

**Universidad ORT Uruguay**  
**Facultad de Ingeniería**

---

**Rol de la proteína S100-A9 en la progresión de  
la Leucemia Linfoide Crónica: Hacia la  
caracterización de nuevos blancos terapéuticos**

---

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

M<sup>a</sup> Eugenia Payque - 229926

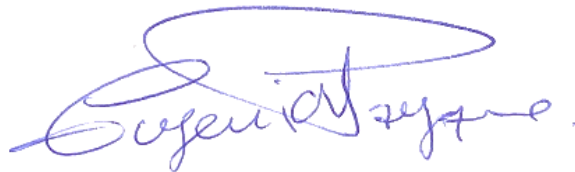
Tutora: María Elena Márquez

2022

## **Declaración de autoría**

Yo, María Eugenia Payque, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



---

María Eugenia Payque

10 de agosto de 2022

## **Agradecimientos**

A mi tutora, la Dra. María Elena Márquez, por todo lo que me ha enseñado e incentivado durante este proceso. Gracias por tu confianza, apoyo y dedicación. Hago una mención especial a su paciencia, sobre todo cuando los experimentos se hacían confusos. Gracias por haber creído en mí.

Al Dr. Pablo Oppezzo, por permitirme ser parte de su laboratorio, y siempre estar a una puerta de distancia para ayudarme o darme un consejo.

A Sofi, por siempre impulsarme a seguir mis sueños y enseñarme que no perdemos nada con intentar, lo peor que pueden responderte es “no”. Gracias por ser mi fan número uno.

A mis padres quienes me han brindado su apoyo incondicional y me han apoyado en este camino, alentándome a alcanzar mis sueños. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.

A Hori por estar desde el momento uno, apoyándome en todo momento y animándome a seguir adelante. Gracias por la paciencia, haber estado ahí para escucharme y por los abrazos.

A Flope y JP por ser el mejor equipo de facultad y por su apoyo incondicional, al firme en las horas y trabajos más difíciles. Gracias por estar siempre ahí, les confirmo: *Don't panic*, exoneramos.

A todo el equipo de iLLC, Juli, Flor, Gime, Rita y Jorge por hacer cada jornada tan divertida y siempre estar dispuestos a dar una mano.

A todos mis amigos, por ser el mejor antídoto contra los males y las decepciones, gracias por estar conmigo y acompañarme en todas mis locuras.

## Resumen

---

La Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) es una neoplasia hematológica clínicamente heterogénea. Mientras que en algunos pacientes la enfermedad tiene un comportamiento indolente, en otros casos la enfermedad es más agresiva requiriéndose tratamiento inmediato, observándose con frecuencia resistencia o recaída posterior a la terapia. El principal desafío en la clínica de la LLC es la obtención de nuevas alternativas terapéuticas para aquellos pacientes refractarios o resistentes a los tratamientos actuales. S100-A9 es una proteína pro-inflamatoria previamente asociada al cáncer y específicamente en LLC reportada por nuestro grupo como una molécula presente en el suero y el clon leucémico de pacientes progresores. A partir de estos resultados, este trabajo final de carrera tuvo como objetivo general evaluar la función de S100-A9 y la expresión de dos de sus receptores (RAGE y EMMPRIN) en la biología de las células de LLC.

Mediante citometría de flujo demostramos en todos los casos estudiados que ambos receptores se expresan en un mayor porcentaje de células B leucémicas, en comparación con células B de donantes sanos. Adicionalmente, utilizando la técnica de Western Blot para EMMPRIN demostramos que este receptor no solo se encuentra sobreexpresado en células B leucémicas, sino que además se encuentra N-glicosilado. Se logró además detectar diferentes formas de glicosilación, alta (HG) y baja (LG), permitiéndonos evaluar el perfil de este receptor en pacientes con distinta evolución clínica (indolentes versus progresores). Los resultados muestran que una mayor proporción de la glicofoma alta (HG) está asociada con la progresión tumoral de la LLC. Al mismo tiempo, llevamos a cabo ensayos de estimulación (S100-A9) e inhibición (Tasquinimod) en cultivo *in vitro* de células primarias de pacientes con LLC, las cuales fueron posteriormente analizadas por citometría de flujo. Los resultados obtenidos de estos experimentos en 8 pacientes indican que la estimulación con S100-A9 induce un aumento en la fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup>, sugiriendo la activación de la vía de señalización PI3K/AKT. En el mismo sentido, demostramos que la inhibición de S100-A9 con un inhibidor específico de esta proteína (Tasquinimod), genera una disminución en la fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup>.

En conjunto nuestro trabajo sugiere un rol importante para la proteína S100-A9 y el receptor EMMPRIN en la fisiopatología de la LLC, sugiriendo que la activación de la vía S100-A9/EMMPRIIN/PI3K-AKT podría ser relevante en la progresión tumoral. Finalmente, la

inhibición específica de esta vía por el inhibidor Tasquinimod plantea la necesidad de estudios adicionales en el área, proponiendo a S100-A9 como un nuevo blanco terapéutico en la biología de la LLC.

**Palabras clave**

LLC, S100-A9, PI3K/AKT, EMMPRIN, RAGE, Tasquinimod

## 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*)

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

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

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CMSP - Células mononucleares de sangre periférica

DMSO - Dimetilsulfóxido

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

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

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

LLC - Leucemia linfoide crónica

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*

kDa - Kilo dalton

Ig - Inmunoglobulina

IgM - Inmunoglobulina M

IgG - Inmunoglobulina G

IL - Interleuquina

mA - Miliampere

MFI - Intensidad media de fluorescencia

nm - Nanómetro

pH - Logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones de una solución

PMA - Forbol-12-mirístato-13 acetato

PE - Ficoeritrina (del inglés *Phycoerythrin*)

PerCP - Proteína peridina clorofila (del inglés *Peridinin-Chlorophyll-protein*)

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

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

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

rpm - Revoluciones por minuto

TEMED - N,N,N',N'-tetramethylenediamine

SFB - Suero fetal bovino

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

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

rcf - Fuerza centrífuga relativa (del inglés *relative centrifuge force*)

## Índice

---

<b>Introducción.....</b>	<b>13</b>
1.1 Leucemia linfoide crónica.....	13
1.1.1 Generalidades .....	13
1.1.2 Diagnóstico y estratificación .....	14
1.1.3 Factores pronósticos .....	15
1.1.4 Terapias actuales y emergentes .....	18
1.2 Microambiente tumoral .....	22
1.3 Antecedentes .....	24
1.4 Justificación del trabajo final de carrera .....	27
<b>Objetivos .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo general .....	28
2.2 Objetivos específicos: .....	28
<b>Metodología.....</b>	<b>29</b>
3.1 Soluciones y medio de cultivo .....	29
3.2 <i>Buffers</i> .....	29
3.3 Anticuerpos .....	30
3.4 Procedimientos generales.....	32
3.4.1 Muestras de pacientes con LLC .....	32
3.4.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	32
3.4.3 Descongelado de CMSP .....	33
3.5 Caracterización de los receptores de la proteína S100-A9 (RAGE, EMMPRIN) .....	34
3.5.1 Citometría de flujo.....	34
3.5.2 Ensayos de Western Blot.....	36
3.5.2.1 Extracción de proteínas .....	36

3.5.2.2	Cuantificación de proteínas .....	36
3.5.2.3	Electroforesis SDS-PAGE.....	37
3.5.2.4	Western blot.....	37
3.5.2.5	Ensayo de desglicosilación de proteínas .....	38
3.6	Ensayos de activación e inhibición celular .....	39
3.6.1	Activación de células leucémicas con S100-A9.....	39
3.6.2	Inhibición con tasquinimod .....	40
3.6.3	Evaluación de la fosforilación de AKT por citometría de flujo.....	41
	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>43</b>
4.1	Caracterización de los receptores de S100-A9: RAGE y EMMPRIN .....	43
4.1.1	Análisis de la expresión de RAGE y EMMPRIN por citometría de flujo.....	43
4.1.2	Detección del perfil de glicosilación de EMMPRIN en células de LLC por Western blot.....	48
4.1.2.1	Puesta a punto de la detección de EMMPRIN por Western Blot .....	49
4.1.2.2	Comparación del perfil de glicosilación de EMMPRIN entre pacientes indolentes y progresores .....	51
4.2	Evaluación de la vía de señalización PI3K/AKT luego de la activación con la proteína S100-A9 .....	56
4.3	Inhibición de la proteína S100-A9 con Tasquinimod y evaluación de la vía de señalización PI3K/AKT .....	59
	<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
	<b>Perspectivas.....</b>	<b>63</b>
	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>64</b>
	<b>Anexo .....</b>	<b>73</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación de las terapias establecidas y en experimentación en la LLC.....	21
<b>Figura 2.</b> Microambiente tumoral en la LLC. ....	23
<b>Figura 3.</b> Representación del aislamiento de CMSP por gradiente de Ficoll-Histopaque .....	33
<b>Figura 4.</b> Pocillos empleados para el marcaje para citometría de flujo de EMMPRIN y RAGE. .....	34
<b>Figura 5.</b> Pocillos empleados para el ensayo de activación con S100-A9.....	40
<b>Figura 6.</b> Pocillos empleados para el ensayo de inhibición con tasquinimod.....	40
<b>Figura 7.</b> Pocillos empleados para el marcaje por citometría de flujo para la evaluación de la fosforilación de AKT. ....	41
<b>Figura 8.</b> Estrategia de <i>gating</i> para los ensayos de expresión de los receptores EMMPRIN y RAGE.....	44
<b>Figura 9.</b> Histogramas representativos de la expresión de RAGE en un paciente de LLC (LLC) y donante sano (DS) .....	45
<b>Figura 10.</b> Histogramas representativos de la expresión de EMMPRIN en un paciente de LLC (LLC) y donante sano (DS).....	46
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de los receptores EMMPRIN y RAGE en células B de pacientes con LLC, y en donantes sanos (DS).....	47
<b>Figura 12.</b> MFI de los receptores EMMPRIN y RAGE en células B de pacientes con LLC, y en donantes sanos (DS) .....	47
<b>Figura 13.</b> Western Blot representativo de EMMPRIN en los experimentos de puesta a punto. .....	50
<b>Figura 14.</b> Western Blot de EMMPRIN.....	51
<b>Figura 15.</b> Western Blots representativos de EMMPRIN, en pacientes progresores e indolentes de LLC (A, B, C).....	53
<b>Figura 16.</b> Cuantificación relativa de la señal de Western Blot de HG-EMMPRIN. ....	54
<b>Figura 17.</b> Ensayo de desglicosilación de EMMPRIN.....	56
<b>Figura 18.</b> Estrategia de <i>Gating</i> para el ensayo de activación con S100-A9. ....	58
<b>Figura 19.</b> Ensayos de activación S100-A9. ....	59
<b>Figura 20.</b> Ensayo de inhibición con tasquinimod. ....	60

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Sistemas Rai y Binet de estratificación en la LLC.....	14
<b>Tabla 2.</b> Biomarcadores pronósticos mejor establecidos en la actualidad para la LLC.....	16
<b>Tabla 3.</b> Índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI).....	18
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos primarios y secundarios empleados en citometría de flujo.....	30
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot. ....	31

## Introducción

---

### 1.1 Leucemia linfoide crónica

#### 1.1.1 Generalidades

La Leucemia Linfoide Crónica (LLC) es una neoplasia caracterizada por la acumulación lenta y progresiva de pequeños linfocitos B maduros, clonales, CD5 positivos en sangre periférica (SP), médula ósea y órganos linfoides secundarios (1,2). Desde una perspectiva biológica y clínica, la LLC es sumamente heterogénea. Generalmente, un grupo de pacientes debuta con una enfermedad indolente, definida por linfocitosis mayor de 5000 linfocitos B/  $\mu\text{l}$  pero que se mantiene estable sin requerir tratamiento. Existe además otro grupo de pacientes que presentan una LLC agresiva caracterizada por un rápido incremento de la linfocitosis y posible presencia de linfadenopatías y/o citopenias, por lo que deben ser tratados inmediatamente; y un tercer grupo en el cual la enfermedad se mantiene estable durante años, pero luego progresan (3). Los últimos dos grupos de pacientes significan un desafío mayor para los médicos, en ellos es vital contar con factores pronóstico que ayuden a identificar de forma temprana los casos de mayor riesgo, y predecir el tratamiento más adecuado. A pesar del desarrollo en las últimas décadas de terapias nuevas dirigidas a vías o moléculas específicas, la LLC sigue siendo una enfermedad incurable, dado que no existe un tratamiento que permita la completa remisión de la enfermedad en todos los casos (4–6).

