolitz, J. E., Rai, K. R., Allen, S. L., Barrientos, J. C., Ioannou, N., Ramsay, A. G., & Chiorazzi, N. (2021). A Detailed Analysis of Parameters Supporting the Engraftment and Growth of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Immune-Deficient Mice. *Frontiers in immunology*, 12, 627020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.627020>

Payelle-Brogard, B., Magnac, C., Alcover, A., Roux, P., & Dighiero, G. (2002). Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, 118(4), 976–985. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03759.x>

Payque Taramasco, M. E. (2022). *Rol de la proteína S100A9 en la progresión de la Leucemia Linfoide Crónica: Hacia la caracterización de nuevos blancos terapéuticos* (Trabajo final de carrera). Universidad ORT Uruguay, Facultad de Ingeniería.

Pedersen, I. M., Kitada, S., Leoni, L. M., Zapata, J. M., Karras, J. G., Tsukada, N., Kipps, T. J., Choi, Y. S., Bennett, F., & Reed, J. C. (2002). Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*, 100(5), 1795–1801.

Petlickovski, A., Laurenti, L., Li, X., Marietti, S., Chiusolo, P., Sica, S., Leone, G., & Efremov, D. G. (2005). Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 105(12), 4820–4827. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2669>

Polman, C., Barkhof, F., Sandberg-Wollheim, M., Linde, A., Nordle, O., Nederman, T., & Laquinimod in Relapsing MS Study Group (2005). Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology*, 64(6), 987–991. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154520.48391.69>

Pontikoglou, C., Kastrinaki, M. C., Klaus, M., Kalpadakis, C., Katonis, P., Alpantaki, K., Pangalis, G. A., & Papadaki, H. A. (2013). Study of the quantitative, functional, cytogenetic, and immunoregulatory properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Stem cells and development*, 22(9), 1329–1341. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0255>

Prieto, D., Seija, N., Uriepero, A., Souto-Padron, T., Oliver, C., Irigoien, V., Guillermo, C., Navarrete, M. A., Inés Landoni, A., Dighiero, G., Gabus, R., Giordano, M., & Oppezio, P. (2018). LPL protein in Chronic Lymphocytic Leukaemia have different origins in Mutated and Unmutated patients. Advances for a new prognostic marker in CLL. *British journal of haematology*, 182(4), 521–525. <https://doi.org/10.1111/bjh.15427>

Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219–234.

Ramachandran, I. R., Lin, C., Chase, T., Gabrilovich, D., & Nefedova, Y. (2014). A novel agent tasquinimod demonstrates a potent anti-tumor activity in pre-clinical models of multiple myeloma. *Blood*. 10.1182/blood.v124.21.5729.5729

Raymond, E., Dagleish, A., Damber, J. E., Smith, M., & Pili, R. (2014). Mechanisms of action of tasquinimod on the tumour microenvironment. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 73(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2321-8>

Razmkhah, F., Kim, S., Lim, S., Dania, A.-J., & Choi, J. (2023). S100A8 and S100A9 in Hematologic Malignancies: From Development to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13382. <https://doi.org/10.3390/ijms241713382>

Redondo-Muñoz, J., Escobar-Díaz, E., Samaniego, R., Terol, M. J., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2006). MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood*, 108(9), 3143–3151. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-007294>

Redondo-Munoz, J., José Terol, M., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2008). Matrix metalloproteinase-9 is up-regulated by CCL21/CCR7 interaction via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling and is involved in CCL21-driven B-cell chronic lymphocytic leukemia cell invasion and migration. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(1), 383-386.

Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., Terol, M. J., Van den Steen, P. E., Hernández del Cerro, M., Roderfeld, M., Roeb, E., Opdenakker, G., García-Marco, J. A., & García-Pardo, A. (2010). Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Chronic Lymphocytic Leukemia B Cell Survival through Its Hemopexin Domain. *Cancer Cell*, 17(2), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.044>

Reis, J. C., Travado, L., Seixas, E., Sousa, B., & Antoni, M. H. (2022). Low social and family well-being is associated with greater RAGE ligand s100A8/A9 and interleukin-1 beta levels in metastatic breast cancer patients. *Brain, behavior, & immunity - health*, 21, 100433. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100433>

Riches, J. C., Davies, J. K., McClanahan, F., Fatah, R., Iqbal, S., Agrawal, S., Ramsay, A. G., & Gribben, J. G. (2013). T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*, 121(9), 1612–1621. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457531>

Robak, T., Dmoszynska, A., Solal-Céligny, P., Warzocha, K., Loscertales, J., Catalano, J., Afanasiev, B. V., Larratt, L., Geisler, C. H., Montillo, M., Zyuzgin, I., Ganly, P. S., Dartigeas, C., Rosta, A., Maurer, J., Mendila, M., Saville, M. W., Valente, N., Wenger, M. K., & Moiseev, S. I. (2010). Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(10), 1756–1765. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.4556>

Rodriguez, C. M., Gilardoni, M. B., Remedi, M. M., Sastre, D., Heller, V., Pellizas, C. G., & Donadio, A. C. (2020). Tumor-stroma interaction increases CD147 expression in neoplastic B lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Blood cells, molecules & diseases*, 82, 102405. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2020.102405>

Roessner, P. M., & Seiffert, M. (2020). T-cells in chronic lymphocytic leukemia: Guardians or drivers of disease?. *Leukemia*, 34(8), 2012–2024. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0873-2>

Roth, J., Goebeler, M., & Sorg, C. (2001). S100A8 and S100A9 in inflammatory diseases. *Lancet (London, England)*, 357(9261), 1041. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71610-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71610-X)

Rozman, C., & Montserrat, E. (1995). Chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*, 333(16), 1052–1057. <https://doi.org/10.1056/NEJM199510193331606>

Rubartelli, A., Sitia, R., Zicca, A., Grossi, C. E., & Ferrarini, M. (1983). Differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells: correlation between the synthesis and secretion of immunoglobulins and the ultrastructure of the malignant cells. *Blood*, 62(2), 495–504.

Scheffold, A., & Stilgenbauer, S. (2020). Revolution of Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy: the Chemo-Free Treatment Paradigm. *Current oncology reports*, 22(2), 16. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-0881-4>

Schroeder, H. W., Jr, & Dighiero, G. (1994). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunology today*, 15(6), 288–294. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90009-4)

Shinichiro Miura, Hiroshi Iwamoto, Masashi Namba, Kakuhiro Yamaguchi, Shinjiro Sakamoto, Yasushi Horimasu, Takeshi Masuda, Shintaro Miyamoto, Taku Nakashima, Shinichiro Ohshimo, Kazunori Fujitaka, Hironobu Hamada, Noboru Hattori - High S100A9 level predicts poor survival, and the S100A9 inhibitor paquinimod is a candidate for treating idiopathic pulmonary fibrosis: *BMJ Open Respiratory Research* 2024;11:e001803.

Shen, L., Sundstedt, A., Ciesielski, M., Miles, K. M., Celander, M., Adelaiye, R., Orillion, A., Ciamporcerio, E., Ramakrishnan, S., Ellis, L., Fenstermaker, R., Abrams, S. I., Eriksson, H., Leanderson, T., Olsson, A., & Pili, R. (2015). Tasquinimod modulates suppressive myeloid cells and enhances cancer immunotherapies in murine models. *Cancer immunology research*, 3(2), 136–148. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0036>

Shukla, A., Shukla, V., & Joshi, S. S. (2018). Regulation of MAPK signaling and implications in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 59(7), 1565–1573. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1370548>

Sivina, M., Hartmann, E., Kipps, T. J., Rassenti, L., Krupnik, D., Lerner, S., LaPushin, R., Xiao, L., Huang, X., Werner, L., Neuberg, D., Kantarjian, H., O'Brien, S., Wierda, W. G., Keating, M. J., Rosenwald, A., & Burger, J. A. (2011). CCL3 (MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 117(5), 1662–1669. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307249>

Skorka, K., Wlasiuk, P., Karczmarczyk, A., & Giannopoulos, K. (2021). Aberrant Expression of *TLR2*, *TLR7*, *TLR9*, Splicing Variants of *TLR4* and *MYD88* in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Journal of clinical medicine*, 10(4), 867. <https://doi.org/10.3390/jcm10040867>

Skånland, S. S., & Mato, A. R. (2021). Overcoming resistance to targeted therapies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Advances*, 5(1), 334-343.

Sociedad de Hematología del Uruguay. Registro Nacional Leucemia Linfóide Crónica 2021. [Internet]. Disponible desde: https://www.shu.com.uy/info_util_registro_leucemias.html

Spinello, I., Saulle, E., Quaranta, M. T., Pasquini, L., Pelosi, E., Castelli, G., Ottone, T., Voso, M. T., Testa, U., & Labbaye, C. (2019). The small-molecule compound AC-73 targeting CD147 inhibits leukemic cell proliferation, induces autophagy and increases the chemotherapeutic sensitivity of acute myeloid leukemia cells. *Haematologica*, 104(5), 973–985. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.199661>

Srikrishna G. (2012). S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *Journal of innate immunity*, 4(1), 31–40. <https://doi.org/10.1159/000330095>

Stamatopoulos, B., Meuleman, N., Haibe-Kains, B., Saussoy, P., Van Den Neste, E., Michaux, L., Heimann, P., Martiat, P., Bron, D., & Lagneaux, L. (2009). microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, 113(21), 5237–5245. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-189407>

Sternberg, C., Armstrong, A., Pili, R., Ng, S., Huddart, R., Agarwal, N., Khvorostenko, D., Lyulko, O., Brize, A., Vogelzang, N., Delva, R., Harza, M., Thanos, A., James, N., Werbrouck, P., Bögemann, M., Hutson, T., Milecki, P., Chowdhury, S., Gallardo, E., ... Carducci, M. (2016). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study of Tasquinimod in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(22), 2636–2643. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.66.9697>

Stevenson, F. K., & Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103(12), 4389–4395. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4312>

Stoetzer, O., Pogrebniak, A., Scholz, M. *et al.* Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 13, 1873–1880 (1999). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401572>

Tang, W., Chang, S. B., & Hemler, M. E. (2004). Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Molecular biology of the cell*, 15(9), 4043–4050. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-05-0402>

Tausch, E., & Stilgenbauer, S. (2020). BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia - uncommon and unfavorable. *Haematologica*, 105(2), 255–256. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.238691>

Ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2016). Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis

and treatment. *Biochimica et biophysica acta*, 1863(3), 401–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.009>

Vallejo, B. A., Achenbach, S., Rabe, K. G., Norman, A. D., Vachon, C. M., Cerhan, J. R., ... & Slager, S. L. (2024). Incidence and Prevalence of Chronic Lymphocytic Leukemia in the 7-County Region Around Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. *Blood*, 144, 6801.

