

## Informe final publicable de proyecto

# Implicancias de la proteína pro-inflamatoria S100A9 en la progresión de la Leucemia Linfoides Crónica: hacia el desarrollo de un nuevo blanco terapéutico-Estudio iniciado por el investigador-GURULLC 2

Código de proyecto ANII: FMV\_3\_2022\_1\_172460

Fecha de cierre de proyecto: 01/05/2025

**MARQUEZ, María Elena** (Responsable Técnico - Científico)

**DOS SANTOS D ANGELO, María Gimena** (Investigador)

**GUILLERMO ESPOSITO, María Cecilia** (Investigador)

**OPIOLO DE ARTEAGA, Patricia Noelia** (Investigador)

**OPPEZZO, Pablo** (Investigador)

---

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. HOSPITAL DE CLÍNICAS \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

## Resumen del proyecto

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es una neoplasia de células B caracterizada por su acumulación en sangre periférica, médula ósea y órganos linfoides. A pesar de los avances logrados con terapias dirigidas, continúa siendo un desafío clínico, ya que muchos pacientes desarrollan resistencia o recaídas. La inflamación crónica y la interacción con el microambiente tumoral juegan un rol clave en la progresión de la enfermedad. Nuestro grupo describió previamente niveles elevados de la proteína proinflamatoria S100A9 en microvesículas secretadas por células B leucémicas de pacientes con mal pronóstico, así como una alta expresión de su receptor EMMPRIN. Este proyecto explora el papel del eje S100A9/EMMPrin en la progresión tumoral de la LLC. Demostramos que EMMPrin está sobreexpresado en células B leucémicas, especialmente en pacientes progresores, y presenta una forma altamente glicosilada asociada a mal pronóstico. La interacción de células B leucémicas de pacientes con S100A9 activa vías de señalización como PI3K/AKT, NF-?B y MAPK/JNK, promoviendo la expresión de genes antiapoptóticos (MCL-1, BCL-2), reguladores del ciclo celular (p-Rb1, p27), quimiocinas (CCL3, CCL4) y metaloproteínas (MMP2, MMP9), que favorecen la migración tumoral y la comunicación con el microambiente. La inhibición de S100A9 con compuestos específicos, así como el bloqueo de EMMPrin, redujo la activación de estas vías. Para evaluar la relevancia in vivo del eje S100A9/EMMPrin, se realizaron experimentos utilizando el modelo murino E?-TCL1, que emula la LLC. Se generó un nuevo modelo doble transgénico donde se eliminó el gen S100A9 (E?-TCL1/S100A9-/-), que mostró menor progresión leucémica, menor esplenomegalia e infiltración tisular, y mayor supervivencia. Resultados similares se observaron en ratones E?-TCL1 tratados con inhibidores de S100A9 (Tasquinimod y Paquinimod). En conjunto, estos resultados evidencian que el eje S100A9/EMMPrin cumple un rol relevante en la fisiopatología de la LLC, promoviendo su progresión y respalda su inhibición como una estrategia terapéutica prometedora para el desarrollo de nuevas terapias.

**Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Inmunología / Hematología**

**Palabras clave:** LLC / S100A9 / progresión /

### Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La leucemia linfocítica crónica LLC se caracteriza por la acumulación progresiva de linfocitos B maduros CD19+CD5+ en la sangre periférica, médula ósea y tejidos linfoides secundarios. Si bien las terapias dirigidas han mejorado significativamente la respuesta clínica de muchos pacientes, la resistencia al tratamiento y la recaída siguen siendo desafíos importantes. En este contexto, es esencial comprender los mecanismos biológicos subyacentes que impulsan la progresión de la enfermedad para diseñar estrategias terapéuticas más efectivas.

La inflamación crónica desempeña un papel central en la fisiopatología de la LLC. Se ha observado una activación excesiva de respuestas inflamatorias junto con una eliminación inmune ineficaz. Los niveles elevados de citoquinas inflamatorias en el plasma de pacientes con LLC respaldan esta observación. Además, la estimulación del receptor de células B (BCR) y CD40 activa vías de señalización intracelular que promueven la supervivencia y proliferación de los linfocitos leucémicos.

Nuestro grupo ha reportado anteriormente que los linfocitos B de pacientes con LLC liberan exosomas que contienen la proteína proinflamatoria S100A9 exclusivamente durante la progresión de la enfermedad, lo que se correlaciona con la activación de NF-?B. La proteína S100A9, un patrón molecular asociado a daño (DAMP), está implicada en la inflamación de enfermedades autoinmunes y en distintos tipos de cáncer, donde actúa como un potente mediador inflamatorio. Esta proteína también regula la respuesta inmune antitumoral al influir en la generación y función de las células supresoras derivadas de la médula ósea (MDSCs).