En cuanto a su epidemiología, la LLC representa un 30% del total de leucemias a nivel mundial, y hoy en día es la enfermedad linfoproliferativa crónica más frecuente en los adultos de países occidentales, ya que, si bien puede ocurrir a cualquier edad, afecta principalmente a individuos mayores de 50 años. Siendo poco frecuente en personas menores de 40 años y muy rara en niños (7). La incidencia varía según las regiones geográficas, así como la composición étnica de la población. Según los cálculos de la Sociedad Americana Contra el Cáncer se estima que para este año se producirán alrededor de 20.160 nuevos casos de LLC y 4.410 muertes a causa de esta en los Estados Unidos (8). En Uruguay, se observa una incidencia de 6/100.000/año, siendo diagnosticados unos 200 casos por año (9).

### 1.1.2 Diagnóstico y estratificación

En aquellos países en los que se puede acceder fácilmente a la atención médica el diagnóstico de LLC se realiza durante una visita médica de rutina donde el médico encuentra una cantidad elevada de linfocitos (>5000 linfocitos por milímetro cúbico) al realizar un hemograma completo. Si la expansión de linfocitos persiste a lo largo de 3 meses, se realiza una inmunofenotipificación (análisis por citometría de flujo) del número de células B CD5+ CD19+ (2). Típicamente las células de LLC co-expresan el antígeno CD5, característico de la superficie de células T, junto a los antígenos de linfocitos B CD19, CD20 y CD23. Asimismo, en la LLC los niveles de inmunoglobulina (Ig) de superficie, de CD20 y de CD79 son más bajos que aquellos encontrados en una célula B normal. Recientemente se ha llegado al consenso que un panel constituido por CD19, CD5, CD20, CD23,  $\kappa$ , y  $\lambda$  son suficientes para establecer el diagnóstico (2). Y en aquellos casos en los cuales el diagnóstico no sea claro es recomendable agregar los marcadores CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10, o ROR1 (2,10).

Luego del diagnóstico de la LLC, el estadio clínico se asigna de acuerdo con el sistema de estadificación definidos por Binet et al., 1981 (11) o Rai et al., 1975 (12) presentados en la tabla 1. Hoy en día estas clasificaciones siguen siendo los pilares de la atención clínica y son usadas indistintamente, siendo dos sistemas simples, económicos que se basan en hallazgos físicos y los resultados del hemograma completo, permitiendo al médico hematólogo orientar mejor la estrategia terapéutica a seguir.

Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de estratificación en la LLC

Clasificación	Características
<b>Rai</b>	
Estadio 0	Linfocitosis $> 5 \times 10^9/L$ sin adeno ni visceromegalias, Hgb $> 11$ gr/dl, PLT $> 10.000/uL$
Estadio I	Linfocitosis + adenomegalias
Estadio II	Linfocitosis + hepatomegalia o esplenomegalia
Estadio III	Hgb $< 11$ gr/dL
Estadio IV	PLT $< 100.000/mm^3$
<b>Binet</b>	

Estadio A	Hgb > 10 gr/dl, PLT > 10.000/uL + ≤ 3 áreas ganglionares comprometidas
Estadio B	Hgb > 10 gr/dl, PLT > 100.000/mm <sup>3</sup> + > 3 áreas ganglionares comprometidas
Estadio C	Hgb < 10 gr/dl o PLT < 100.000/mm <sup>3</sup>

Abreviaturas: Hgb: Hemoglobina, PLT: plaquetas, áreas comprometidas pueden ser: hígado, bazo y ganglios linfáticos inguinales, axilares y cervicales.

La clasificación Binet nos permite dividir los pacientes en tres grupos pronósticos: bueno (estadio A), intermedio (estadio B) y severo (estadio C) (11). Mientras que la clasificación de Rai permite dividir entre pacientes de bajo riesgo (estadio 0), pacientes con riesgo intermedio (estadio I o II) y pacientes de alto riesgo (estadio III o IV) (12). Ambas clasificaciones se basan en la evaluación de la linfocitosis, tamaño de los nódulos linfáticos, detección de organomegalia y presencia o ausencia de anemia o trombocitopenia. Asimismo, se relacionan directamente con la sobrevida de los pacientes. Aquellos con estadio Binet A o Rai 0 presentan una sobrevida media de más de 10 años. Los pacientes con estadio Binet B o Rai I/II presentan una sobrevida media de entre 5 a 7 años, por último, aquellos con estadio Binet C o Rai III/IV una menor sobrevida, de aproximadamente 3 años (13).

### 1.1.3 Factores pronósticos

Los sistemas de estadificación clínica disponibles actualmente para la LLC son simples y económicos, pero carecen de precisión para predecir la progresión de la enfermedad en los estadios iniciales (Binet A y RAI 0). Debido a que la LLC es una enfermedad heterogénea cuya evolución clínica puede variar ampliamente de un paciente a otro se han realizado numerosos esfuerzos desde la biomedicina en vías a la obtención de factores pronósticos que permitan predecir la evolución de la enfermedad. Conocer si un paciente va a progresar rápidamente o no permite al médico seleccionar la estrategia terapéutica más adecuada.

Los factores pronósticos se pueden clasificar en 4 categorías: 1) factores intrínsecos del paciente que incluyen edad, sexo, etnia y comorbilidades; 2) marcadores de la enfermedad; 3) anormalidades bioquímicas y marcadores celulares (como niveles séricos de timidina quinasa, β-2-microglobulina, CD49d, CD38 y ZAP-70); 4) anomalías genéticas que incluyen deleciones cromosómicas, como la deleción (del-) cromosómica, 17p, la del-11q, trisomía del cromosoma

12, mutaciones en el gen *TP53*, el estado mutacional de la cadena pesada variable de inmunoglobulina (IGHV), entre otras (13,14). Un resumen de los principales factores pronósticos es mostrado en la tabla 2.

Tabla 2. Biomarcadores pronósticos mejor establecidos en la actualidad para la LLC.

<b>Categoría</b>	<b>Biomarcador</b>
Factores intrínsecos del paciente	Edad, sexo, etnia, comorbilidades
Marcadores de la enfermedad	Ganglios linfáticos comprometidos (tamaño, sitio/s comprometidos), Hepatomegalia, Esplenomegalia, LDT, conteo de GB, ALC, Anemia, Trombocitopenia.
Anormalidades bioquímicas y marcadores celulares	$\beta$ 2M, LDH, IL-8, CD38, ZAP70, CD49d/VLA-4
Anomalías genéticas	del12p, del17p, mutación TP53, del11q, del13q, metilación de ADN, cariotipo complejo, mutación BIRC3, mutación BRAF, mutación IGHV, estructura BCR

Abreviaturas: LDT, tiempo de duplicación de linfocitos; GB, glóbulos blancos; ALC, recuento absoluto de linfocitos; ZAP70, proteína asociada a la cadena zeta 70; VLA-4, molécula de adhesión de leucocitos vasculares-4;  $\beta$ 2M, Beta-2 microglobulina; LDH, lactato deshidrogenasa; IL-8, interleucina 8; IGHV, cadena pesada variable de inmunoglobulina; BCR, receptor de células B.

Dentro de los factores pronósticos mencionados, hoy en día uno de los más confiables es el “estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGHV)”, refiriendo a la presencia o ausencia de un número significativo de mutaciones somáticas en el gen del IGHV expresado por el clon leucémico. El proceso de hipermutación somática (HMS) ocurre en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios, cuando un linfocito B maduro entra en contacto con un antígeno. La consecuencia de esta unión que principalmente ocurre a través del BCR y/o por contacto con los receptores CD40/CD40 ligando (CD40L) luego de la interacción de las células B con las células T foliculares (conocidas como “T helper”). Esto origina dos procesos de gran relevancia para el correcto funcionamiento de la inmunidad adaptativa: los eventos de HMS y conmutación isotípica (CI). Ambos son dependientes de la expresión de la enzima AID (por “*Activation Induced cytidine Deaminase*”). Específicamente

en el proceso de HMS, se generan mutaciones puntuales en las cadenas variables del BCR que son específicas a cada linfocito B, cuyo objetivo final es mejorar la afinidad de esa célula por su antígeno (15). En el caso de la LLC, este proceso de HMS permite identificar al clon tumoral responsable de la enfermedad, mientras que el análisis mutacional del BCR en particular, identifica a pacientes con diferente pronóstico. Por tanto, el perfil de HMS en la LLC permite estratificar a los pacientes en dos categorías diferentes: aquellos con regiones IGHV mutadas (M-LLC, porcentaje menor a 98% con respecto a la contrapartida germinal) y pacientes con regiones no mutadas (U-LLC, porcentaje igual o mayor al 98% con respecto a su contrapartida germinal) (15,16). Identificar si el paciente presenta o no mutaciones en IGHV es crucial, puesto que tiene un importante valor pronóstico. Ya que, aquellos pacientes con un U-LLC se asocian a un mal pronóstico y una enfermedad progresiva. Por el contrario, los pacientes M-LLC, presentan un mejor pronóstico y en su mayoría una enfermedad indolente (16).

Por su parte, las alteraciones citogenéticas estudiadas mediante la técnica de FISH (hibridación fluorescente *in situ*) permiten también identificar grupos con diferentes pronósticos. Aquellos pacientes en los cuales el clon tumoral muestra una citogenética normal o la del-13q14 muestran un mejor pronóstico que aquellos en donde el clon leucémico presenta las deleciones del gen TP53 (del-11q) y deleciones del gen ATM (del-17p) (14). Finalmente, la otra aberración cromosómica es la trisomía del cromosoma 12, la cual muchas veces también es asociada a un mal pronóstico (14).

Por último, los marcadores séricos como lactato deshidrogenasa (LDH) y,  $\beta$ 2-microglobulina (B2M) indican alta carga tumoral cuando se encuentran elevados. No son específicos de la LLC ya que se elevan también en otras neoplasias, pero son sencillos de determinar en la práctica clínica habitual (17).