Vlachonikola, E., Stamatopoulos, K., & Chatzidimitriou, A. (2021). T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Two-Edged Sword. *Frontiers in immunology*, 11, 612244. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.612244>

Vogl DT, Nefedova Y, Wileyto EP, Sembhi H, Strakovsky I, Nguyen C, Taneja R, Bondesson E, Eriksson H, Tuveesson H. A phase 1 study of tasquinimod in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2020;136(Supplement 1):17–18.

Voigt, H., Vetter-Kauczok, C. S., Schrama, D., Hofmann, U. B., Becker, J. C., & Houben, R. (2009). CD147 impacts angiogenesis and metastasis formation. *Cancer investigation*, 27(3), 329–333. <https://doi.org/10.1080/07357900802392675>

Vrhovac, R., Delmer, A., Tang, R., Marie, J. P., Zittoun, R., & Ajchenbaum-Cymbalista, F. (1998). Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood*, 91(12), 4694–4700.

Vuillier, F., Dumas, G., Magnac, C., Prevost, M. C., Lalanne, A. I., Oppedo, P., Melanitou, E., Dighiero, G., & Payelle-Brogard, B. (2005). Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains. *Blood*, 105(7), 2933–2940. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3643>

Wang, C., Klechikov, A. G., Gharibyan, A. L., Wärmländer, S. K., Jarvet, J., Zhao, L., Jia, X., Narayana, V. K., Shankar, S. K., Olofsson, A., Brännström, T., Mu, Y., Gräslund, A., & Morozova-Roche, L. A. (2014). The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade. *Acta neuropathologica*, 127(4), 507–522. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1208-4>

Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., & Ma, J. (2018). S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in immunology*, 9, 1298. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01298>

Wang, Y., Fang, C., Gao, H., Bilodeau, M. L., Zhang, Z., Croce, K., Liu, S., Morooka, T., Sakuma, M., Nakajima, K., Yoneda, S., Shi, C., Zidar, D., Andre, P., Stephens, G., Silverstein, R. L., Hogg, N., Schmaier, A. H., & Simon, D. I. (2014). Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 2160–2171. <https://doi.org/10.1172/JCI70966>

Weidle, U. H., Scheuer, W., Eggle, D., Klostermann, S., & Stockinger, H. (2010). Cancer-related issues of CD147. *Cancer genomics & proteomics*, 7(3), 157–169.

Woyach, J. A., Furman, R. R., Liu, T. M., Ozer, H. G., Zapatka, M., Ruppert, A. S., Xue, L., Li, D. H., Steggerda, S. M., Versele, M., Dave, S. S., Zhang, J., Yilmaz, A. S., Jaglowski, S. M., Blum, K. A., Lozanski, A., Lozanski, G., James, D. F., Barrientos, J. C., Lichter, P., Byrd, J. C.

(2014). Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *The New England journal of medicine*, 370(24), 2286–2294. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400029>

Wu, P., Quan, H., Kang, J., He, J., Luo, S., Xie, C., Xu, J., Tang, Y., & Zhao, S. (2017). Downregulation of Calcium-Binding Protein S100A9 Inhibits Hypopharyngeal Cancer Cell Proliferation and Invasion Ability Through Inactivation of NF- κ B Signaling. *Oncology research*, 25(9), 1479–1488. <https://doi.org/10.3727/096504017X14886420642823>

Xin, X., Zeng, X., Gu, H., Li, M., Tan, H., Jin, Z., Hua, T., Shi, R., & Wang, H. (2016). CD147/EMMPRIN overexpression and prognosis in cancer: A systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 6, 32804. <https://doi.org/10.1038/srep3280404>.

Xiong, L., Ding, L., Ning, H., Wu, C., Fu, K., Wang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., & Zhou, L. (2016). CD147 knockdown improves the antitumor efficacy of trastuzumab in HER2-positive breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(36), 57737–57751. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10252>

Xiong, L., Edwards, C. K., 3rd, & Zhou, L. (2014). The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. *International journal of molecular sciences*, 15(10), 17411–17441. <https://doi.org/10.3390/ijms151017411>

Yosifov, D. Y., Wolf, C., Stilgenbauer, S., & Mertens, D. (2019). From Biology to Therapy: The CLL Success Story. *HemaSphere*, 3(2), e175. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000175>

Zarkowska, T., & Mitnacht, S. (1997). Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *The Journal of biological chemistry*, 272(19), 12738–12746. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12738>

Zhu, Y., Monni, O., El-Rifai, W., Siitonen, S. M., Vilpo, L., Vilpo, J., & Knuutila, S. (1999). Discontinuous deletions at 11q23 in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 13(5), 708-12.

Targeting S100A9-mediated inflammation: A novel therapeutic approach for CLL

Angimar Uriepero-Palma^{1*}, Maria E. Marquez^{2*}, Eugenia Payque^{2*}, Melanie Mediavilla-Varela¹, Wael Gamal^{1,3}, Kamira Maharaj¹, John Powers⁴, Erika Eksioglu¹, Julio C. Chavez⁹, Sandra Sernbo², Florencia Palacios², Juliana Querol², Claudia Ortega⁵, Rita Uria², Gimena Dos Santos^{2,6}, Carolina Oliver⁷, Ana Inés Landoni⁸, Eva Sahakian^{1,9#}, Pablo Opezzo^{2#}, Javier Pinilla-Ibarz^{1,9#}

¹Department of Immunology, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, FL 33612, USA.

²Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

³Department of Molecular Medicine, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL 33612, USA.

⁴Department of Tumor Microenvironment and Metastasis, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, FL 33612, USA.

⁵Protein Engineering Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

⁶Hospital de Clínicas, Cátedra de Hematología, Montevideo, Uruguay.

⁷Centro de Asistencia Sindicato Médico del Uruguay, CASMU Montevideo, Uruguay.

⁸Hospital Maciel, ASSE, Servicio de Hematología, Montevideo, Uruguay.

⁹Department of Malignant Hematology, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, Tampa, FL 33612, USA.

First authorship shared * Senior authorship shared #

Correspondence: Eva Sahakian, Ph.D Moffitt Cancer Center & Research Institute, 12902 Magnolia Drive, Tampa, Florida, USA; E-mail: Eva.Sahakian@moffitt.org

Word Count: 3947

KEY POINTS

1-Chronic inflammation and immune dysfunction are central to CLL progression, driven by elevated inflammatory cytokines and activation of signaling pathways like NF- κ B, PI3K δ , and MAPK via BCR and CD40, which provide leukemic lymphocytes with survival advantages.

2-Research utilizing in vivo and patient-derived xenograft (PDX) models, including the development of an E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mouse model, supports the potential of pharmacologically targeting S100A9 as a therapeutic strategy for CLL.

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) presents challenges in treatment despite advancements in targeted therapies, often facing resistance or relapse. Chronic inflammation plays a significant role in CLL biology, with heightened inflammatory responses and immune dysfunction. Elevated levels of inflammatory cytokines support this notion. Activating signaling pathways like NF- κ B, PI3K δ , and MAPK via B cell receptors (BCR) and CD40 confers advantages to leukemic lymphocytes. Our research focuses on the pro-inflammatory protein S100A9 in CLL progression. We previously described that CLL patients release exosomes containing S100A9 during disease progression, correlating with NF- κ B activation. S100A9, known for its role in autoimmune diseases and cancers, modulates the antitumor immune response by influencing myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). Receptors for S100A9 include Toll-like receptor 4 (TLR4), the receptor for advanced glycation end products (RAGE), and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN). We identified a novel molecular mechanism involving the S100A9/EMMPRIN interaction in CLL using primary cells and an in vivo CLL mouse model (E μ -TCL1). Additionally, we developed an E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mouse model and explored pharmacological targeting of S100A9 in a patient-derived xenograft (PDX) model, highlighting S100A9 as a promising therapeutic target in CLL with potential clinical applications.

INTRODUCTION

CLL is characterized by the accumulation of mature B lymphocytes, typically CD19⁺CD5⁺, in peripheral blood (PB), bone marrow (BM), and secondary lymphoid tissues(1). With the approval of new targeted therapies, many CLL patients have achieved favorable responses(2). However, treatment resistance and toxicity are often observed, making CLL a therapeutic challenge(2). Therefore, understanding the mechanisms involved in disease progression is crucial for developing novel therapeutic approaches. The role of chronic inflammation in CLL biology has been well-recognized, wherein an exaggerated activation of the inflammatory response against self-antigens coexists with dysfunctional immune clearance of infections. Not surprisingly, elevated levels of inflammatory cytokines have been detected in the plasma of individuals with

CLL(3-5). Additionally, BCR activation, as well as stimulation through CD40, increases the activity of the NF- κ B(6, 7), PI3K δ (8), and MAPK(9) signaling pathways, conferring proliferative and survival advantages to leukemic lymphocytes.

Our group previously described that exosome containing the pro-inflammatory protein S100A9 are released by B cells from CLL patients exclusively during disease progression(10). S100A9 is a damage-associated molecular pattern that promotes the inflammatory response in autoimmune diseases and acts as a potent mediator of inflammation in cancer(11). S100A9 also reduces the antitumor immune response by recruiting and regulating MDSCs(12, 13). Several S100A9 receptors have been described, including TLR4, RAGE, and EMMPRIN(14).