S100A9 ejerce sus efectos a través de varios receptores, incluidos TLR4 (receptor tipo Toll 4), RAGE (receptor para productos finales de glicación avanzada) y EMMPrin (inductor de metaloproteínas de la matriz extracelular).

S100A9 ha sido identificado como un marcador de mal pronóstico en varios tumores sólidos, donde participa en procesos de invasión, metástasis y evasión inmune. En enfermedades hematológicas, su expresión está aumentada en síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple, y se asocia con resistencia terapéutica y progresión tumoral.

En este contexto, el estudio del papel de S100A9 en la LLC se vuelve altamente relevante, no solo para entender la biología de la enfermedad, sino también para explorar nuevas oportunidades terapéuticas. Nuestra hipótesis es que S100A9 contribuye activamente a la progresión de la LLC a través de la activación de vías inflamatorias intracelulares y la regulación del microambiente inmunológico, y que su inhibición puede revertir este proceso.

### Metodología/Diseño del estudio

#### Pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC):

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LLC según los criterios establecidos por el International Workshop on CLL. Los pacientes se clasificaron en dos grupos:

- Grupo indolente: estadio Binet A, tiempo de duplicación linfocitaria >1 año, sin necesidad de tratamiento en los 5 años siguientes y expresión negativa de AID o LPL por RT-PCR.
- Grupo progresivo: estadio Binet B o C, tiempo de duplicación linfocitaria <6 meses, necesidad de tratamiento dentro de 5 años o muerte relacionada a LLC, y expresión positiva de AID o LPL.

Todos los procedimientos fueron aprobados por los comités éticos correspondientes, y los participantes firmaron un consentimiento informado conforme a la Declaración de Helsinki.

#### Estimulación in vitro de células LLC primarias:

Las PBMCs de pacientes con LLC se cultivaron en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino inactivado y antibióticos. Se expusieron durante 72 horas a S100A9 recombinante humano (rhS100A9, 10 µg/mL). Se utilizaron los inhibidores Tasquinimod (TasQ, 10uM), Paquinimod (PaQ, 10uM) y un anticuerpo bloqueante (10 µg/mL) contra EMMPRIN para estudiar sus efectos en la fosforilación de proteínas de las vías de señalización de NF-?B, PI3K/AKT y MAPK.

Además, se estimuló la expresión de EMMPRIN en las PBMCs con:

- CpG-ODN (2 µM) + IL-15 (15 ng/mL) o anti-IgM (20 µg/mL) por 48 h
- CD40L (1 µg/mL) + IL-4 (5 ng/mL) durante 6 días

Las células no estimuladas se utilizaron como controles.

#### Citometría de flujo:

Se realizó inmunofenotipificación por citometría de flujo multiparamétrica. Las células se tiñeron con colorante de viabilidad y anticuerpos específicos de superficie. Para proteínas intracelulares, se utilizó el kit de permeabilización Cyto-Fast/Perm.

La adquisición de datos se realizó en el citómetro Attune NxT, y el análisis se hizo con el software FlowJo v10.8.1. Se usaron controles FMO e isotipos.

#### Ensayo multiplex de citoquinas:

Se cultivaron PBMCs de pacientes con LLC con 10 ?g/mL de rhS100A9 durante 24 horas. Se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron mediante el kit Bio-Plex Pro Human Immunotherapy Panel, utilizando el sistema xMAP INTELLIFLEX y el software de análisis ProcartaPlex.

#### Análisis de expresión génica por qPCR:

Se extrajo ARN total de PBMCs de LLC usando Trizol, seguido de la síntesis de cDNA con transcriptasa reversa M-MLV y el inhibidor RNAsin. Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron con SYBR Green y GAPDH como control endógeno. Se usó el sistema QuantStudio 3 para la amplificación.

#### Análisis de expresión de EMMPRIN por Western blot:

Se lisaron las PBMCs con buffer RIPA. Se midió la concentración proteica mediante el método de ácido bicinconílico (BCA). Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con leche descremada al 5%.

Las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-EMMPIN conjugado a HRP. La detección se realizó por quimioluminiscencia y análisis con el sistema ImageQuant 800. La expresión relativa se normalizó a GAPDH y se cuantificó con ImageJ.