En la búsqueda de un índice pronóstico ideal, el cual debe ser clínicamente relevante, fácilmente aplicable, orientado a tomar decisiones terapéuticas, y factible en la práctica clínica habitual se propuso el índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI, del inglés *Chronic Lymphocytic Leukemia-International Prognostic Index*). Este incorpora la edad del paciente, el estadio de la enfermedad (sistemas Rai o Binet), la deleción y/o mutaciones con pérdida de función del gen TP53, el estado mutacional IGHV y los niveles séricos de  $\beta$ 2-microglobulina. Estos cinco parámetros se ponderan individualmente y se determina una

puntuación compuesta que asigna a los pacientes a uno de los cuatro grupos de riesgo con diferente supervivencia global (SG) a 5 años (18).

Tabla 3. Índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI)

Valor CLL-IPI	Categoría IPI	CLL- 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%	Si es posible tratar con drogas no citotóxicas (quimioterapia y quimioinmunoterapia)

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  $\beta 2$ -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 (18).

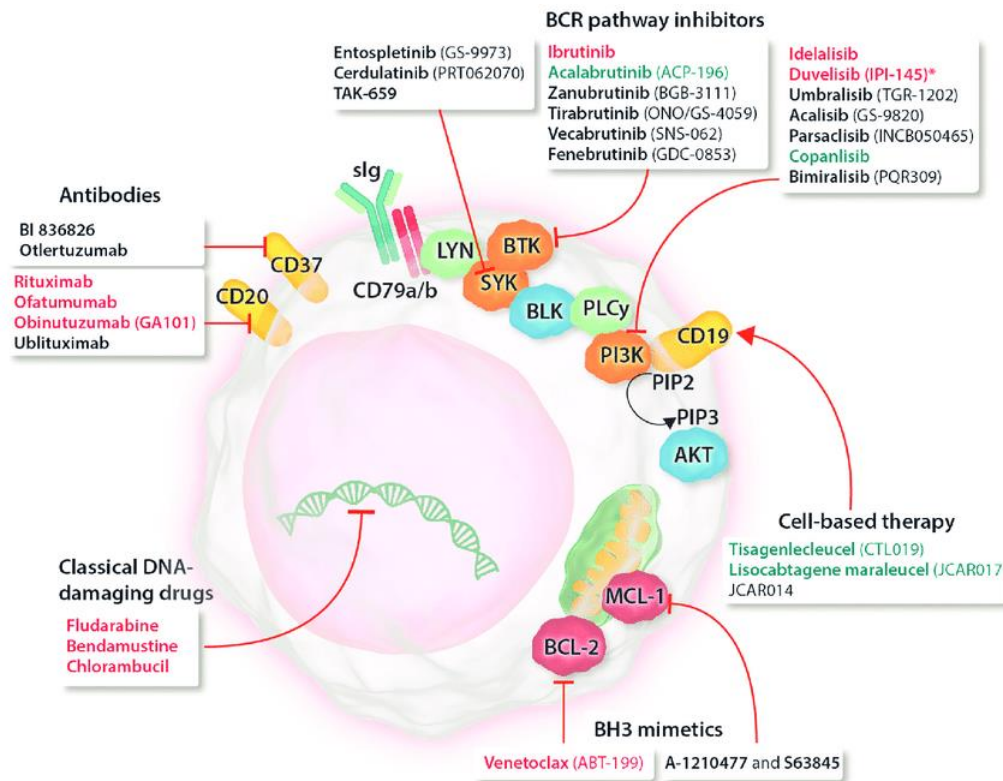
#### 1.1.4 Terapias actuales y emergentes

La decisión de iniciar tratamiento depende de la presencia o no de una enfermedad activa, así como del riesgo de progresión. Recientemente se actualizaron las pautas para el diagnóstico y el tratamiento de la LLC (2). El tratamiento generalmente está indicado en pacientes con enfermedad sintomática o activa, pero no típicamente entre aquellos que no tienen síntomas, como se establece en las pautas del CLL-IPI.

Originalmente, el tratamiento de la LLC se basaba principalmente en la quimioterapia que incluía agentes alquilantes (clorambucilo, ciclofosfamida y bendamustina), análogos de nucleósidos (fludarabina, pentostatina y cladribina) y glucocorticoides. Los pacientes más jóvenes y en forma recibían generalmente una terapia más intensiva, mientras que los pacientes de edad avanzada con comorbilidades eran tratados con regímenes de menor intensidad (5,19). En el año 1997, la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CD20 como el Rituximab, cambió el panorama de tratamiento. Este anticuerpo actúa uniéndose a la molécula CD20 en la superficie del linfocito B, lo cual permite su eliminación a través de mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y por inducción directa de la apoptosis (20). Posteriormente se desarrolló obinutuzumab, un anti-CD20 de segunda generación. En la actualidad, ambos anticuerpos están aprobados en combinación con otras drogas para el tratamiento de la LLC (21,22). La incorporación de estos anticuerpos a la quimioterapia resultó en una supervivencia prolongada y, por lo tanto, la quimio-inmunoterapia se convirtió en la terapia estándar antes de la llegada de los nuevos agentes (23).

La quimio-inmunoterapia (CIT) ha sido la primera línea de tratamiento de la LLC por mucho tiempo. Actualmente, se utiliza principalmente como tratamiento de primera línea para pacientes jóvenes y sin comorbilidades. Especialmente en los pacientes M-LLC, en cuyo caso la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (FCR) produce importantes sobrevidas libres de progresión (SLP) en casi el 50% de los pacientes, con posibilidad de cura en aquellos casos donde no se ha tenido recaída más allá de los 10 años (24,25). Sin embargo, no es aplicable a todos los pacientes, debido a que muchos pacientes, especialmente, aquellos mayores o con comorbilidades sufren de una recaída temprana o una respuesta deficiente a los tratamientos (refractarios). Lo que sugiere una enfermedad de alto riesgo/agresiva que se asocia con una sobrevida promedio corta y una mediana de esperanza de vida de <3 años si se trata con estos regímenes estándar, ya que, cuando ocurre la progresión de la enfermedad, especialmente después del tratamiento de primera línea, las células de LLC desarrollan cada vez más resistencia a las terapias (26,27). De aquí surge la necesidad de desarrollar tratamientos adicionales que tengan mecanismos de acción alternativos, que sean efectivos y tengan un perfil de efectos secundarios aceptable.

El avance en los conocimientos relacionados con los mecanismos intrínsecos de la progresión de la enfermedad llevó a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos, generando el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas de alto impacto clínico. Estas terapias incluyen inhibidores de la tirosina quinasa de Bruton (BTK), de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (leucemia/linfoma 2 de células B regulador de la apoptosis) y de la subunidad catalítica delta de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K $\delta$ ). Estas drogas son más específicas, y sin ninguna duda, se han convertido en herramientas de gran valor en el tratamiento de la LLC en la última década (28,29). El primero de estos inhibidores aprobado en primera línea, y el más ampliamente utilizado en la actualidad es Ibrutinib, un inhibidor irreversible de BTK. Existe evidencia que más allá de su efecto directo sobre la proliferación del clon tumoral, ibrutinib es capaz de modular el microambiente tumoral para revertir mecanismos de evasión inmune (30). La otra droga con un gran efecto terapéutico y muy buena respuesta es Venetoclax, un inhibidor oral de la proteína BCL2 (*B-cell lymphoma 2*). BCL2 está sobre-expresado y es crucial para la evasión de la apoptosis del clon leucémico, de esta manera su inhibición promueve la muerte de la célula tumoral. Al ser un mecanismo río abajo de p53, esta terapia ha tenido gran éxito en aquellos pacientes con pérdida o mutación en TP53 (31). Además de su uso como monoterapia, estos nuevos agentes también se están evaluando en combinación con otros agentes terapéuticos. Un ejemplo es la terapia combinada con anticuerpos monoclonales anti-CD20 (rituximab, ofatumumab u obinutuzumab) (32–34). Por último, otra las drogas de importancia en las terapias dirigidas es Idelalisib, un inhibidor de PI3K $\delta$ , proteína expresada selectivamente en células hematopoyéticas. Al inhibir esta proteína, Idelalisib bloquea varias vías de señalización celular involucradas en el mantenimiento de la viabilidad y proliferación de la célula B leucémica (35).



**Figura 1. Representación de las terapias establecidas y en experimentación en la LLC.** En rojo se observan las drogas aprobadas para su uso en LLC; drogas aprobadas con otras indicaciones se muestran en verde; drogas en diferentes etapas de desarrollo clínico se observan en el negro. (Adaptado de Yosifov, Deyan Y et al., 2019 (28)).

A pesar de la eficacia clínica de estos inhibidores, tanto la resistencia primaria como la adquirida se han descrito en ensayos clínicos y en pacientes (33,34,36,37). Por ejemplo, ibrutinib ha cambiado enormemente el resultado de los pacientes con LLC, sin embargo, la resistencia adquirida a este, además de la actividad *off target* de la quinasa puede contribuir a los efectos adversos, siendo esta la razón más común de interrupción en la práctica clínica (36). Por otro lado, Idelalisib, si bien fue aprobado por FDA, ha tenido recientemente restricciones importantes a causa de sus efectos adversos (38,39). Esto nos muestra que, aunque los inhibidores han mostrado ser un tratamiento eficaz para los pacientes con LLC, existe la necesidad de mejorar aún más los problemas de tolerabilidad y el desarrollo de resistencia (40–42).

## 1.2 Microambiente tumoral

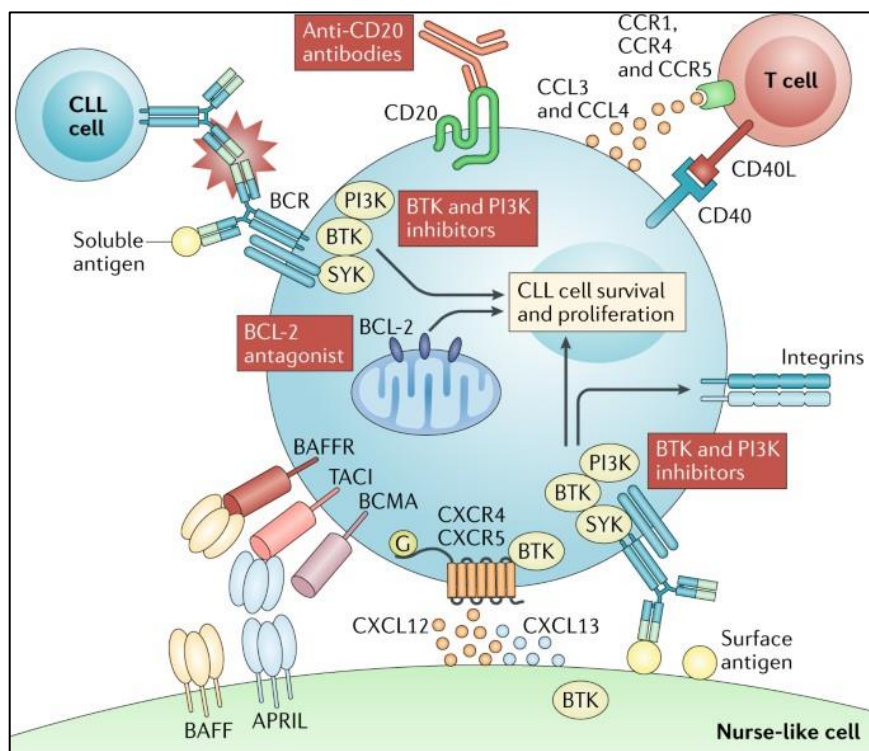
Históricamente, la LLC se ha considerado como una enfermedad acumulativa de linfocitos B con defectos en la apoptosis que morfológicamente se asemejan a pequeñas células B en reposo en la sangre con capacidad limitada para proliferar (3,6). Hoy en día, se ha definido la naturaleza dinámica de los clones de LLC, mostrando la proliferación celular de clones leucémicos dentro de estructuras llamadas centros de proliferación o pseudofolículos que se encuentran frecuentemente en los ganglios linfáticos y la médula ósea de pacientes con LLC. En los pseudofolículos, están presentes poblaciones celulares específicas, incluidas las células T, las células estromales y los macrófagos, además de las células endoteliales y los prolinfocitos B/parainmunoblastos. Dentro de estas estructuras, las células de LLC mantienen interacciones celulares y moleculares complejas con las células accesorias circundantes, denominadas colectivamente como el "microambiente tumoral" (TME, del inglés *Tumor microenvironment*), llevando a la supervivencia y proliferación de las células de LLC (43,44).