Recent studies have shown that S100A9 expression is increased in several solid tumors and is associated with cancer progression, invasion, and metastasis(11, 15-17). In hematological malignancies, S100A9 drives the accumulation of MDSCs and contributes to developing myelodysplastic syndromes(18). S100A9 is also highly expressed in acute myeloid leukemia and correlates with resistance to the b-cell leukemia/lymphoma 2 (BCL-2) inhibitor venetoclax(19, 20). Likewise, S100A9 promotes multiple myeloma (MM) progression by inducing the tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B (TNFSF13B)(21) and megakaryocyte expansion(22). All these data highlight the potential of exploring S100A9 as a therapeutic target in cancer. Quinoline-3-carboxamide compounds such as Tasquinimod (TasQ) and Paquinimod (PaQ) can block the interaction of S100A9 with its receptors, thus preventing the activation of the inflammatory signaling pathways induced by this protein(23). Fan et al. showed that TasQ significantly reduced the tumor load and prolonged the overall survival of MM-bearing mice(24). This small-molecule oral inhibitor is also being tested in two different phase III clinical trials for castration-resistant prostate cancer (NCT01234311, NCT02057666) and in a phase I clinical trial for MM (NCT04405167).

In this study, we provide evidence for the role of the pro-inflammatory protein S100A9 during CLL progression using primary CLL cells and E μ -TCL1 mice. We propose a molecular mechanism involving the S100A9/EMMPRIN interaction. Additionally, we developed a novel E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mouse model and evaluated the pharmacological targeting of S100A9 in a PDX model of CLL for the first time. Overall, this work validates S100A9 as a potential therapeutic target in this

leukemia.

METHODS

CLL Patient Samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from CLL patients were collected based on International Workshop on CLL criteria. Patients were classified into two groups: *Indolent* (Binet stage A, lymphocyte doubling time >1 year, no AID mRNA in PB, and no treatment required after 5 years) and *Progressive* (Binet stage B/C, lymphocyte doubling time <6 months, AID mRNA in PB, and treatment required within 5 years). Clinical details are in Table 1. The study was approved by ethical boards (Hospital Maciel, CASMU, Institut Pasteur, and Moffitt Cancer Center), and all participants provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

In vitro stimulation of primary CLL cells

PBMCs from CLL patients were incubated with recombinant human S100A9 (rhS100A9) or in-house rh-S100A9 (see Supplemental Methods) for 72 hours in RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated FBS and antibiotics at 37°C, 95% humidity, and 5% CO₂. Flow cytometry was used to assess anti-apoptotic proteins MCL1 and BCL2 (after 48 hours) and phosphorylation of AKT1^(Ser473/Thr308), IKK^(Ser176/180), and JNK^(Thr183/185) (after 72 hours). For inhibitor experiments, TasQ or PaQ (10 µM) and α-EMMPRIN antibody (10 µg/mL) were added. EMMPRIN expression was evaluated after activation with CpG-ODN (2 µM), IL-15 (15 ng/mL), and anti-IgM (20 µg/mL) for 48 hours or CD40L (1 µg/mL) plus IL-4 (5 ng/mL) for six days. Unstimulated cells served as controls.

Flow Cytometry

Immunophenotyping analysis was performed by multiparametric flow cytometry (FC). Cells were first stained with a Live/Dead fixable dye in phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, surface staining was carried out with the corresponding antibodies in FACS buffer. Cells were fixed and permeabilized following surface staining using the Cyto-Fast/Perm kit when intracellular protein detection was needed. A complete list of used antibodies is provided

in Supplemental Table 1. All markers were gated according to fluorescence minus one or isotype controls. The acquisition was performed on a BD FACSymphony or an Attune NxT flow cytometer, and data were analyzed with FlowJo software, version 10.8.1.

Multiplex Cytokine Assay

PBMCs from CLL patients were stimulated in vitro with 10ug/mL of rhS100A9 for 24 hours. Then, the supernatant was used for the Bio-Plex Pro Human Immunotherapy Panel. Data was acquired using xMAP INTELLIFLEX equipment and analyzed using the ProcartaPlex analysis app.

mRNA expression analysis

RNA extraction was performed from PBMCs CLL using Trizol. cDNA synthesis was done using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) with ribonuclease inhibitor RNAsin. Quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) amplification was performed using SYBR Green with Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) serving as endogenous control(25). Supplemental Table 2 provides EMMPRIN, JUN, FOS, and GAPDH primers. All qPCR reactions were run on the QuantStudio3 Real-time PCR system.

EMMPRIN expression analysis

CLL PBMCs were lysed with RIPA buffer, and protein concentration was measured using the Bicinchoninic acid method. 10% SDS-PAGE separated equal protein amounts, transferred to nitrocellulose membranes, and blocked with 5% non-fat milk in PBS-Tween 20 at 37°C for 1 hour. Membranes were incubated overnight at 4°C with HRP-conjugated anti-EMMPRIN antibody. Protein bands were detected via enhanced chemiluminescence and captured with Image Quant 800. Band density was normalized to GAPDH, and fluorescence intensity was quantified using ImageJ.

S100A9-deficient CLL murine model

E μ -TCL1 and S100A9-deficient (S100A9^{-/-}) mice were crossed to generate a new E μ -

TCL1/S100A9^{-/-} double transgenic mouse model. This novel mouse colony was homozygous for T-cell leukemia 1 (Tcl1) and S100a9 genes. Splenocytes from aged E μ -TCL1 and E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mice were obtained for the accelerated murine model. B-CLL cells (CD19⁺CD5⁺) were isolated by two-step magnetic cell separation and adoptively transferred via the tail vein injection (TVI) into 8 to 10-week-old NOD/SCID/IL2 γ null (NSG) mice mouse at 5 x 10⁶ B-CLL cells per mouse. The CD19⁺CD5⁺B220^{low} B lymphocytes were assessed weekly in peripheral blood using FC.

Adoptive transfer model of CLL

10 x 10⁶ splenocytes from aged E μ -TCL1 mice were transferred via TVI into WT C57BL/6 mice (6-8 weeks old). CD19⁺CD5⁺B220^{low} B lymphocytes were monitored weekly in PB by flow cytometry. Treatments began once leukemic cells reached \geq 30% of total CD45⁺ leukocytes in PB. Post-treatment, mice were either observed for survival or euthanized to assess spleen infiltration. Survival analyses continued until endpoint criteria were met. Mice were housed pathogen-free and handled per Animal Experiment Guidelines.

***In vivo* treatments**

For all *in vivo* treatments with PaQ (TargetMol, Wellesley Hills, MA) or TasQ (TargetMol), the inhibitors were resuspended at 25mg/kg in distilled water containing 2% hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and administered per os ad libitum for 3-4 weeks.

Patient-derived xenograft model of CLL

Xenogeneic transplantation was performed as described previously(26). T cells were isolated from cryopreserved CLL patient PBMCs using anti-CD3 magnetic microbeads and cultured (1 x 10⁶ CD3⁺ cells/mL) for eight days with CD3/CD28 activators and IL-2. On day eight, activated CD3⁺ cells were mixed with thawed CLL PBMCs (1:40 ratio) and 20 x 10⁶ cells were injected via TVI into NSG mice. Engraftment was confirmed in PB by FC after eight days. Mice were randomly assigned to treatment groups based on human CD45⁺ PB levels, and TasQ or vehicle was administered in drinking water for three weeks.

NanoString analysis

Fluorescence-activated cell sorting (BD FACSAria II) was used to isolate CD19⁺ cells from NSG mice adoptively transferred with E μ -TCL1 or E μ -TCL1/S100A9^{-/-} B-CLL cells, as well as from the accelerated murine CLL model treated with PaQ or vehicle. Three mice per group were included in the analysis. Post-cell sorting purity was >98% in all samples. RNA extraction was performed using RNeasy Mini Kit (Qiagen) with on-column DNase digestion. Extracted RNA was processed utilizing the nCounter Mouse PanCancer Immune Profiling Panel. Raw data was analyzed using the ROSALIND bioinformatics platform. Differentially expressed genes were defined as a false discovery rate < 0.05 and a fold change > 1.5 and < -1.5 for up-and-down-regulated genes, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad software v10.1.2 and presented as mean \pm SD or \pm SEM. All in vitro studies were performed with at least three technical and three biological replicates. A paired or unpaired two-tailed Student's t-test was applied for two-group comparisons. An ordinary two-way or one-way analysis of variance (ANOVA) test was performed for multiple-group analysis, followed by the Šídák multiple comparisons test. The log-rank (Mantel-Cox) test was used for survival comparison in human and mice experiments. In all cases, p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

S100A9 promotes the activation of pro-inflammatory pathways in primary B-CLL cells in patients with progressive disease.

We previously reported that exosomes isolated from the plasma of CLL patients with progressive disease activate the NF- κ B pathway in primary CLL cells(10). These exosomes contained high levels of the pro-inflammatory protein S100A9 and other proteins(10). To confirm that S100A9 activates NF- κ B and to explore other signaling pathways, we cultured PBMCs from CLL patients with rhS100A9 for 72 hours. Subsequently, we evaluated the median fluorescence intensity (MFI) of phospho-IKK^{ser176/180}, phospho-AKT^{ser473}, phospho-AKT^{thr308}, and phospho-JNK^{thr182/185} by FC.

Our data show that S100A9 promotes the activation of the NF- κ B pathway (Figure 1A) and increases phosphorylation of the AKT kinase (Figure 1B) and the JNK (Figure 1C) in B-CLL cells from patients with progressive disease. Conversely, no significant changes in the phosphorylation pattern of these proteins were observed in B-CLL cells from indolent CLL cases (Figure 1A-C). Because JUN and FOS, two transcription factors belonging to the activator protein-1 (AP-1) family, are tightly regulated by NF- κ B and MAPK signaling cascades(27), we evaluated if S100A9 modulates the expression of these transcription factors. Our data from qPCR analysis show an increased expression of both in CLL PBMCs after stimulation with rhS100A9 (Figure 1D).

Several studies have shown that activation of the PI3K and NF- κ B signaling pathways is pivotal in B-CLL cell survival(28, 29). Interestingly, our results indicate that the expression of the anti-apoptotic proteins BCL-2 and myeloid cell leukemia-1 (MCL-1) is increased in B-CLL cells after exposure to rhS100A9 in vitro (Figure 1E), suggesting that this could be a mechanism by which S100A9 participates in B-CLL cell survival. Additionally, higher concentrations of pro-inflammatory chemokines and cytokines such as CCL3, CCL4, IL-6, IL-8, and IL-10 were found in the supernatant of PBMCs from CLL patients upon S100A9 stimulation (Figure 1F). Even though it has been demonstrated that S100A9 can activate the NF- κ B, PI3K/AKT, and MAPK/JNK signaling pathways in inflammatory diseases(30), our results show for the first time that S100A9 promotes the phosphorylation of these signaling pathways and the release of pro-inflammatory cytokines in CLL patients.