#### Modelo murino doble transgénico E?-TCL1/S100A9?/?:

Se cruzaron ratones E?-TCL1 con ratones S100A9 knockout para generar un nuevo modelo murino doble transgénico. A los 10-12 meses de edad, se recolectaron esplenocitos de ambos grupos. Las células B-LLC (CD19?CD5?) se purificaron por separación magnética en dos etapas y se inyectaron por vía intravenosa (cola) en ratones inmunodeficientes NSG (NOD/SCID/IL2r?null), utilizando 5 x 10? células por ratón. Se monitoreó la enfermedad por citometría en sangre periférica.

#### Modelo de transferencia adoptiva:

Se transfirieron 10 x 10? esplenocitos de ratones E?-TCL1 envejecidos en ratones C57BL/6 jóvenes (6-8 semanas). Se inició el tratamiento cuando las células leucémicas representaban ?30% de las células CD45? en sangre. El tratamiento se realizó de la manera siguiente: tanto TasQ como PaQ se disolvieron a 25 mg/kg en agua destilada con 2% de hidroxipropil-beta-ciclodextrina y se administraron por vía oral ad libitum durante 3-4 semanas. Se evaluó la supervivencia o se realizó eutanasia para analizar la infiltración esplénica.

#### Modelo PDX (xenoinjerto derivado de pacientes):

Se aislaron células T CD3? de PBMCs criopreservadas de pacientes con LLC mediante microesferas magnéticas. Se activaron durante 8 días con CD3/CD28 e IL-2. Luego, se mezclaron con PBMCs LLC descongeladas en proporción 1:40 y se inyectaron (20 x 10? células) en ratones NSG. Se confirmó el prendimiento mediante citometría y se asignaron aleatoriamente a grupos con TasQ o vehículo por 3 semanas.

#### Ánalisis estadístico:

Se utilizó el software GraphPad v10.1.2. Para comparaciones entre dos grupos se usó el test t de Student (pareado o no pareado). Para múltiples grupos se aplicó ANOVA seguido del test de Šídák. La supervivencia se analizó con el test de log-rank (Mantel-Cox). Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

#### Resultados, análisis y discusión

Durante este proyecto obtuvimos resultados relevantes que aportan al entendimiento del rol de la proteína proinflamatoria S100A9 en la progresión de la leucemia linfocítica crónica (LLC). Estos hallazgos fueron presentados en congresos científicos y forman parte de un manuscrito actualmente en revisión en Blood Advances, en el que proponemos por primera vez al eje S100A9/EMMPIN como un nuevo blanco terapéutico en la LLC. Los principales resultados se detallan a continuación.

Como primera parte de este trabajo, dado que EMMPRIN ha sido implicado en la progresión tumoral de distintos tipos de cáncer y actúa como receptor de S100A9 (Xin et al., 2016; Hibino et al., 2013), nos propusimos estudiar su rol en LLC. Evaluamos por citometría de flujo la expresión de EMMPRIN en células B de pacientes con LLC de distinta evolución clínica (progresiva e indolente) y las comparamos con células B de donantes sanos. Demostrando que EMMPRIN está altamente expresado en células B leucémicas, con una mayor expresión en pacientes progresores en comparación con pacientes indolentes y donantes sanos. A continuación, exploramos el perfil de glicosilación de EMMPRIN, basándonos en reportes previos que asociaban altos niveles de glicosilación con progresión tumoral en otros tipos de cáncer (Bai et al., 2014). Realizamos un ensayo de desglicosilación con la enzima PNGasa-F y confirmamos la N-glicosilación de EMMPRIN, identificando dos glicoformas: una altamente glicosilada (HG) y otra de baja glicosilación (LG). Observamos que la forma HG se asociaba con peor pronóstico y estadíos avanzados según la clasificación de Binet.

En una segunda etapa, y con el objetivo de profundizar en la regulación de EMMPRIN en la célula leucémica, estimulamos células primarias de LLC (de pacientes progresores e indolentes) con distintas señales del microambiente tumoral (anti-IgM, CD40L+IL4, CpG+IL15). Interesantemente, observamos una regulación positiva de EMMPRIN específicamente tras la estimulación con CD40L+IL4 en células del grupo progresor, lo que no se evidenció en el grupo indolente. Además, evaluamos la expresión del factor de transcripción SP1, previamente descripto como regulador de EMMPRIN en cáncer de pulmón (Ling?Min Kong et al., 2010). Encontramos una correlación positiva entre SP1 y EMMPRIN, y un aumento de SP1 tras la estimulación con CD40L+IL4, apoyando su rol como regulador transcripcional de EMMPRIN en LLC.