Esta dependencia de las células leucémicas con el microambiente tumoral se evidencia con el hecho de que, a pesar de una aparente larga vida *in vivo*, las células de LLC derivadas de sangre periférica mueren rápidamente cuando se cultivan en condiciones *in vitro* con medios de cultivo suplementados con suero bovino autólogo o fetal. Esto sugiere que las señales extrínsecas del microambiente que rodea a las células leucémicas *in vivo* son esenciales para la supervivencia prolongada de las células de LLC (43). De esta manera, las células de LLC establecen una estrecha e íntima interacción con muchos tipos de células del microambiente tumoral, siendo los principales actores las células estromales mesenquimales, los macrófagos, las células T, las células NK y las células endoteliales. Esta interacción compleja es crucial para las señales de proliferación y supervivencia de las células de LLC y contribuye en la progresión de la enfermedad y la resistencia a los medicamentos (45,46).

Esta interacción bidireccional se lleva a cabo mediante el contacto célula-célula, moléculas de adhesión, ligandos de la superficie celular y sus correspondientes receptores, quimiocinas, y citocinas (45–47). Algunos de los elementos principales involucrados en este proceso de comunicación son: las interleucinas, como la interleucina (IL)-4 y la IL-21, involucradas en la supervivencia y proliferación celular, o la IL-10 en la inmunosupresión. En segundo lugar, las quimiocinas, tienen un papel importante en la quimioatracción de las células hacia el

microambiente tumoral. Además, CCL2 (ligando 2 de quimiocina) podría desempeñar un papel en la supervivencia de las células tumorales mediante el apoyo indirecto a través del microambiente. Por otra parte, los factores ligados a la membrana de las células como el CD40L y las integrinas, pueden inducir la supervivencia celular (44,48–50). Otra posibilidad de comunicación del clon tumoral con el microambiente circundante es a través de vesículas pequeñas, como las microvesículas o los exosomas que contienen ARN, proteínas, lípidos o metabolitos y podrían transmitir diferentes señales (51). En la LLC, se ha demostrado que los exosomas pueden rescatar las células de la LLC de la apoptosis espontánea e inducida por fármacos, mejorar su capacidad de migración y apoyar la proliferación de células leucémicas (51,52).

Hay que destacar que las células LLC no son simples espectadores, sino que modelan y manipulan activamente el microambiente circundante para su propio beneficio. Por esta razón, se cree que el microambiente de la LLC se forma y se mantiene a través de una co-evolución dinámica e interactiva entre las células leucémicas y los componentes circundantes (53).



**Figura 2. Microambiente tumoral en la LLC.** Los factores en el microambiente LLC activan vías de crecimiento y supervivencia que pueden ser atacados usando nuevos agentes terapéuticos. (Adaptado de Burger et al., 2018 (5)).

Como se observa en la figura anterior, el estudio del microambiente tumoral en la LLC ha proporcionado evidencias para comprender la supervivencia de las células y progresión tumoral. Todo este conocimiento ha ofrecido nuevas perspectivas para el diseño de tratamientos alternativos. Estas nuevas estrategias terapéuticas están destinadas a disrumpir la interacción del clon tumoral con el microambiente, con la finalidad de mejorar las respuestas clínicas, disminuir la toxicidad y la resistencia a los medicamentos (48–50). De esta manera, un mayor conocimiento de los diferentes componentes que forman parte del microambiente podría brindar una oportunidad para optimizar el tratamiento de LLC, pudiendo incluso evaluar la combinación de medicamentos dirigidos a diferentes blancos terapéuticos que permitan una sinergia terapéutica.

### **1.3 Antecedentes**

La LLC presenta un complejo equilibrio entre la proliferación y muerte celular. A pesar de que la mayoría de las células leucémicas se detienen en las etapas del ciclo celular G0/G1, Messmer y col. demostraron que en la LLC existe también una fracción minoritaria (0.1-1%) del clon tumoral con altas capacidades de proliferación (54). Trabajos previos realizados en el laboratorio de investigación de LLC del Institut Pasteur de Montevideo, describieron la presencia de una de estas fracciones proliferantes (FP) en la SP de pacientes con una mala evolución clínica (55). Estudios posteriores demostraron que esta FP muestra un proceso activo de conmutación isotípica así como una alta expresión de la enzima mutagénica AID (56). Finalmente, a través del estudio del transcriptoma y el microRNAoma de esta FP se demostró que la proliferación de estas células tumorales está originada, al menos en parte, por la activación de la vía Pi3K/AKT (57).

Lo más interesante desde un punto de vista clínico, en referencia a las diferentes subpoblaciones que existen en un mismo paciente con LLC, radica en la observación de que ambas fracciones (quiescentes y proliferante) pueden aumentar o disminuir durante el curso de la enfermedad. En consecuencia, la evolución de la LLC parece depender del equilibrio relativo entre estas subpoblaciones que, a su vez, están influenciadas por diferentes señales provenientes del microambiente (58,59). En este contexto, la estimulación antigénica, la interacción de células LLC con otras células del microambiente y/o las señales de mediadores

solubles (citoquinas, proteínas proinflamatorias, microvesículas, etc) son eventos críticos, que pueden alterar este delicado equilibrio entre quiescencia y proliferación originando el inicio de la progresión y/o refractoriedad terapéutica en la LLC.

En esta línea de investigación y con el objetivo de conocer como la presencia de microvesículas (exosomas) en el microambiente tumoral leucémico podía influir en las señales de activación y progresión tumoral el laboratorio de iLLC llevó a cabo un estudio proteómico de los exosomas presentes en el suero de pacientes con diferente evolución clínica. La caracterización y comparación proteómica de microvesículas presentes en el suero de pacientes al momento de la progresión tumoral y con necesidad de tratamiento contra la de pacientes en estadios indolentes de una LLC que no requiere tratamiento permitió identificar la presencia de diferentes proteínas. Dentro del grupo de proteínas presentes en exosomas de pacientes progresores se encontró la proteína pro-inflamatoria (S100-A9) (60). Los estudios de nuestro grupo permitieron mostrar que la presencia de S100-A9 no solo se encontraba en altas cantidades en las microvesículas sino también y de manera no fisiológica en los linfocitos leucémicos. Además de esta sobreexpresión estos estudios describen que la presencia de S100-A9 en los exosomas de estos pacientes son capaces de activar una de las vías más comúnmente asociadas a la progresión leucémica como es NF- $\kappa$ B. Estos resultados sugieren que la expresión de S100-A9 en el clon tumoral y su incorporación a microvesículas, que son luego extravasadas al espacio intercelular podrían gatillar la activación constitutiva de NF- $\kappa$ B en la célula leucémica originando de esta manera una nueva fuente de proliferación y supervivencia del tumoral (60).

La proteína humana S100-A9 es una proteína de bajo peso molecular, perteneciente a la familia de proteínas S100, que tiene alrededor de 20 miembros. También conocida como MRP-9 (del inglés: *myeloid-related protein*) y calgranulina B (61). Las investigaciones de las últimas décadas han demostrado que la desregulación de las proteínas S100, típicamente la regulación positiva, es muy común en varios tipos de cáncer y está relacionada con casi todos los aspectos del crecimiento tumoral, angiogénesis, metástasis y resistencia a los medicamentos (61,62).

Específicamente S100-A9 ha sido descrita como un mediador inflamatorio liberado por células de origen mieloide; asociada con la promoción de tumores, metástasis e inflamación crónica (63,64). Niveles séricos elevados de S100-A9 están asociados con enfermedades inflamatorias

como artritis reumatoide, fibrosis quística, enfermedad de Alzheimer y Crohn (65). Además, S100A-9 es necesaria para reclutar células mieloides supresoras (MDSC) en modelos tumorales (66). En el espacio extracelular la función de esta proteína depende de las interacciones con sus receptores, y actualmente se han descrito cinco: los más clásicos, TLR4 (receptor tipo *Toll* 4) y RAGE (receptor para productos finales de glicosilación avanzada), y otros como el receptor CD33 en células mieloides inmaduras (66,67), el receptor CD36 en plaquetas (68) y el receptor de matriz extracelular inductor de metaloproteasas (EMMPRIN) en linfocitos (69).

Dentro de estos receptores, RAGE es una molécula de superficie celular que se ha descrito anteriormente como un receptor multi-ligando de la superfamilia de las inmunoglobulinas (70). Este se ha propuesto como receptor de varios miembros de la familia de proteínas S100 ya que se ha encontrado la co-expresión de RAGE y distintas S100 en tejido tumoral de próstata, mama y pulmón (71,72). EMMPRIN (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*), también denominado CD147, es una molécula encontrada en la superficie celular y que ha sido asociada anteriormente con el cáncer (73). Sin embargo, el principal ligando descrito para RAGE es el heterodímero formado por S100-A8 y S100-A9 mientras que para EMMPRIN se ha descrito específicamente la unión de este receptor al dímero de S100-A9 (63), y teniendo en cuenta que los resultados obtenidos por nuestro grupo muestran como proteína de interés en la progresión leucémica a S100-A9, pero no a S100-A8 es que nuestros estudios se comenzaron a focalizar en el receptor EMMPRIN. Además de ello existen numerosos trabajos mostrando que la expresión EMMPRIN se encuentra elevada en células tumorales humanas, relacionando esta expresión con la invasión tumoral, metástasis, angiogénesis y resistencia a tratamiento (74). Asimismo, se ha visto que la interacción S100-A9/EMMPRIN promueve la metástasis en melanoma (63).

En este contexto, las diferentes funciones de S100-A9 modulando las enfermedades inflamatorias, la respuesta inmune y el desarrollo tumoral, así como su capacidad de unirse a distintos receptores, han señalado a esta proteína como un blanco terapéutico en humanos. En consecuencia, se han desarrollado distintos inhibidores (Quinoline-3-Carboxamidas) conocidos como compuestos Q (75). Muchos de ellos han sido utilizados en diferentes ensayos clínicos: el *Laquinimod* para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple (76,77), el *Paquinimod* para el Lupus Eritematoso Sistémico (78) y el *Tasquinimod* en la terapia del cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (79). Según nuestro conocimiento, estos inhibidores aún no se han evaluado en LLC.