EMMPRIN blocking prevents the S100-A9-mediated activation of pro-inflammatory pathways.

Subsequently, our goal was to assess the expression of the three main S100A9 receptors, TLR4, RAGE, and EMMPRIN, in primary B-CLL cells. Consistent with prior studies(31, 32), TLR4 expression was low in our CLL patient cohort, with no significant difference compared to age-matched healthy donors (HD) (Figure 2A). In contrast, both RAGE and EMMPRIN expression was observed in B-CLL cells compared to B cells from HD (Figure 2B-C).

RAGE primarily binds the S100A8/S100A9 heterodimer among other S100 proteins(14), while EMMPRIN exhibits a higher affinity for S100A9(33). Based on this information and our previously published findings showing that the S100A9 homodimer is present in exosomes from

the plasma of CLL patients with progressive disease(10), we decided to evaluate whether blocking EMMPRIN could prevent the S100A9-mediated activation of NF- κ B, PI3K/AKT, and MAPK/JNK signaling pathways in CLL. Thus, PBMCs from CLL patients were stimulated in vitro with rhS100A9 in the presence or absence of an anti-EMMPRIN blocking antibody. Our results demonstrate that IKK, AKT, and JNK phosphorylation levels return to basal levels when the anti-EMMPRIN is added to the culture (Figure 2D-G). Similar results are obtained when the S100A9 inhibitors, TasQ or PaQ are used (Figure 2D-G). These findings suggest that EMMPRIN plays a critical role in CLL's S100A9-mediated activation of pro-inflammatory pathways.

High-glycosylated EMMPRIN is upregulated in progressive CLL patients.

As S100A9-mediated activation of signaling pathways is exclusively observed in progressive CLL patients, we decided to explore whether the EMMPRIN expression differs in CLL patients with different clinical profiles. Analysis of EMMPRIN mRNA expression by qPCR revealed a higher EMMPRIN pattern in PBMCs from patients with unmutated (UM) immunoglobulin heavy-chain variable region (IGHV) gene compared to PBMCs from mutated (M) patients (Figure 3A). Additionally, FC data showed that EMMPRIN expression was higher in B-CLL cells from progressive CLL cases than in indolent CLL (Figure 3B).

Since the high glycosylated form of EMMPRIN (HG-EMMPRIN) has been associated with worse prognosis in several neoplasms(34), we aimed to evaluate the glycosylation pattern of this receptor in CLL patients by Western Blot. We predominantly found a protein band between the 40-60 kDa, which, by size, would correspond to the HG-EMMPRIN (Figure 3C). We treated protein lysates from CLL patients with peptide N glycosidase F (PNGase F) to confirm the composition of this glycosylation. Our results show that PNGase F effectively hydrolyzes EMMPRIN glycopeptides in CLL patients, confirming that the HG-EMMPRIN pattern predominant in CLL mainly comprises complex-type, N-linked glycans (Figure 3C). Additionally, HG-EMMPRIN was associated with the Binet clinical stage C (Figure 3D), and a higher proportion of this glycosylated form was found in progressive CLL cases compared to the indolent group (Figure 3E). As glycosylation is a post-transcriptional process tightly modulated by the tumor microenvironment (TME), we stimulated PBMCs from CLL patients with CD40L+IL-4, CpG-ODN+IL-

15, or anti-IgM. Our results show that CD40L+IL-4 increases EMMPRIN expression in the progressive group compared with the indolent counterpart, while no changes were found after stimulation with an anti-IgM or CpG-ODN+IL-15 (Figure 3F-G).

Genetic silencing of S100A9 in murine B-CLL cells delays disease progression.

To further assess the biological role of S100A9 in CLL, we employed the E μ -TCL1 transgenic mice. This murine model develops a CLL-like phenotype characterized by high white blood count and splenomegaly at 10-13 months of age(35). We observed higher expression levels of S100A9 (Figure 4A) and its receptors, EMMPRIN, RAGE, and TLR4 (Figure 4B), in B-CLL cells from E μ -TCL1 mice compared to B cells from age-matched WT mice (Figure 4A-B). Subsequently, E μ -TCL1 mice were crossed with S100A9^{-/-} mice. The E μ -TCL1/S100A9^{-/-} colony exhibited no structural abnormalities and developed a CLL-like phenotype as they aged. However, B-CLL infiltration in the spleen of the 10-month-old mice was significantly lower in the E μ -TCL1/S100A9^{-/-} group compared to E μ -TCL1 mice (Figure 4C). Likewise, longer overall survival was observed in E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mice (Figure 4D).

Given that the E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mouse model is a global knockout, and consequently, S100A9 is ablated in all murine cells, we decided to confirm that the observed more prolonged survival was dependent on the effect of S100A9 on the leukemic lymphocytes. CD19⁺CD5⁺ cells from age-matched E μ -TCL1 or E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mice were adoptively transferred into NSG mice. Our results show that B-CLL cells from E μ -TCL1 mice were detected earlier in the PB of recipient mice than S100A9-deficient B-CLL cells (Figure 4E-F). In addition, spleen size was reduced in the mice that received S100A9^{-/-} B-CLL cells (Figure 4G), and the total number of leukemic cells in the spleen and bone marrow was lower in the E μ -TCL1/S100A9^{-/-} cohort than in the E μ -TCL1 group (Figure 4H). Increased overall survival was also achieved in NSG mice bearing S100A9^{-/-} B-CLL cells compared with NSG mice that received B-CLL cells from E μ -TCL1 mice (Figure 4I).

Next, we compared the gene expression between murine S100A9^{-/-} B cells and B cells from E μ -TCL1 mice using the NanoString Mouse PanCancer Immune Profiling Panel. We found that Mapk8, Jun, and Fos, three critical genes involved in the JNK/MAPK pathway, were downregulated in S100A9-deficient B cells (Figure 4J). Additionally, 13 genes from the TNF- α

signaling via NF- κ B (Figure 4K) and 17 gene members of the IFN- γ response pathway (Supplemental figure 1A) were downregulated in S100A9-deficient B cells, according to the Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. These results align with the data found in primary CLL cells, supporting the role of S100A9 in promoting activation of the NF- κ B and MAPK signaling cascades.

Pharmacological inhibition of S100A9 prolongs survival in adoptive transfer E μ -TCL1 mice.

To evaluate the potential of S100A9 as a therapeutic target in CLL, we tested the S100A9 inhibitors, PaQ and TasQ, in the E μ -TCL1 mouse model. To perform this experiment, splenocytes from aged E μ -TCL1 mice were injected into young WT mice to establish CLL disease. Similar to S100A9-deficient B-CLL cells, PaQ-treated and TasQ-treated groups displayed a lower PB tumor burden than the vehicle group (Figure 5A). Splenomegaly (Figure 5B-C) and leukemic infiltration in the spleen (Figure 5D) were also decreased in mice that received TasQ or PaQ after four weeks of treatment, and more prolonged overall survival was observed in the PaQ and TasQ cohorts contrasted with the vehicle group (Figure 5E).

Gene expression in B cells from PaQ-treated and vehicle groups was evaluated using the NanoString Mouse PanCancer Immune Profiling Panel. Similar to S100A9^{-/-} B cells, pharmacological targeting of S100A9 decreased several genes belonging to the TNF- α signaling pathway via NF- κ B (Figure 5F-G) and IFN- γ response (Supplemental figure 1B), including genes coding for Jun and Fos transcription factors. As shown in Figure 1, stimulation of PBMCs with rhS100A9 promotes the release of cytokines and chemokines relevant to CLL pathogenesis. Interestingly, *in vivo* treatment with PaQ decreased the expression of Ccl3, Ccl4, and IL-10 in murine B cells from AT E μ -TCL1 mice (Figure 5F). These data suggest that pharmacological inhibition of S100A9 resulted in a therapeutic benefit in our murine CLL model and shifted B cells to a less inflammatory phenotype.

Tasquinimod eliminates B-CLL cells in a patient-derived xenograft model.

Because the PBMCs + activated T cell xenograft model (PDX) of CLL has shown to be a valuable technique for testing treatments in a preclinical setting(26, 36), we decided to employ this

xenograft model to evaluate the therapeutic activity of TasQ against primary human CLL cells from both mutated and unmutated IGHV CLL patients (Figure 6A). After confirming cell engraftment, mice were randomly allocated into TasQ or vehicle groups, and the treatments were administered for three weeks. Consistent with the results obtained in the E μ -TCL1 murine model, TasQ decreased splenomegaly significantly and CLL infiltration in the spleen of CLL-recipient NSG mice (Figure 6C-F). Both patients observed this responses independently of their IGHV mutational status.

DISCUSSION

Despite significant improvements in the treatment landscape of CLL with BH3 mimetics and Bruton's tyrosine kinase inhibitors (BTKi), discontinuing these therapies is frequently seen. Almost 50% of CLL patients treated with venetoclax and covalent BTKi ultimately relapse on both drugs(37). Therefore, developing new treatment strategies is an unmet need in CLL. In this study, we combined CLL patient samples and in vivo models to study the role of the S100A9 protein in CLL. Our data reveal that targeting S100A9 could become a promising therapeutic intervention for CLL patients. We demonstrated that S100A9 genetic silencing or pharmacological blocking of the interaction of this protein with its receptors delays murine CLL progression.

In addition to hindering CLL progression in our murine model, our findings illustrate the efficacy of the TasQ targeting both mutated and unmutated IGHV CLL patient subsets. A previous phase III study of TasQ in metastatic prostate cancer demonstrated that this drug leads to more prolonged progression-free survival compared to placebo(38). The therapeutic activity of TasQ in prostate cancer is attributed to targeting S100A9 in MDSCs and suppression of angiogenesis by binding histone deacetylase 4 (HDAC4)(39). However, HDAC4 is not expressed in B-CLL cells(40) (Supplemental figure 2), suggests that the in vivo effect of TasQ in CLL is mainly mediated by targeting S100A9.