A partir de esta caracterización, investigamos el impacto de la interacción entre S100A9 y EMMPRIN en la progresión tumoral. Demostramos que la estimulación con S100A9 en células de LLC de pacientes progresores (n=15) activa múltiples vías de señalización esenciales para la supervivencia y progresión tumoral, como PI3K/AKT, NF-?B y MAPK/JNK. Esta activación no se observó en células de pacientes indolentes (n=15), indicando que la respuesta a S100A9 depende de la evolución de la enfermedad. Dado que los resultados previamente mencionados sugieren un rol para el eje S100A9/EMMPIN en la activación de las vías PI3K/AKT, NF-?B y MAPK/JNK y la progresión de la enfermedad decidimos confirmar si dicha activación se generaba específicamente a través del eje S100A9/EMMPIN, algo no descrito aún en la LLC. Para ello, tratamos células de LLC de pacientes progresores con inhibidores específicos de S100A9 (Tasquinimod y Paquinimod) y de EMMPRIN (AC-73 y un anticuerpo bloqueante anti-EMMPIN). Los resultados muestran que tanto los inhibidores de S100A9 como los 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 sobrevida, la migración y la proliferación tumoral en LLC.

Al demostrar la especificidad de este eje procedimos a realizar una evaluación de la expresión de moléculas asociadas a la sobrevida, al ciclo celular y la migración tumoral asociadas a estas vías luego de la activación del eje S100A9/EMMPIN. La activación de estas vías en pacientes con una enfermedad progresora modula la expresión de genes relacionados con la resistencia a la apoptosis y la proliferación celular. Para evaluar si S100A9 tenía alguna contribución en este efecto, analizamos la expresión de moléculas antiapoptóticas y su impacto funcional en la apoptosis de células de LLC luego de la estimulación *in vitro* con S100A9, utilizando el ensayo CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay (n=10). En particular, observamos un aumento en la expresión de genes antiapoptóticos como MCL-1 y BCL-2, acompañado de una disminución en la actividad de las caspasas 3/7, involucradas en la muerte celular programada, lo que se tradujo en una mayor viabilidad celular y una reducción en los niveles de apoptosis y necrosis. Considerando que S100A9, a través de EMMPRIN, parece influir también en la supervivencia de las células tumorales, exploramos la expresión y fosforilación de moléculas clave implicadas en la regulación del ciclo celular. En particular, analizamos p-Retinoblastoma 1 (p-Rb1), una proteína que al estar fosforilada permite la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S, y p27, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (CKI) que actúa como un regulador negativo, promoviendo la quiescencia celular y frenando la proliferación celular. Los resultados mostraron un aumento significativo en la fosforilación de pRb en células estimuladas con S100A9. En línea con esta observación, los niveles de ARNm de p27 mostraron una disminución significativa luego de la estimulación. En conjunto, estos resultados sugieren que S100A9 podría estar promoviendo la transición G1/S del ciclo celular, favoreciendo la proliferación del clon leucémico a través de la activación de pRb y la reducción de p27.

Finalmente, teniendo en cuenta el rol de EMMPRIN en la inducción de metaloproteinasas (MMPs), en particular, MMP-2 y -9, que son producidas por linfocitos y degradan componentes de la matriz extracelular. En este caso, evaluamos la expresión de MMP-2 y MMP-9 a nivel de ARNm por qPCR antes y después de la estimulación con S100A9 en células de pacientes progresores con alta expresión de EMMPRIN. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de ambas MMPs en 10 pacientes progresores tras la estimulación con S100A9, sugiriendo que S100A9 también podría promover la invasión y migración celular al interaccionar con EMMPRIN e inducir la expresión de MMPs por parte de células de LLC. Asimismo, detectamos un aumento en la expresión de las quimiocinas CCL3 y CCL4, asociadas al homing del clon tumoral en los nichos de proliferación (Redondo-Muñoz et al., 2010; Burger et al., 2009), reforzando el impacto funcional de este eje en el microambiente leucémico. En ambos casos, la sobreexpresión de estas moléculas se ha vinculado con la progresión tumoral.