Específicamente tasquinimod ha reportado múltiples efectos sobre el microambiente tumoral, su mecanismo de acción se basa en bloquear la interacción entre S100-A9 y sus receptores (80,81). Actualmente se encuentra en una etapa avanzada de evaluación clínica como agente anticancerígeno en diferentes neoplasias. Entre los ensayos clínicos en curso, tasquinimod se está estudiando en un ensayo de Fase III en cáncer de próstata metastásico (82) y en un ensayo de Fase II en carcinomas de células hepatocelulares, de ovario, gástricos y renales (83). Más recientemente, su uso en una neoplasia hematológica está siendo evaluado en un ensayo clínico en fase I en Mieloma Múltiple (84).

#### **1.4 Justificación del trabajo final de carrera**

Los antecedentes reflejan el desafío de identificar nuevos blancos terapéuticos que permitan mejorar las terapias existentes y que representen una alternativa para aquellos pacientes que son refractarios a los tratamientos actuales. En este contexto, la interacción del clon leucémico con el microambiente tumoral juega un papel fundamental. Por esta razón, lograr una mejor comprensión de las interacciones entre el linfocito B de LLC y su microambiente podría ayudar a dilucidar nuevos blancos terapéuticos. La obtención de nuevas moléculas a ser probadas específicamente en aquellos pacientes refractarios o resistentes a las drogas de última generación (Ibrutinib, Venetoclax, Idelalisib, etc) podrían ayudar a la cura de esta enfermedad, que actualmente sigue considerándose incurable. Dado que S100-A9 aparece como un jugador clave en las interacciones con el TME y se sugiere un importante papel para esta proteína en la progresión leucémica este trabajo final de carrera tiene como objetivo evaluar el rol de S100-A9 en la progresión tumoral y estudiar la posibilidad de que esta proteína sea considerada como un nuevo blanco terapéutico en la LLC, a través del uso de inhibidores como el Tasquinimod.

## Objetivos

---

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el rol de la proteína S100-A9 en la Leucemia Linfoide Crónica a través de la caracterización molecular de los receptores EMMPRIN y RAGE, y la activación de la vía de señalización PI3K/AKT en el clon leucémico.

### 2.2 Objetivos específicos:

1. Caracterización de los receptores de la proteína S100-A9 (RAGE y EMMPRIN) en el clon leucémico de pacientes con LLC y en donantes sanos.
2. Evaluación de la vía de señalización PI3K/AKT luego de la activación con la proteína S100-A9 en células de pacientes con LLC.
3. Inhibición de la proteína S100-A9 con Tasquinimod y evaluación de la vía de señalización PI3K/AKT en células de pacientes con LLC.

## Metodología

---

### 3.1 Soluciones y medio de cultivo

**Rojo ponceau:** Para preparar una solución de 100 mL se utilizó: 0,5% Rojo ponceau S, 1% Ácido acético glacial, 99 mL H<sub>2</sub>O destilada.

**Inhibidor de proteasas (10X):** 1 Tableta *cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail* (Roche #11836153001) en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

**Inhibidor de fosfatasas (25X):** 1 Tableta *PhosSTOP™* (Roche #04906845001) en 2 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución de *stripping*:** 7 M de guanidina, H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución monobásica de fosfato de sodio 0,5M:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5M, H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución dibásica de fosfato de sodio 0,5M:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5M, H<sub>2</sub>O destilada.

**Solución Ficoll-Histopaque®-1077:** Solución isotónica de Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich). Solución de polisucrosa y diatrizoato de sodio con una densidad de 1,077 g/L.

**Medio de cultivo RPMI completo:** Medio de cultivo RPMI con 1% HEPES, 1% piruvato de sodio, 1% antibióticos (penicilina y estreptomicina), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

### 3.2 Buffers

**Buffer fosfato salino (PBS) 10X:** Solución preparada con NaCl 0,138 M, KCl 0,027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078 M y KHPO<sub>4</sub> 0,015 M, pH 7,4.

**Buffer fosfato de sodio 0.5M:** La solución dibásica de fosfato de sodio 0,5M se lleva a un pH de 7,5 agregando la cantidad necesaria de la solución monobásica de fosfato de sodio 0,5M, pH 7.5.

**Buffer de lisis celular RIPA:** Solución preparada con NaCl 150 mM, Tris HCl 25 mM pH 8, 1% NP-40 1%, 0,1% SDS, 1% *Dexycolate*.

**Buffer de electroforesis 10X:** Solución preparada con 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3.

**Buffer de carga Laemmli 6X:** Solución preparada con *Buffer* Tris base-HCl 300 mM pH 6,8, 12% SDS, 30% glicerol, 0,6% azul de bromofenol y ditiotretitol 600 mM.

**Buffer Tris-glicina 10X:** Solución preparada con 25 mM Tris, 192 mM Glicina, pH 8.3.

**Buffer transferencia húmeda 1X:** Solución preparada con 10% *Buffer* Tris-glicina 10X, 10% etanol 95%, H<sub>2</sub>O destilada

**Buffer PBS 1X-Tween 20 0.3%:** Solución preparada con 10% *Buffer* PBS 10X, 0,3% Tween 20, H<sub>2</sub>O destilada.

**Buffer de fijación celular:** Solución preparada con 4% PFA, PBS 1X.

**Buffer de permeabilización celular PBS-Saponina:** Solución preparada con 0,5% Saponina 4% SFB, PBS 1X.

### 3.3 Anticuerpos

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en citometría de flujo

Anticuerpo	Compañía	Clon	Fluorocromo	Dilución
Anti-IgM	Jackson #709116073	Policlonal	PE	1:50

Anti-CD5	Biolegend #300606	UCH2	FITC	1:50
Anti- RAGE	Santa Cruz #5563	H-300	No conjugado	1:4
Anti-conejo IgG (Ac. secundario)	Invitrogen #A10523	Policlonal	APC	1:1000
Anti- EMMPRIN	Biolegend #306216	HIM6	PE/Cy7	1:10
Anti-pAKT (ser473)	Invitrogen #17-9715-42	SDRNR	APC	1:200
Isotipo ratón IgG2a, k	Invitrogen #17-4015-82	Policlonal	APC	1:200

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Compañía</b>	<b>Clon</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>
Anti-EMMPRIN (CD147)	Santa Cruz #21746	8D6	Ratón	1:100
Anti-EMMPRIN (CD147)	Abcam #ab108308	EPR4053	Conejo	1:100
Anti-ratón IgG HRP (Ac. secundario)	Santa Cruz #525409	-	Proteína recombinante de ratón	1:5000
Anti-GAPDH	Abcam #ab37168	Policlonal	Conejo	1:5000
Anti-conejo IgG HRP (Ac. secundario)	Sigma- Aldrich #A0545	Policlonal	Cabra	1:5000

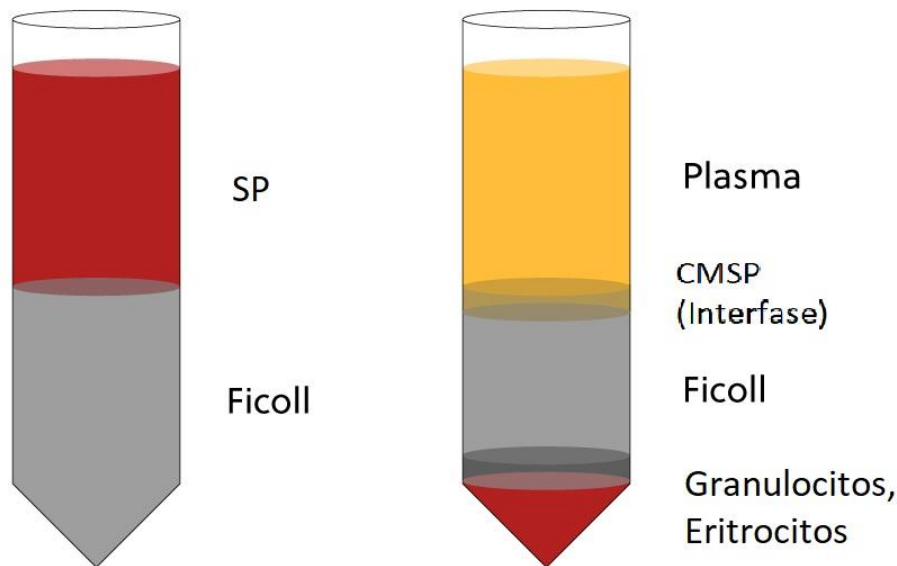
### **3.4 Procedimientos generales**

#### **3.4.1 Muestras de pacientes con LLC**

Las muestras utilizadas en el presente trabajo final de carrera provienen de pacientes atendidos en los servicios de Hematología del Hospital Maciel, contando con la aprobación del comité de ética de la investigación del Hospital Maciel. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado, de acuerdo con las regulaciones éticas de Uruguay y de la Declaración de Helsinki. El diagnóstico de LLC se basó en características celulares e inmunofenotípicas, de acuerdo con las guías de diagnóstico vigentes. Las características clínicas específicas de cada paciente se encuentran en el Anexo.

#### **3.4.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

El proceso de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se realizó en esterilidad en cámara de flujo laminar. Las células mononucleares fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica con heparina (20 ml). Se traspasó la SP a tubos *Falcon*® de 50 mL, se agregó PBS 1X en una relación 1:1 y se mezcló por inversión. Se agregaron 5 mL de solución Ficoll-Histopaque a tubos *Falcon*® de 15 mL, y se traspasaron 10 mL de la dilución de SP-PBS 1X a cada tubo, en una relación de 1:2, despacio con cuidado de no mezclar. Este gradiente fue centrifugado a 600 rcf durante 30 minutos a temperatura ambiente (configurando la centrífuga sin aceleración ni freno). Luego, con una pipeta de 5 mL se recogió la interfase de CMSP y se pasó a otro tubo *Falcon*® de 50 mL. La fracción de plasma se recupera en un tubo *Falcon*® de 15 mL y se almacena a -80°. Al tubo *Falcon*® conteniendo las CMSP se le agregó PBS 1X hasta completar el tubo y se centrifugó 8 minutos a 400 g. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20-30 mL de PBS 1X (dependiendo del *pellet* observado), en este paso se toma un volumen de 10 µL para el recuento celular. Las muestras de CMSP se dividieron en tubos *Falcon*® de 15 mL según la cantidad a congelar y se centrifugaron 5 min a 400 rcf a temperatura ambiente. Finalmente se descartó el sobrenadante, se procedió a criopreservar las muestras resuspendiendo el *pellet* en 90% SFB 10% DMSO, se dividió el volumen entre los crioviales y se colocaron en el recipiente de congelación Mr. Frosty™ (Thermo Scientific), almacenadas a -80°C y posteriormente en nitrógeno líquido.



**Figura 3. Representación del aislamiento de CMSP por gradiente de Ficoll-Histopaque.** A) Gradiente previo a centrifugar B) Gradiente luego de centrifugar. Se observa la separación por gradiente de densidad. Las CMSP se encuentran en la interfase situada entre el plasma y el Ficoll. Por último, en el sedimento se encuentran los eritrocitos y polimorfonucleares.

### 3.4.3 Descongelado de CMSP

Los pacientes fueron divididos en dos grupos: (1) progresores, caracterizados por tiempo de duplicación de linfocitos <6 meses, tratamiento requerido dentro de los primeros 3 años, expresión de AID y estado mutacional de IGVH No mutado (U-LLC), y (2) indolentes, caracterizados por tiempo de duplicación de linfocitos >4 años, no requieren tratamiento después de 4 años, estado mutacional de IGVH mutado (M-LLC) y ausencia de AID.