S100A9 participates in cytoskeleton rearrangement and migration of myeloid cells, and it is released during inflammation(30). Our data suggest that the deleterious activity of S100A9 in CLL is probably mediated by its extracellular function. Stimulation of primary CLL cells with rhS100A9 promoted phosphorylation of critical proteins in the NF- κ B, PI3K/AKT, and

MAPK/JNK signaling pathways in CLL patient samples. However, this is not the case for our murine *ex vivo* experiments. Human and murine studies often yield divergent results due to fundamental biological differences, including variations in gene expression, receptor profiles, and immune system composition. In this context, the differential responses observed between human and murine CLL cells can be attributed to species-specific disparities. For example, TLR4, one of the putative S100A9 receptors, is clearly overexpressed in CLL-like murine cells, whereas very low expression levels were described in human CLL cells (41). These intrinsic differences highlight the challenges of directly translating findings from murine models to human systems.

Additionally, increased expression of JUN and FOS were observed in human samples. Interestingly, these two transcription actors were among the lower-fold downregulated genes in S100A9-deficient murine B-CLL cells and B-cells from mice treated with PaQ. Increased activity of the AP-1 transcription network, including JUN and FOS, is linked to inflammatory disorders and cancer development by regulating cell proliferation, migration, and production of inflammatory cytokines(27).

In addition to activating pro-inflammatory pathways, S100A9 induced CCL3, CCL4, IL-6, and IL-10 release by PBMCs from CLL patients. Elevated levels of CCL3, IL-6, or IL-10 in the plasma of individuals with CLL are independent poor prognostic factors for this disease(42, 43). Autocrine IL-6 promotes B-CLL cell survival by activating STAT3 and NF- κ B signaling cascades(4); CCL3, CCL4, and IL-10 contribute significantly to CLL pathogenesis by modulating the TME. For instance, IL-10 suppresses the T-cell mediated anti-tumor immune response(44), whereas CCL3 and CCL4 may induce the trafficking of supportive cells to secondary lymphoid tissues to sustain CLL proliferation(45, 46). Our observation that S100A9 promotes cytokine release in CLL was further supported by mouse data showing that B cells from PaQ-treated mice have lower expression of CCL3 and CCL4. Additionally, both genetic and pharmacological targeting of S100A9 reduced IL-10 expression in murine B cells.

S100A9 is a ligand for several receptors, including TLR4, RAGE, and EMMPRIN. Higher expression of RAGE and EMMPRIN were found in both murine and primary human B-CLL cells, while TLR4 was only upregulated in mice. High EMMPRIN expression was associated with unmutated IGHV and advanced Binet stage C. This receptor upregulation was also induced by

CD40L+IL-4 signal mimicking the CLL TME. However, further studies are needed to determine whether and how S100A9 and its receptors participate in the crosstalk between CLL cells and the TME. Lastly, disruption of the S100A9/EMMPRIN interaction prevented the S100A9-mediated activation of signaling cascades in B-CLL cells. Although this result underscores the importance of the S100A9/EMMPRIN axis in CLL, the role of other S100A9 receptors should be explored. This study is the first to report that S100A9 inhibitors effectively control CLL progression and shape B-CLL cells to a less inflammatory phenotype. Targeting inflammation has been a central interest in CLL for decades. High-dose methylprednisolone, in combination with chemoimmunotherapy, was one of the mainstay therapies for patients with relapsed CLL for many years(47). However, glucocorticoids are limited because of their toxic adverse effects and resistance(47). Therefore, identifying targetable pro-inflammatory proteins associated with disease progression could provide a new approach to decreasing the deleterious chronic inflammation seen in CLL patients. Based on our pre-clinical data, the promising clinical outcomes observed in other neoplasms, and their safety profile, we firmly believe oral S100A9 inhibitors hold a potential therapeutic opportunity in CLL. Further clinical exploration should be pursued, either alone or in combination with other targeted therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CLL patients who participated in this study and Drs. Mercedes Lassus, Raul Gabus, and Cecilia Guillermo for their clinical assistance. They acknowledge the Flow Cytometry, Molecular Genomics, and Comparative Medicine Cores at Moffitt Cancer Center (P30-CA076292) and the Cell Biology and Protein Engineering Units at Institut Pasteur de Montevideo, including Dr. Agustin Correa. Special thanks to Tiffany Razabdouski for technical support. This work was funded by grants FSGSK_1_2017_1_146663, FCE_1_2021_1_166493 (PO), FMV_3_2022_1_172460 (MEM), FOCEM (COF 03/11), and ANII (PEC_3_2019_1_158811). The authors also thank Mr. Ferioli for his generous financial support.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.U.-P., M.E.M., and E.P. designed and conducted research, analyzed and interpreted data, and

wrote the manuscript; M.M.-V., G.M., K.M., W.G., J.P., and S.S. conducted research; E.E. edited the manuscript; C.O. conducted technical activities; F.P. and J.Q. contributed to interpretation of Flow cytometry results; R.U. collected CLL samples and performed technical activities; J .C , G.D.S., C.O., and A.I.L. performed clinical activities and data collection for CLL patients; and E.S., P.O. and J.P.-I., conceived and designed research, interpreted data, and edited the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing conflict of interest.

1. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol.* 2021;96(12):1679-705.
2. Mato AR, Davids MS, Sharman J, Roeker LE, Kay N, Kater AP, et al. Recognizing Unmet Need in the Era of Targeted Therapy for CLL/SLL: "What's Past Is Prologue" (Shakespeare). *Clin Cancer Res.* 2022;28(4):603-8.
3. Yan XJ, Dozmorov I, Li W, Yancopoulos S, Sison C, Centola M, et al. Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(19):5201-10.
4. Wang HQ, Jia L, Li YT, Farren T, Agrawal SG, Liu FT. Increased autocrine interleukin-6 production is significantly associated with worse clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):13994-4006.
5. Khodashenas M, Rajabian A, Attaranzadeh A, Lavi Arab F, Allahyari N, Allahyari A. Evaluation of cytokine levels as possible predicting elements in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2022;68(10):1364-8.
6. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol.* 2000;164(4):2200-6.
7. O'Donnell A, Pepper C, Mitchell S, Pepper A. NF-kB and the CLL microenvironment. *Front Oncol.* 2023;13:1169397.
8. Okkenhaug K, Burger JA. PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;393:123-42.
9. Shukla A, Shukla V, Joshi SS. Regulation of MAPK signaling and implications in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2018;59(7):1565-73.
10. Prieto D, Sotelo N, Seija N, Sernbo S, Abreu C, Durán R, et al. S100A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF-κB activity during disease progression. *Blood.* 2017;130(6):777-88.
11. Chen Y, Ouyang Y, Li Z, Wang X, Ma J. S100A8 and S100A9 in Cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2023;1878(3):188891.
12. Cheng P, Corzo CA, Lueteteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205(10):2235-49.
13. Huang M, Wu R, Chen L, Peng Q, Li S, Zhang Y, et al. S100A9 Regulates MDSCs-Mediated Immune Suppression via the RAGE and TLR4 Signaling Pathways in Colorectal Carcinoma. *Front Immunol.* 2019;10:2243.
14. Zhou H, Zhao C, Shao R, Xu Y, Zhao W. The functions and regulatory pathways of S100A8/A9 and its receptors in cancers. *Front Pharmacol.* 2023;14:1187741.
15. Zhang X, Niu M, Li T, Wu Y, Gao J, Yi M, et al. S100A8/A9 as a risk factor for breast cancer negatively regulated by DACH1. *Biomark Res.* 2023;11(1):106.
16. Jiang Y, Wang Q, Xu Q, Zhang S, Cao L. Predictive value of S100A9 for lymph node metastasis in cervical cancer. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2020;45(6):701-8.
17. Zhao Z, Zhang C, Zhao Q. S100A9 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in human gastric cancer. *Scand J Gastroenterol.* 2020;55(3):338-46.

18. Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, Zhang L, Djeu J, Fortenbery N, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4595-611.
19. Karjalainen R, Liu M, Kumar A, He L, Malani D, Parsons A, et al. Elevated expression of S100A8 and S100A9 correlates with resistance to the BCL-2 inhibitor venetoclax in AML. *Leukemia*. 2019;33(10):2548-53.
20. Fan R, Satilmis H, Vandewalle N, Verheye E, De Bruyne E, Menu E, et al. Targeting S100A9 protein affects mTOR-ER stress signaling and increases venetoclax sensitivity in Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer J*. 2023;13(1):188.
21. Meng L, Tang Q, Zhao J, Wang Z, Wei L, Wei Q, et al. S100A9 Derived From Myeloma Associated Myeloid Cells Promotes TNFSF13B/TNFRSF13B-Dependent Proliferation and Survival of Myeloma Cells. *Front Oncol*. 2021;11:691705.
22. Lin C, Garcia-Gerique L, Bonner EE, Mastio J, Rosenwasser M, Cruz Z, et al. S100A8/S100A9 Promote Progression of Multiple Myeloma via Expansion of Megakaryocytes. *Cancer Res Commun*. 2023;3(3):420-30.
23. Björk P, Björk A, Vogl T, Stenström M, Liberg D, Olsson A, et al. Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. *PLoS Biol*. 2009;7(4):e97.
24. Fan R, Satilmis H, Vandewalle N, Verheye E, Vlummens P, Maes A, et al. Tasquinimod suppresses tumor cell growth and bone resorption by targeting immunosuppressive myeloid cells and inhibiting c-MYC expression in multiple myeloma. *J Immunother Cancer*. 2023;11(1).
25. Marquez ME, Sernbo S, Payque E, Uria R, Tosar JP, Querol J, et al. TGF- β /SMAD Pathway Is Modulated by miR-26b-5p: Another Piece in the Puzzle of Chronic Lymphocytic Leukemia Progression. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7).