La última parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Inmunología del H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, dirigido por el Dr. Javier Pinilla-Ibarz. El modelo transgénico Eμ-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, caracterizado por leucocitosis y esplenomegalia a partir de los 10-13 meses de edad (Bresin et al., 2016; Chen et al., 2014). De esta manera, se generó en el modelo murino de LLC Eμ-TCL1, un knock-out del gen S100A9 (Eμ-TCL1/S100A9-/-). La ausencia de S100A9 se asoció con una mayor supervivencia, menor esplenomegalia e infiltración

tumoral, y una progresión leucémica más lenta. La transferencia adoptiva de células S100A9-/ redujo la proliferación del clon leucémico y la linfocitosis. Además, el tratamiento de ratones Eμ-TCL1 con Paquinimod o Tasquinimod mejoró la supervivencia y disminuyó la infiltración tumoral. Finalmente, en un modelo PDX (Patient-derived xenograft) utilizando PBMCs de pacientes con una enfermedad progresora, la inhibición de S100A9 redujo la esplenomegalia y la infiltración leucémica humana, consolidando su potencial como blanco terapéutico en LLC.

En conjunto, este estudio sugiere que la inhibición de S100A9 podría reprogramar las células B-LLC hacia un fenotipo menos inflamatorio y menos proliferativo, lo que impactaría directamente en la progresión de la enfermedad. Dado el interés clínico creciente por los inhibidores de S100A9 en otras patologías oncológicas e inflamatorias, y considerando nuestros resultados preclínicos, esta estrategia emerge como una alternativa terapéutica prometedora en LLC. Futuros estudios deberán evaluar su eficacia en monoterapia o en combinación con terapias dirigidas, abriendo nuevas posibilidades en el tratamiento de esta leucemia.

#### **Conclusiones y recomendaciones**

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 proyecto 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.

## Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Tesis de grado/monografías	Diferenciación y caracterización de células Nurse-Like a partir de monocitos de sangre periférica provenientes de pacientes con Leucemia Linfoides Crónica	Patricia Noelia Opiolo de Arteaga		<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/4020">https://hdl.handle.net/20.500.12381/4020</a>	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Activation of S100A9/EMMPRIN axis triggers survival/proliferation pathways in leukemic cells. A novel target for Chronic Lymphocytic Leukemia	Payque Eugenia, Dos Santos Gimena, Ortega Claudia, Uriepero Angimar, Correa Agustin, Uría Rita, Querol Juliana, Palacios Florencia, Guillermo Cecilia, Oliver Carolina, Irigoin Victoria, Landoni Ana Ines, Kundakian Eva, Pinilla- Ibarz Javier, Oppezzo Pablo and Márquez Maria Elena	doi:10.1080/10428194.2023.2250219	<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/4046">https://hdl.handle.net/20.500.12381/4046</a>	Finalizado
Resumen de conferencia publicado	Enhancing CAR-T Therapy in CLL By Modulating the Immunosuppressive Tumor Microenvironment: A Novel Approach with Significant	Uriepero, Angimar; Mediavilla, Varela, Melanie; Márquez, María- Elena;	<a href="https://doi.org/10.1182/blood-2024-204892">https://doi.org/10.1182/blood-2024-204892</a>	<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/4047">https://hdl.handle.net/20.500.12381/4047</a>	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	Therapeutic Potential	Gamal, Wael; Ammad-ud- din, Mohammad; Oppezzo, Pablo; Sahakian, Eva; Pinilla- Ibarz, Javier			
Tesis de maestría	Implicancias de la expresión de la proteína S100A9 durante la progresión de la Leucemia Linfoides Crónica	Eugenio Payque		<a href="https://hdl.handle.net/20.500.12381/4060">https://hdl.handle.net/20.500.12381/4060</a>	Finalizado
Artículo científico	Targeting S100-A9- mediated inflammation: A novel therapeutic approach for CLL	Maria E. Marquez*, Angimar Uriepero- Palma*, Eugenio Payque*, Melanie Mediavilla- Varela, Wael Gamal, Kamira Maharaj, John Powers, Erika Eksioglu, Julio C. Chavez, Sandra Sernbo, Florencia Palacios, Juliana Querol, Claudia Ortega, Rita Uria, Gimena Dos Santos, Carolina Oliver, Ana Inés			En proceso

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
		Landoni, Eva Sahakian, Pablo Oppezzo, Javier Pinilla- Ibarz			

#### Referencias bibliográficas

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- $\kappa$ B 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, Dura?n R, et al. S100A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF- $\kappa$ B 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, Luetteke 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, Fortenberry 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, Verheyen 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. Bjo?rk P, Bjo?rk A, Vogl T, Stenstro?m 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, Verheyen 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, Urias R, Tosar JP, Querol J, et al. TGF-?/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, Wro?bel T, Jaz?wiec B, Bogucka-Fedorczuk A, Pore?ba 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. Zygmuncia P, Robak T, Pu?a 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. *Oncotargets Ther.* 2014;7:223-34.
40. Van Damme M, Cromptot 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?) 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, Bu?rkle 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.

#### Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)