Todo el proceso de descongelado de crioviales conteniendo CMSP de pacientes con distinta evolución clínica (indolentes y progresores) almacenados en tanques con nitrógeno líquido se realizó en esterilidad en cámara de flujo laminar. Se comenzó termostatazando el medio RPMI completo a 37°C, y el contenido de los viales se resuspendió rápidamente en 10 mL de este medio para evitar la muerte celular debido al DMSO utilizado para el congelado de las células. Posteriormente las muestras se centrifugaron 8 minutos a 400 rcf, y se descartó el sobrenadante. En este punto existían dos alternativas dependiendo del experimento a realizarse con las células. Para los experimentos relacionados con proteínas, se procedió a resuspender las células en 1 mL de PBS 1X, y en este paso se tomó un pequeño volumen para realizar el conteo de células y

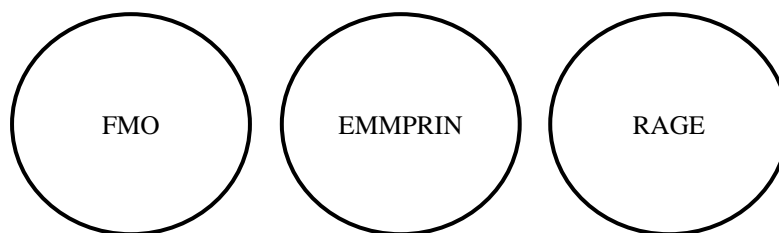
viabilidad celular. El conteo se realizó empleando una dilución 1:2 con *Trypan blue* (colorante que se incorpora en la membrana de las células muertas tiñéndolas de azul, funcionando como método de exclusión) y utilizando la cámara de malassez en el microscopio o el contador automático *Countess™ 3 FL Automated Cell Counter* (Invitrogen #AMQAF2000). Las células se centrifugaron nuevamente 8 minutos a 400 rcf, y como último paso de la preparación de muestras para proteínas se retiró el sobrenadante en su totalidad con el fin de obtener *pellet seco* de células.

Por otro lado, si el objetivo era mantener las células en cultivo para los ensayos de activación con S100-A9, luego de descartar el sobrenadante se resuspendieron en 1 mL medio de cultivo RPMI completo, se tomó un pequeño volumen para realizar el conteo de células como se explicó anteriormente, y se prosiguió con el protocolo de cultivo celular que será explicado más adelante.

### 3.5 Caracterización de los receptores de la proteína S100-A9 (RAGE, EMMPRIN)

#### 3.5.1 Citometría de flujo

Para realizar el marcaje de los receptores por citometría de flujo se trabajó en placas de 96 pocillos. Se colocaron un aproximado de 300.000 células en cada pocillo, se centrifugó a 400 g por 5 minutos y se realizó un lavado con PBS 1X.



**Figura 4. Pocillos empleados para el marcaje para citometría de flujo de EMMPRIN y RAGE.**

A continuación, las muestras se resuspendieron en 100  $\mu$ L del marcador de viabilidad *Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit* (BioLegend #423101) 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. Los anticuerpos utilizados para el marcaje extracelular de las distintas poblaciones celulares en este experimento fueron: anti-CD5-FITC que reconoce las moléculas CD5 que se expresan específicamente en células B leucémicas, de

manera de poder identificar el clon tumoral caracterizado por células CD5+, anti-IgM-PE, anti-EMMPRIN-PE Cy7 y anti-RAGE. Para esto se resuspendió el *pellet* celular con los respectivos anticuerpos de superficie diluidos en PBS 1X a la concentración indicada según correspondía (Ver tabla 4). Las muestras se incubaron 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X, se resuspendieron los pozos correspondientes a EMMPRIN en 150 µL de PBS 1X y se traspasó su contenido a tubos conteniendo 150 µL de PBS 1X. Se continuó el marcaje de RAGE ya que el anticuerpo primario utilizado no está conjugado a un fluorocromo, por lo que fue necesario agregar un anticuerpo secundario. Para esto se incubaron los pozos respectivos a RAGE con el anticuerpo secundario anti-conejo-APC por 30 min a 4°, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X y, por último, se resuspendió cada pozo con 150 µL de PBS 1X y se traspasó a tubos conteniendo 150 µL de PBS 1X.

Paralelamente se prepararon perlas *UltraComp eBeads™ Compensation Beads* (Invitrogen #01-2222-41) que fueron utilizadas para realizar la compensación de la fluorescencia, esto permite corregir la superposición que generan los espectros de emisión de los fluorocromos. Cada gota de perlas contiene dos poblaciones: una población positiva que captura cualquier anticuerpo y una población negativa que no reaccionará con el anticuerpo, por lo tanto, cuando se añade un anticuerpo conjugado con un fluorocromo a las perlas, se obtienen una población positiva y otra negativa. Se utilizaron las perlas marcadas con anticuerpos conjugados a: APC, PE, FITC y *Pacific blue*.

Las adquisiciones fueron realizadas en el citómetro Attune NXT (Invitrogen #A24858). Este equipo posee 4 láseres: 488 nm (azul), 638 nm (rojo), 405 (violeta) y 561 (amarillo). Se utilizaron los siguientes filtros: 450/40 para la detección de *Zombie Aqua*, 530/30 para CD5 y 585/15 para IgM. En cuanto a los receptores se utilizaron los filtros 670/14 para la detección de RAGE y el 780/60 para la detección de EMMPRIN. El análisis de datos se realizó en el software *FlowJo* Versión 10 (FlowJo, LLC).

## **3.5.2 Ensayos de Western Blot**

### **3.5.2.1 Extracción de proteínas**

A partir del *pellet* celular seco se comenzó la extracción de proteínas. El *pellet* se resuspendió en *buffer* de lisis celular RIPA al cual se le añadió inhibidor de proteasas y fosfatasa, calculando la cantidad óptima de *buffer* RIPA dependiendo del número de células, pipeteando repetidas veces para lograr la homogeneización. Posteriormente, para llevar a cabo la lisis y la extracción proteica se utilizó un homogeneizador ultrasónico equipado con un sonotrodo de micro-punta, sometiendo a las muestras a un pulso ultrasónico de amplitud 30% en un modo de ciclo de ultrasonidos de 15 seg. sonicación y 10 seg. de descanso, con 4 pulsos en total. Luego se procedió a centrifugar a 13.500 rcf por 15 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante (fracción soluble) donde se encuentran las proteínas. Se almacenaron a -20 hasta su utilización.

### **3.5.2.2 Cuantificación de proteínas**

Se determinó la concentración de proteína de cada muestra mediante el ensayo de proteína Pierce BCA (Thermo Scientific™ #23227). El fundamento de este método consiste en la reacción entre las proteínas con iones  $\text{Cu}^{2+}$  en un medio básico. Esta reacción da lugar a iones  $\text{Cu}^+$ , los cuales al reaccionar con el BCA dan lugar a un complejo coloreado violeta cuyo pico de absorbancia se encuentra a 562 nm, permitiendo determinar la concentración de proteínas mediante espectrofotometría UV-visible.

La cuantificación se realizó en placas de 96 pocillos, utilizando una curva estándar de concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) entre 0,1-1 mg/ml. Una vez sembrada la placa, se protegió de la luz con papel aluminio y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Y como se mencionó, la medición se realizó en lector de placas midiendo absorbancia a 562 nm. Los datos obtenidos (absorbancia) fueron analizados con el software de Microsoft Excel, graficando la curva estándar y realizando un ajuste lineal de manera de obtener la ecuación del gráfico. A partir de la ecuación se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras evaluadas, y se calculó la concentración proteica de cada una de ellas. Una vez determinada la concentración que poseía cada muestra, estas se diluyeron en *buffer* de carga Laemmli para SDS-PAGE y se calentaron a 95°C durante 10 min, para favorecer la desnaturalización de las proteínas y reducir

los enlaces de disulfuro. Las muestras desnaturalizadas en *buffer* de carga fueron almacenadas a -20° C hasta su utilización.

### 3.5.2.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para realizar la electroforesis SDS-PAGE se prepararon geles de poliacrilamida SDS al 10%. La preparación de los geles separador y concentrador se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de las tablas A8-9 y A8-10 respectivamente del libro *Antibodies: A Laboratory Manual* (Harlow, E. and Lane, D). Se sembraron un total de 50 µg de lisado de proteínas por carril, y se añadió el marcador de peso *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, 10 a 180 kDa (Thermo Scientific™ #26616). Se corrió utilizando el *buffer* de electroforesis el cual contiene Tris (para mantener el pH), Glicina (conductor de electricidad) y SDS (mantiene las proteínas cargadas negativamente), fijando la corriente eléctrica en 25 mA constantes por gel, por aproximadamente 2 hs. El progreso en el gel se monitorizó observando el frente de corrida y la posición del marcador de peso, deteniendo la corrida al visualizar que el frente alcanzara el final del gel.

### 3.5.2.4 Western Blot

Finalizada la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia húmedo con *buffer* de transferencia 1X, durante 1:30 h a una corriente eléctrica constante de 150 mA. Para confirmar la correcta transferencia de proteínas se tiñó la membrana con rojo ponceau, colorante general de proteínas, lo que permite confirmar la transferencia de proteínas a simple vista. Se lavó la membrana con agua destilada para eliminar el exceso de tinción del rojo ponceau y se acabó de desteñirla con PBS 1X. A continuación, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 0.3% durante 1 hora a 37° para eliminar las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo. Una vez bloqueada la membrana se dejó incubando durante la noche a 4° C con el anticuerpo primario anti-EMMPRIN (1:100) diluido en leche descremada al 3% en PBS-Tween 20 0.3% bajo agitación suave constante. Posteriormente se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS-Tween 20 0.3% en agitación. A continuación, se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP (Tabla 4) a una dilución de 1:5000 por 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se repite el ciclo de 5 lavados con PBS-Tween 20 0.3% y se procede al revelado por quimioluminiscencia. Para esto la membrana se incubó en la solución

reactiva que contiene los sustratos de la peroxidasa de rábano provenientes de *Super Signal West Pico Chemiluminescent Kit* (Thermo Scientific™ #34080), y se emplea siguiendo las indicaciones del fabricante. Acabada la incubación con el sustrato (1 minuto), se retiró el exceso de sustrato y la señal de quimioluminiscencia se registró utilizando el fotodocumentador *Image Quant 800* (Amersham).

Una vez obtenida las imágenes para EMMPRIN como control de carga proteica se analizó la expresión de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Para esto se realiza el protocolo de *stripping* incubando la membrana con 7 M de cloruro de guanidina durante 7 min en agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 2 min con PBS-Tween 20 0.3% en agitación, se bloqueó de la membrana con 5% leche descremada en PBS-Tween 20 0.3% por 1 h a 37°C, y se retoma el protocolo desde este punto utilizando el anticuerpo anti-GAPDH y posteriormente el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (Tabla 4).

Para estimar en modo semi-cuantitativo los experimentos de Western Blot se realizó densitometría. Para esto, la intensidad óptica de las bandas correspondientes a la señal de interés fue cuantificada utilizando el programa ImageJ 1.50b (<http://imagej.nih.gov/ij>). Donde se delinea un área rectangular que abarque todas las bandas de interés y se obtiene una gráfica que representa el nivel de grises a lo largo del rectángulo seleccionado. El valor correspondiente a cada banda se obtiene separando los picos específicos de cada una y eliminando el *background*. Finalmente, los valores de las señales obtenidas de EMMPRIN se dividen por los valores de la señal obtenida de GAPDH, obteniéndose un valor de cantidad relativa. Posteriormente, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism* (versión 9), la significancia estadística se determinó utilizando el test no paramétrico *Mann Whitney test* para comparar entre muestras no pareadas. *P* valores  $\leq 0,05$  fueron considerados significativos.