26. Patten PEM, Ferrer G, Chen SS, Kolitz JE, Rai KR, Allen SL, et al. A Detailed Analysis of Parameters Supporting the Engraftment and Growth of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in Immune-Deficient Mice. *Front Immunol.* 2021;12:627020.
27. Bhosale PB, Kim HH, Abusaliya A, Vetrivel P, Ha SE, Park MY, et al. Structural and Functional Properties of Activator Protein-1 in Cancer and Inflammation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022;2022:9797929.
28. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, Keller SA, Cesarman E, Liou HC, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood.* 2001;98(10):3050-7.
29. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, Marietti S, Chiusolo P, Sica S, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2005;105(12):4820-7.
30. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol.* 2018;9:1298.
31. Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1):e2012055.
32. Rybka J, Butrym A, Wróbel T, Jaźwiec B, Bogucka-Fedorczuk A, Poręba R, et al. The Expression of Toll-Like Receptors in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(Suppl 1):147-50.
33. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, et al. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(1):172-83.
34. Bai Y, Huang W, Ma LT, Jiang JL, Chen ZN. Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6356-77.
35. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(10):6955-60.
36. Chen SS, Barrientos JC, Ferrer G, King-Richards M, Chen YJ, Ravichandran P, et al. Duvelisib Eliminates CLL B Cells, Impairs CLL-Supporting Cells, and Overcomes Ibrutinib Resistance in a Xenograft Model. *Clin Cancer Res.* 2023;29(10):1984-95.
37. Zygmunciak P, Robak T, Puła B. Treatment of Double-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia-An Unmet Clinical Need. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3).
38. Sternberg C, Armstrong A, Pili R, Ng S, Huddart R, Agarwal N, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study of Tasquinimod in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(22):2636-43.
39. Gupta N, Al Ustwani O, Shen L, Pili R. Mechanism of action and clinical activity of tasquinimod in castrate-resistant prostate cancer. *Onco Targets Ther.* 2014;7:223-34.
40. Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, Mineur P, Bron D, Lagneaux L, et al. HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics.* 2012;7(12):1403-12.
41. Muzio M, Scielzo C, Bertilaccio MT, Frenquelli M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* 2009;144(4):507-516.
42. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, O'Brien S, Lee BN, Lerner S, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood.* 2001;97(1):256-63.
43. Sivina M, Hartmann E, Kipps TJ, Rassenti L, Krupnik D, Lerner S, et al. CCL3 (MIP-1 α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;117(5):1662-9.
44. Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J Immunol.* 2018;200(12):4180-9.
45. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, Bürkle A, Wierda WG, Keating MJ, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood.* 2009;113(13):3050-8.
46. Davids MS, Burger JA. Cell Trafficking in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Open J Hematol.* 2012;3(S1).
47. Scheijen B. Molecular mechanisms contributing to glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies. *Cancer Drug Resist.* 2019;2(3):647-64.

Figure 1. S100A9 promotes the activation of pro-inflammatory pathways in primary B-CLL cells in patients with progressive disease. CLL PBMCs were incubated with and without recombinant human S100A9 for 72 hours and several parameters were assessed. A-C) Phosphorylation levels of AKT1 (Ser473 and Thr308), IKK (Ser176/180), and JNK (Thr183/185) were measured in CD19+CD5+ cells by flow cytometry. D) JUN and FOS mRNA expression was assessed by quantitative PCR. E) Anti-apoptotic proteins MCL-1 and BCL-2 expression in CD19+CD5+ were also evaluated by flow cytometry. F) A multiplex cytokine assay was performed in PBMCs from CLL patients after S100A9 in vitro stimulation for 24 hours. ****p<0.0001, ***p<0.001 **p<0.005, *p<0.05., (paired t-test).

Figure 2. EMMPRIN blocking prevents the S100A9-mediated activation of pro-inflammatory pathways. A-C) Expression levels of the S100A9 receptors TLR4, RAGE and EMMPRIN were compared between B cells from healthy donors (HD) and CD19+CD5+ cells from CLL patients using flow cytometry. D-G) CLL PBMCs were stimulated with rhS100A9 and treated with S100A9 inhibitors (Tasquinimod 10µM or Paquinimod 10µM) or EMMPRIN blocking antibody for 72 hours. Phospho-AKT1^(Ser473 and Thr308), Phospho-IKK^(Ser176/180) and Phospho-JNK^(Thr183/185) were assessed in CD19+CD5+ cells by flow cytometry. Cells without rhS100A9 stimulation were used as control. ****p<0.0001, ***p<0.001 **p<0.005, *p<0.05., (A-C unpaired t-test, D-G paired t-test).

Figure 3. High-glycosylated EMMPRIN is upregulated in progressive CLL patients. A) EMMPRIN mRNA expression levels were quantified by qPCR in HD, mutated IGHV, and unmutated IGHV CLL patients. B) EMMPRIN protein levels in B-CLL cells of progressive and indolent patients were assessed by flow cytometry. Relative expression of percent positive cells and median fluorescence intensity (MFI) analysis demonstrated higher levels of EMMPRIN in B-CLL cells of progressive patients compared to indolent patients. C) CLL PBMC protein lysates were treated with PNGase F, and EMMPRIN expression was analyzed by western blot. GAPDH detection (bottom panel) was performed as loading control. The High (HG) and Low (LG) glycosylated forms are visible in the untreated samples. The protein core is exposed after PNGase F treatment, confirming N-type glycosylation. D) EMMPRIN protein levels were compared between patients

with different Binet stages E) Representative blot of EMMPRIN in progressive and indolent CLL patients, and relative protein expression was normalized to GAPDH. F) Representative western blot of EMMPRIN expression in one progressive and one indolent CLL patient after PBMCs stimulation with IgM, CPG+IL15, and CD40L+IL4. G) Flow cytometry analysis of EMMPRIN expression Upon stimulation with IgM, CPG+IL15 and CD40L+IL4 (n=10, per group). ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.005, *p<0.05. (A-E unpaired t-test, G paired t-test).

Figure 4. Genetic silencing of S100A9 in murine B-CLL cells delays disease progression. A-B) Splenocytes from 10 12-month-old E μ -TCL1 or C57BL6 mice were employed to evaluate S100A9, EMMPRIN, RAGE and TLR4 expression in CD19+CD5+ leukemic lymphocytes, and CD19+CD5-normal murine B cells. C) We created a novel E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mouse model, and leukemic infiltration of CD19+CD5+ cells in the spleen of 10-month-old mice was compared between E μ -TCL1 and the E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mice. D) Aged E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mice show longer survival than the aged E μ -TCL1 mouse model. E-K) CD19+/CD5+ B cells isolated from E μ -TCL1 or E μ -TCL1/S100A9^{-/-} mice were transferred via tail vein injection into NSG mice. E-F) The tumor burden in PB was assessed weekly, the percentage of CD19+CD5+ cells, as well as the absolute count of B-CLL cells, was measured by flow cytometry. G) Spleen size from both groups after 5 weeks of adoptive transfer. H) Malignant B cell infiltration in the spleen and BM at week 5 post-adoptive transfer. I) Longer survival was observed in the E μ -TCL1/S100A9^{-/-} group (n: 4) compared to the E μ -TCL1 recipient mice (n:5). J) B cells were isolated from NSG mice after 5 weeks of AT, then the mRNA was used for NanoString analysis. Volcano plot showing upregulated (red) and downregulated (blue) genes in S100A9^{-/-} B cells versus B cells from NSG adoptive transfer E μ -TCL1 mice. K) Downregulated genes in S100A9^{-/-} B cells relative to B cells from NSG adoptive transfer E μ -TCL1 mice belonging to the TNF- α via NF- κ B from the MSig data base Hallmark genes. ****p<0.0001, ***p<0.001 **p<0.005, *p<0.05.

Figure 5. Pharmacological inhibition of S100A9 prolongs survival in adoptive transfer E μ -TCL1 mice. Splenocytes from E μ -TCL1 mice were transferred via tail vein injection into C57BL/6 mice, PaQ and TasQ were administered at 25 mg/kg in drinking water for 4 weeks. A) Tumor burden assessment in the PB using flow cytometry. B) Representative picture of the three mice groups after 4 weeks of treatment. C-D) Spleen weight and eight infiltration after 4 weeks of treatment.

Mice treated with PaQ or TasQ show a longer survival compared with the control group. F) Volcano plot showing differential gene expression in B cells from PaQ versus vehicle using NanoString PanCancer Immune Profiling panel. G) Downregulated genes in PaQ-treated B cells relative to B cells from vehicle recipient mice belonging to the TNF- α via NF- κ B from the MSig data base Hallmark genes. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

Figure 6. Tasquinimod eliminates B-CLL cells in a patient-derived xenograft model. A) Clinical information of patient samples from the two donors used in this experiment. B) Schematic representation of the experiment design, created with BioRender.com C-D) Representative spleen pictures and flow cytometry dot-plots after 3 weeks of treatment E-F) Spleen weight and absolute count of splenic B cells at week 3 post-treatment. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$ (Paired t-test)

Supplemental Figure 1. IFN- γ response pathway. A. Downregulated genes in S100-A9^{-/-} B cells relative to B cells from NSG adoptive transfer E μ -TCL1 mice belonging to the IFN- γ response pathway from the MSig database Hallmark genes. B) Downregulated genes in PaQ-treated B cells relative to B cells from vehicle recipient mice belonging to the IFN- γ response pathway from the MSig database Hallmark genes.

Supplemental Figure 2. HDAC4 expression in CLL. B cells were isolated from two CLL patients and one HD. The Jurkat Cell line was used as a positive control.

Table 1. Clinical and Molecular Characterization of patients with CLL.

Patient	Age	Sex	Binet stage	LBC (cells/uL)	IGHV status	AID	IGHV rearrangement	Clinical disease status
1	79	M	A	31000	M	(-)	VH3-21*01	Indolent
2	61	F	A	42620	M	(-)	VH4-34*01 y *02	Indolent
3	55	F	A	22900	M	(-)	VH5-51*01	Indolent
4	50	M	A	40000	M	(-)	VH4-34*01	Indolent
5	61	M	A	42700	M	(+)	VH4-59*01	Indolent
6	67	F	A	21570	M	(-)	VH3-33*01	Indolent
7	79	F	A	22520	M	(-)	VH3-48*03	Indolent
8	54	M	B	30060	M	(-)	VH3-7*01	Indolent
9	49	F	A	57000	M	(-)	VH2-05*02	Indolent
10	76	M	A	28680	M (IgG)	(-)	VH4-34*02	Indolent
11	71	M	A	35700	UM	(-)	VH1-3*01	Indolent
12	55	M	A	14400	M	(-)	VH3-23*01	Indolent
13	55	F	A	16000	M	(-)	VH4-34*01	Indolent
14	74	M	A	16580	M	(-)	VH1-2*02	Indolent
15	72	M	A	22100	M	(-)	VH2-5*02	Indolent
16	62	M	C	170000	UM	(-)	VH1-18*01	Progressive
17	63	M	B	86000	UM	(+)	VH3-30*18	Progressive
18	79	M	C/IV	213300	M	(+)	VH3-48*04	Progressive
19	52	M	C	421000	UM	(+)	VH1-69*01	Progressive
20	57	M	B	59000	UM	(+)	VH3-74*01	Progressive
21	69	M	C	6816	UM	(-)	VH3-21*01	Progressive
22	77	M	B	137780	M	(+)	VH3-23*01	Progressive
23	33	M	C	400000	UM (IgG)	(+)	VH4-39	Progressive
24	51	M	C	120000	UM	(-)	VH1-69*12	Progressive
25	74	M	c	303000	UM	(-)	V4-39*01	Progressive
26	63	F	C	102400	UM	(+)	VH4-61*02	Progressive
27	50	M	C	143630	M	(+)	VH3-7*01	Progressive
28	59	M	C	85460	M	(-)	VH2-5	Progressive
29	63	M	IB	31980	UM	(+)	VH1-2*02	Progressive
30	61	M	C	215800	UM	(+)	VH1-69*13	Progressive

AID, activation-induced cytidine deaminase; LBC, lymphocyte blood count; M, mutated; UM, unmutated.