### **3.5.2.5 Ensayo de desglicosilación de proteínas**

Con el fin de estudiar las glicosilaciones de EMMPRIN se llevó a cabo un ensayo de desglicosilación desnaturalizante utilizando la enzima N-glicosidasa F, conocida como PNGasa F (Promega #V4831) siendo uno de los métodos más eficaces y sencillos para eliminar prácticamente todas las N-glicosilaciones de las glicoproteínas. Para realizar el ensayo se siguieron las indicaciones del fabricante. Se partió de 20  $\mu$ g de lisado de proteínas contenidos

en *buffer* RIPA, al cual se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de SDS 5% y 1  $\mu\text{L}$  de 1M DTT, y se procedió a desnaturalizar la muestra calentando a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min. A continuación, se dejó enfriar la muestra por 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de *buffer* sodio fosfato 0.5M (pH 7.5), 2  $\mu\text{l}$  de NP-40 10% y 2  $\mu\text{l}$  de PNGasa F obteniendo un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , y se incubó por 3 hs a  $37^{\circ}$ . Por último, luego de la incubación se agrega el *buffer* de carga a la muestra y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El producto de la desglicosilación se visualiza realizando un Western Blot tal como se explica anteriormente.

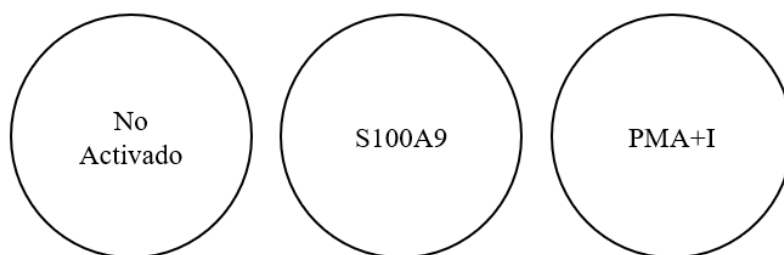
### **3.6 Ensayos de activación e inhibición celular**

Los ensayos de activación e inhibición celular se realizaron en esterilidad en cámara de flujo laminar. Teniendo en cuenta la concentración celular obtenida luego del descongelado de las células, estas se ajustaron a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células/mL en medio RMPI completo. En todos los tratamientos aplicados, las células se sembraron en placas de cultivo de 48 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/pozo por condición. Las células se mantuvieron en un incubador con una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  y una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 72 hs.

#### **3.6.1 Activación de células leucémicas con S100-A9**

Para estudiar la fosforilación de AKT en las células leucémicas de pacientes luego de la activación con S100-A9 se realizaron tres condiciones:

- No activado: células no tratadas.
- S100-A9: se colocaron 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de esta proteína recombinante humana comercial (Mybiosource #MBS959475).
- Control de estimulación Forbol-12-mirístato-13 acetato (PMA)+ionomicina (I): PMA se utilizó diluida 1:1000 agregando 5  $\mu\text{L}$  por pozo, obteniendo una concentración final de 50 ng/mL. La ionomicina se utilizó diluida 1/100, agregando 2,5  $\mu\text{L}$  por pozo, 100 a una concentración final de 1 ng/mL.



**Figura 5. Pocillos empleados para el ensayo de activación con S100-A9.**

### 3.6.2 Inhibición con tasquinimod

Con el fin de estudiar el efecto inhibitor de tasquinimod sobre la fosforilación de AKT, las células leucémicas de pacientes fueron tratadas con una concentración del inhibidor de 10 nM.

Para este ensayo se sembraron las siguientes condiciones:

- No activado: se agregaron 20  $\mu$ l DMSO (vehículo de la droga) diluido 1:100 en medio RPMI completo al igual que fue diluido el Tasquinimod.
- S100-A9: Se colocaron 10  $\mu$ g/mL de esta proteína humana comercial (Mybiosource #MBS959475).
- S100-A9+Tasquinimod (MedKoo #202852): Se incubó previamente 30 min a 37° la mezcla de S100-A9 comercial (10  $\mu$ g/mL) y tasquinimod diluido 1:100 (concentración final de 10 nM), y se agrega la mezcla a los pozos correspondientes.
- Control de estimulación PMA/ionomicina: PMA se utilizó diluida 1:1000 agregando 5  $\mu$ L por pozo, obteniendo una concentración final de 50 ng/mL. La ionomicina se utilizó diluida 1, agregando 2,5  $\mu$ L por pozo, 100 a una concentración final de 1 ng/mL.



**Figura 6. Pocillos empleados para el ensayo de inhibición con tasquinimod.**

### 3.6.3 Evaluación de la fosforilación de AKT por citometría de flujo

Posteriormente, la determinación de la fosforilación de pAKT en la población celular de interés se realizó por citometría de flujo. Para esto las células leucémicas tratadas en cultivo se colocaron en placas de 96 pocillos, colocando 150  $\mu$ L (aproximadamente 300.000 células) de cada condición en un respectivo pozo, luego fueron centrifugadas a 1700 rpm por 5 minutos y se realizó un lavado con PBS 1X.



**Figura 7. Pocillos empleados para el marcaje por citometría de flujo para la evaluación de la fosforilación de AKT.** El pocillo no activado permitió estudiar si existe una diferencia entre las células no activadas y aquellas estimuladas con S100-A9. El control positivo consistió en una estimulación de las células con PMA e ionomicina.

A continuación, las muestras se resuspendieron en 100  $\mu$ L del marcador de viabilidad *LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit (Invitrogen # L34955)* 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 el anticuerpo CD5-FITC (Tabla 4), marcador de superficie de las células B leucémicas. Para esto se resuspendió el *pellet* celular en 20  $\mu$ L del anticuerpo diluido en PBS 1X 1:50 y se incubó por 30 min a 4°C. Luego de la incubación se realizaron 2 lavados con PBS 1X y prosiguió a realizar la fijación y permeabilización celular. Para la fijación de las células cada pocillo se resuspendió en 150  $\mu$ L de 4% paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich #158127) en PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente y, luego de un lavado con PBS 1X, se permeabilizaron con 150  $\mu$ L del *buffer* de permeabilización PBS-Saponina durante 10 minutos a 4°C, y se centrifugó a 1700 rpm por 5 min. A continuación, se realizó el marcaje intracelular con los anticuerpos: isotipo anti-ratón APC, anti-IgM PE y anti-pAKT<sup>(Ser 473)</sup> APC (Tabla 4). Se resuspendió el *pellet* con el anticuerpo correspondiente diluido en el *buffer* PBS-Saponina según correspondía (Tabla 4) y se incubó por 30 min a 4°C. Luego de la incubación se realizaron 2 lavados con *buffer* PBS-

Saponina, se resuspendieron los pozos en 150  $\mu$ L de PBS 1X y se traspasó su contenido a tubos conteniendo 150  $\mu$ L de PBS 1X.

Paralelamente se prepararon perlas *UltraComp eBeads™ Compensation Beads* (Invitrogen #01-2222-41) que fueron utilizadas para realizar la compensación de la fluorescencia. Se utilizaron las perlas monomarcadas con los anticuerpos conjugados con APC, PE, FITC y *Pacific Blue*.

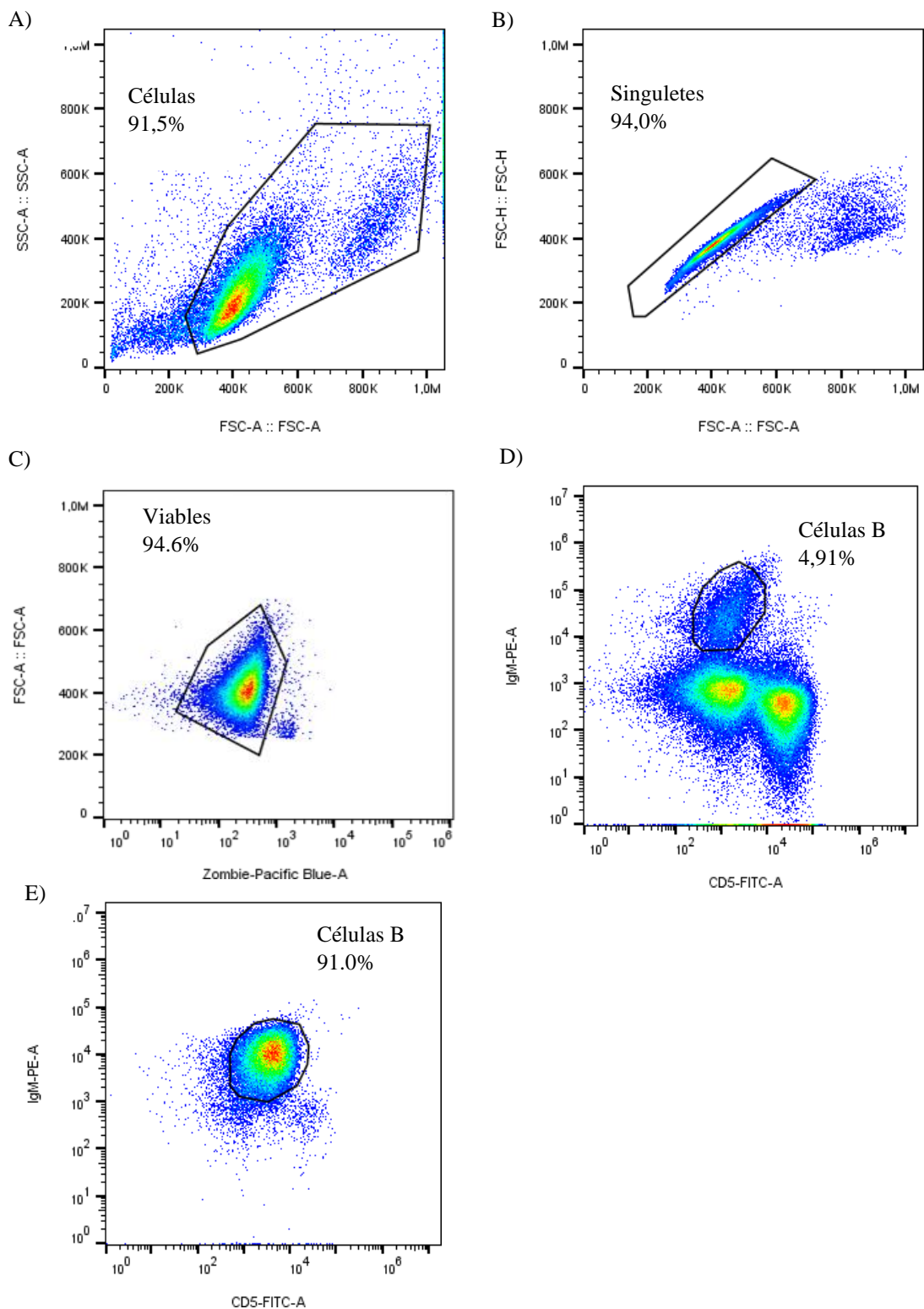
Las adquisiciones fueron realizadas en el citómetro Attune NXT (Invitrogen #A24858). Se utilizaron los siguientes filtros: 450/40 para la detección de *LIVE/DEAD*, 530/30 para detectar CD5, 585/15 para detectar IgM, y 670/14 para la detección del isotipo y pAKT. El análisis de datos se realizó en el software FlowJo Versión 10 (FlowJo, LLC). Posteriormente, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software *GraphPad Prism* (versión 9).