Figure 1

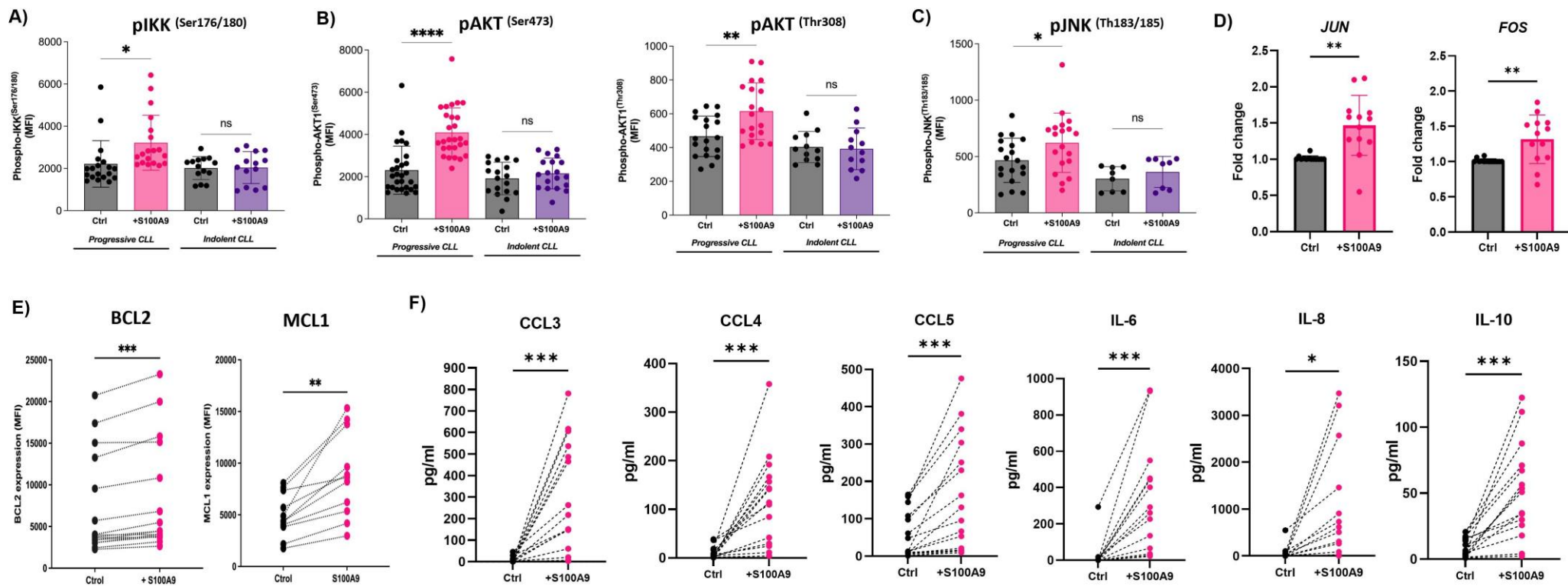


Figure 2

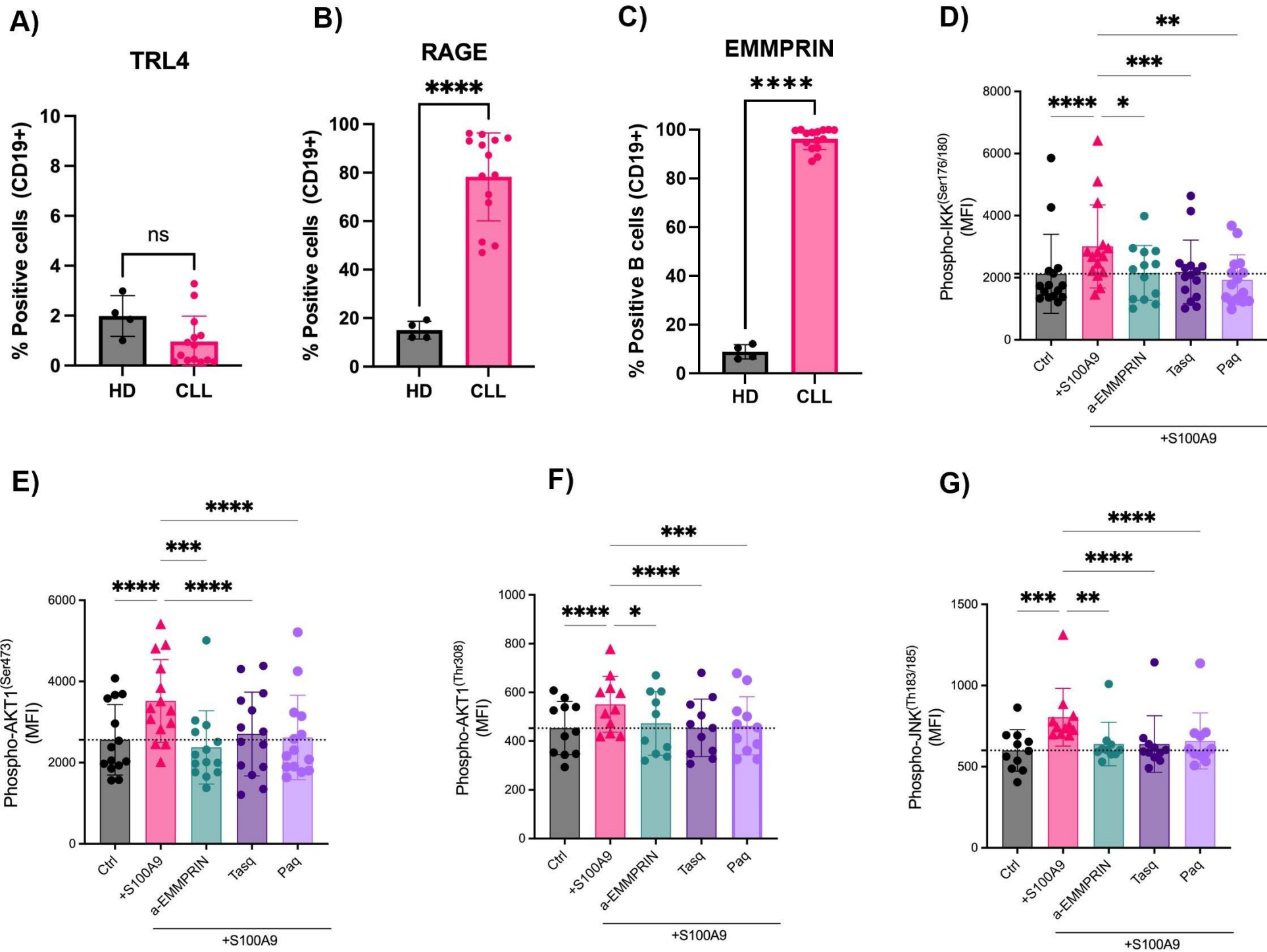


Figure 3

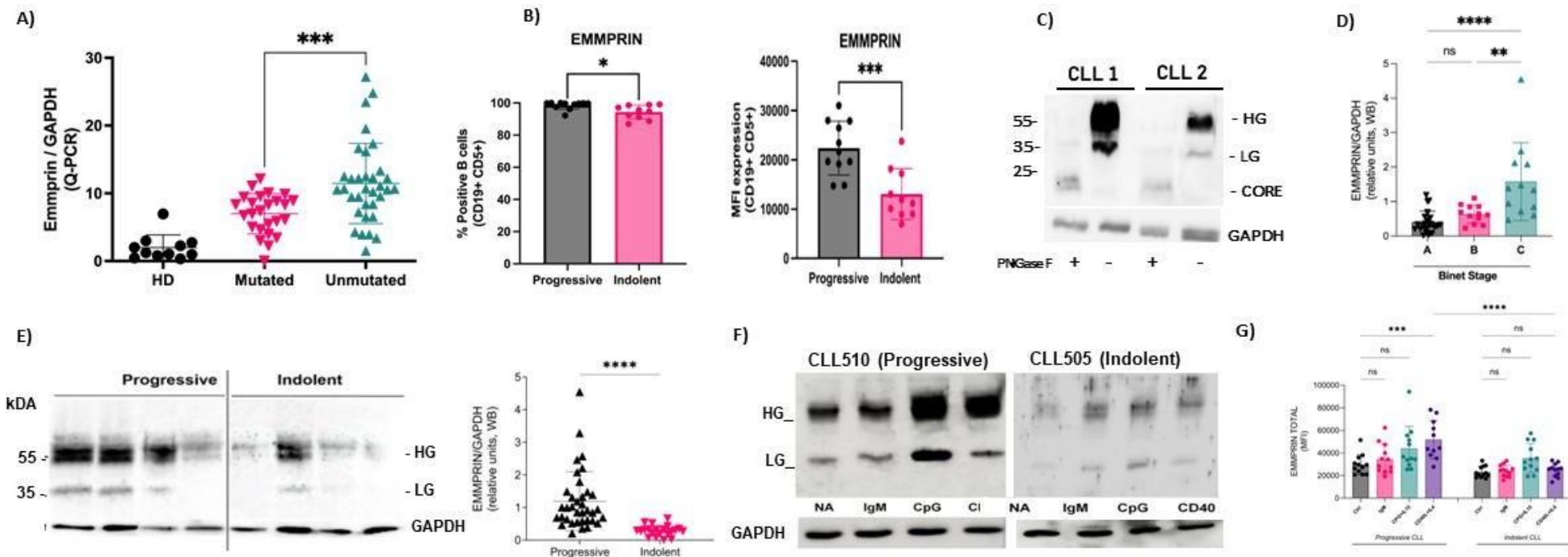


Figure 4

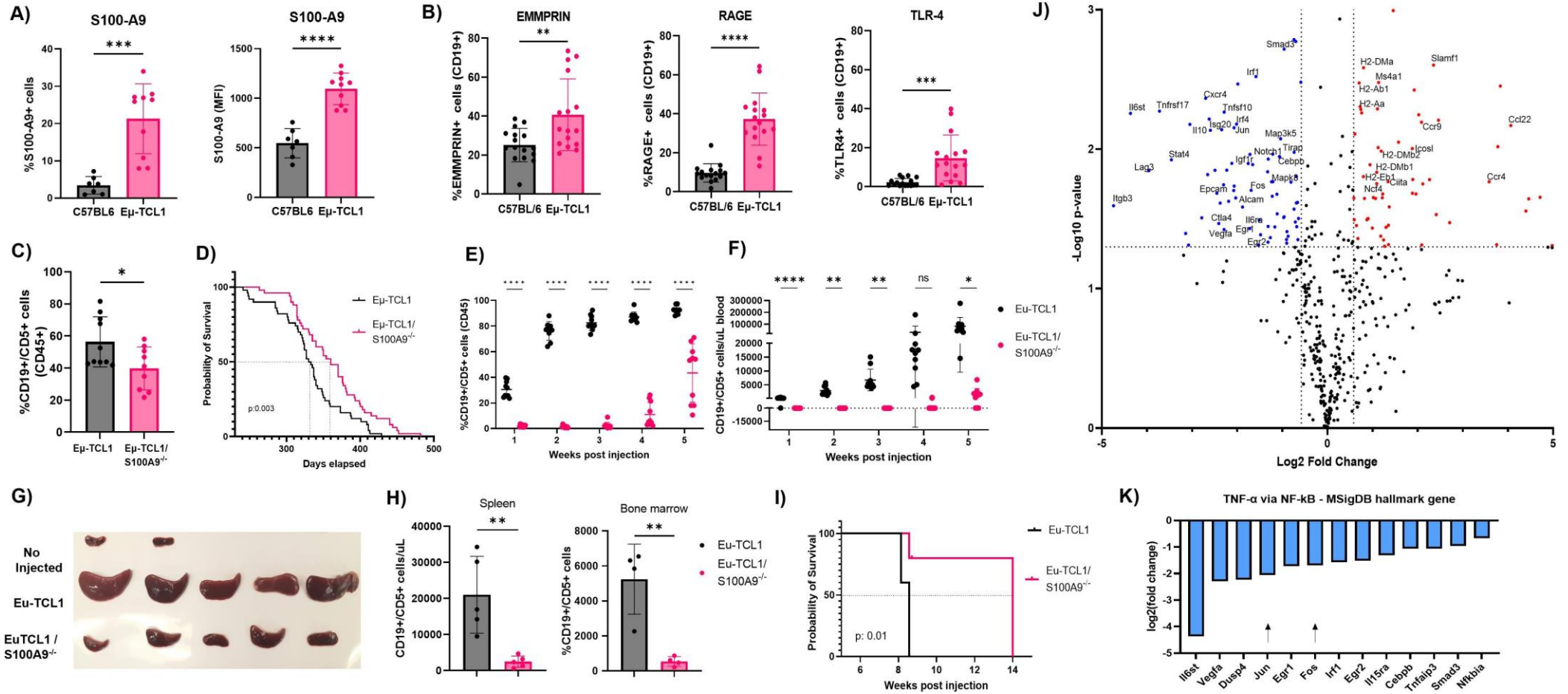


Figure 5

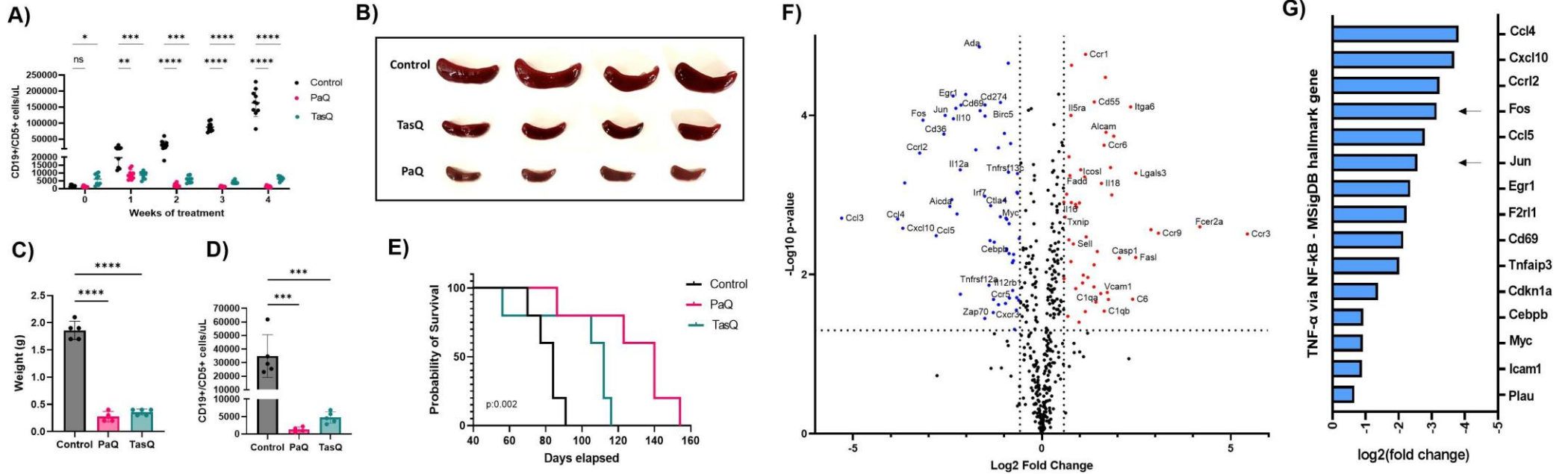
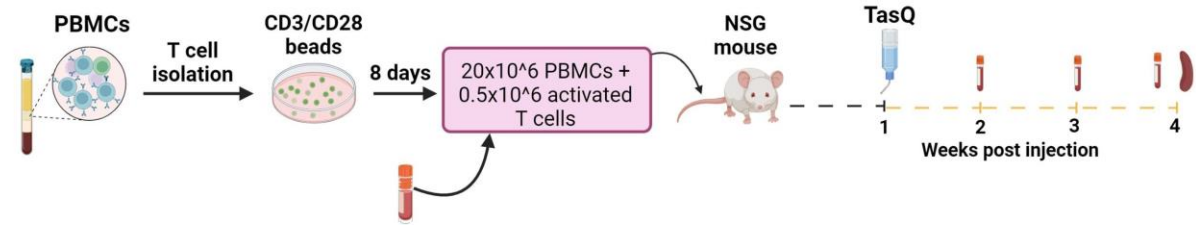


Figure 6. Tasquinimod eliminates B-CLL cells in a patient-derived xenograft model.

A)

Patient	WBC	IGHV	FISH	Treatment
1	173x10 ⁹ /L	M	Normal	Naïve
2	421x10 ⁹ /L	UM	Normal	Naïve

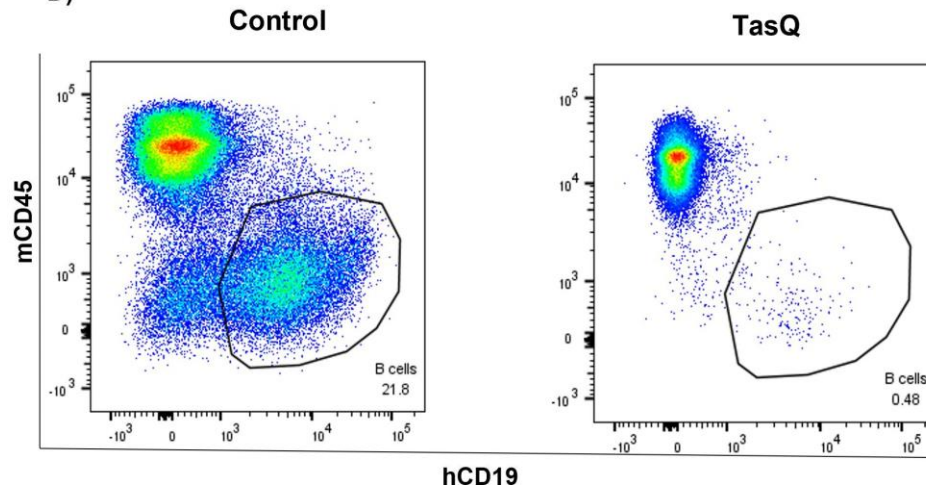
B)



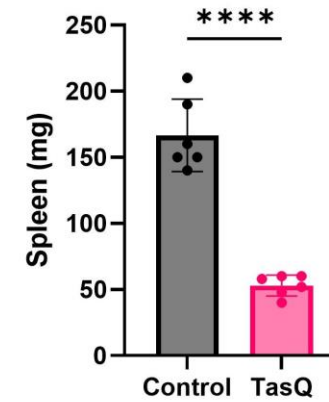
C)



D)



E)



F)