### 4.1 Caracterización de los receptores de S100-A9: RAGE y EMMPRIN

#### 4.1.1 Análisis de la expresión de RAGE y EMMPRIN por citometría de flujo

El primer objetivo de este trabajo final de carrera consistió en caracterizar la expresión de los receptores de la proteína S100-A9: RAGE y EMMPRIN. Para ello se comenzó estudiando su expresión en células B de pacientes con LLC y donantes sanos mediante citometría de flujo. Para este ensayo se utilizaron CMSP de estos individuos, las cuales fueron marcadas con los anticuerpos: anti-CD5, anti-IgM, Anti-RAGE y Anti-EMMPRIN.

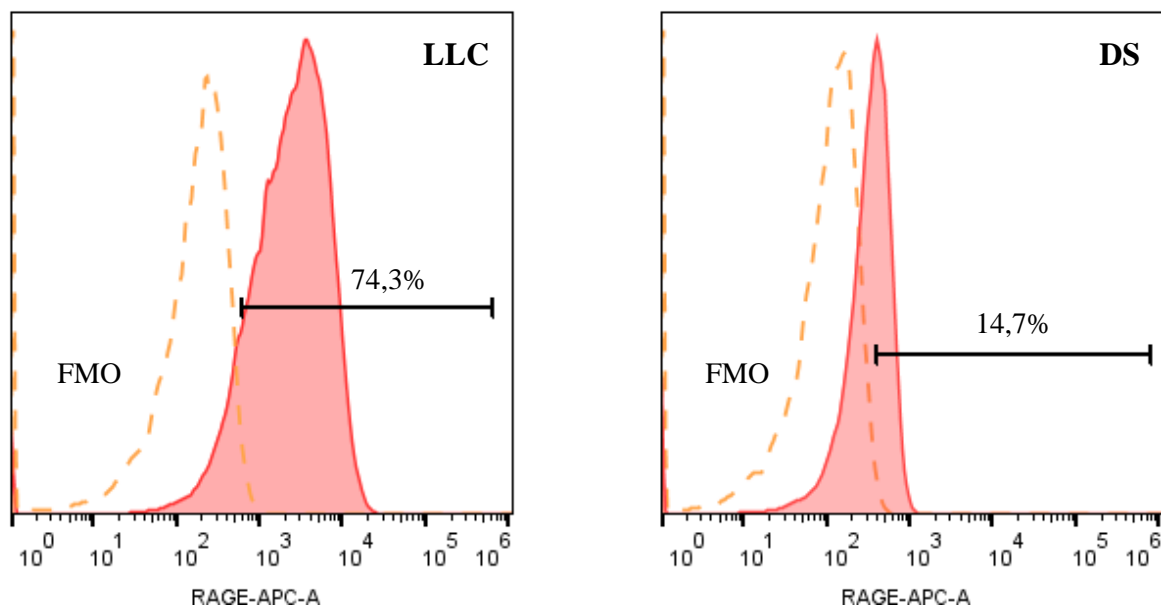
A continuación, en la figura 8 se presenta la estrategia de *gating* utilizada para el análisis de los datos. Se separó la población de linfocitos en función del tamaño y granularidad, eliminando los restos celulares y los dobletes. Con el marcador de viabilidad *Zombie aqua* se seleccionaron aquellas células vivas (“viables”), que como observamos representaban la mayoría (>90%). Para la identificación de las células B se utilizaron anticuerpos anti-IgM y anti-CD5 conjugados directamente a PE y FITC, respectivamente. En la figura 8E puede observarse el clon tumoral de células B (IgM+ CD5+) característico de la LLC, el cual representa prácticamente el total de las células (91%), a diferencia del donante sano donde el porcentaje de linfocitos B IgM+ es de 4,91% (figura 8D). Una vez seleccionada la población de células B en ambos grupos se determinó la expresión de los receptores RAGE o EMMPRIN analizando tanto el porcentaje de células que expresan los receptores, como la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada uno.



**Figura 8. Estrategia de *gating* para los ensayos de expresión de los receptores EMMRPIN y RAGE.** Se muestra un ejemplo de análisis para este ensayo en el software FlowJo (Versión 10). A) En el *dot plot* de Side Scatter (SSC-A) y Forward Side (FSC-A) se seleccionaron las células excluyendo restos celulares. B) Se aplicó dicha región y en el *dot plot* de FSC-A y FSC-H se excluyeron los agregados celulares seleccionando sólo los singuletes (células individuales). C) Seleccionando los singuletes en el *dot plot* de FSC-A y Zombie se seleccionaron aquellas células no marcadas con Zombie, que corresponden a las células

viables. D) Tomando la región de células viables en el *dot plot* de CD5 e IgM se seleccionaron las células B en el donante sano caracterizadas por ser IgM+ E) Se seleccionaron las células B en el paciente de LLC caracterizadas por ser IgM+ CD5+.

Para determinar el porcentaje de células positivas se utilizó como referencia el control de fluorescencia menos uno (FMO) (*Fluorescence Minus One*), para este control se marcaron las células con todos los anticuerpos (CD5-FITC, IgM-PE y Zombie-Pacific Blue) menos el anticuerpo correspondiente al receptor a evaluar. En el caso de EMMPRIN el FMO se realizó marcando las células con todos los anticuerpos conjugados antes mencionados, menos el anticuerpo anti-EMMPRIN-PE Cy7. Debido a que RAGE no se encuentra conjugado a un fluorocromo fue necesario colocar un anticuerpo secundario, por lo que al realizar el control de FMO se procedió como fue descrito antes, pero con la diferencia que fue agregado el anticuerpo secundario anti-conejo IgG-APC. El FMO permite identificar y seleccionar la población positiva. Los resultados se presentan a continuación en las figuras 9 y 10.

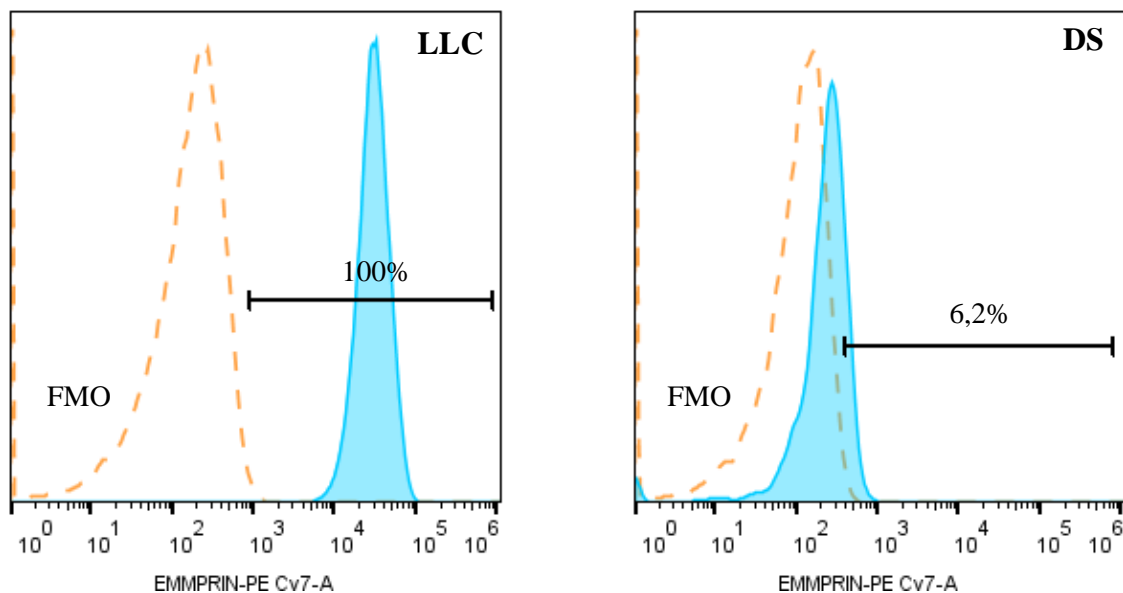


**Figura 9. Histogramas representativos de la expresión de RAGE en un paciente de LLC (LLC) y donante sano (DS).** En rojo se observan los histogramas representando las células marcadas con RAGE, en línea punteada naranja el control de FMO.

En la figura 9 se aprecian los histogramas representativos de la expresión de RAGE en células B tanto en un paciente de LLC y un donante sano (DS). Al analizar el porcentaje de expresión de este receptor vemos que, para el caso de la LLC, se observa mayor porcentaje de células

marcadas con el anticuerpo anti-RAGE (rojo) (74,3%), con respecto al DS donde se observa solo un 14,7%, con respecto al control de FMO.

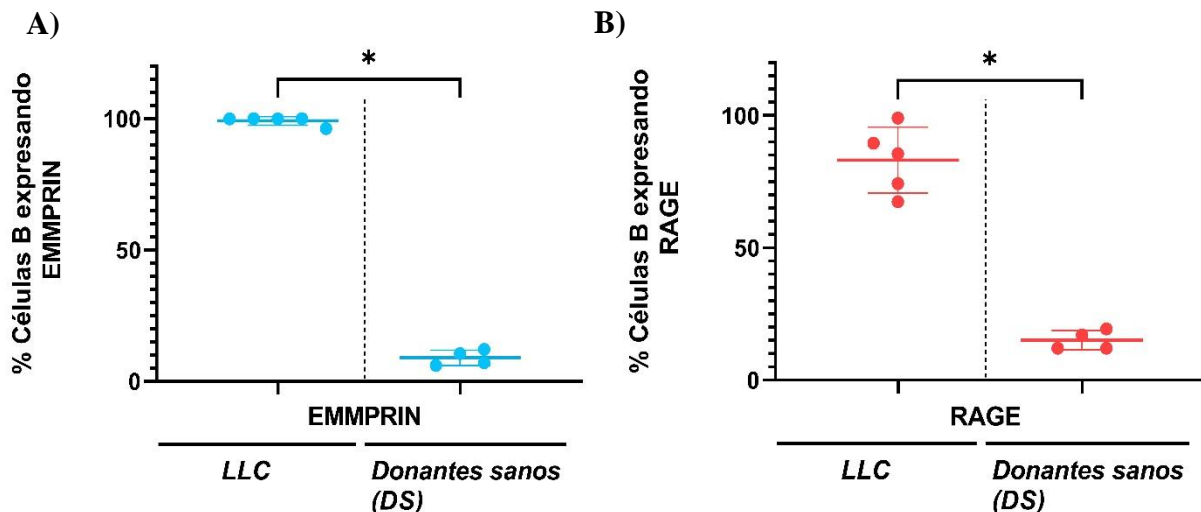
Continuando el análisis para el segundo receptor, la figura 10 muestra los histogramas representativos de la expresión de EMMPRIN en un paciente de LLC y un DS.



**Figura 10. Histogramas representativos de la expresión de EMMPRIN en un paciente de LLC (LLC) y donante sano (DS).** En celeste se observan los histogramas representando las células marcadas con EMMPRIN, en línea punteada naranja el control de FMO.

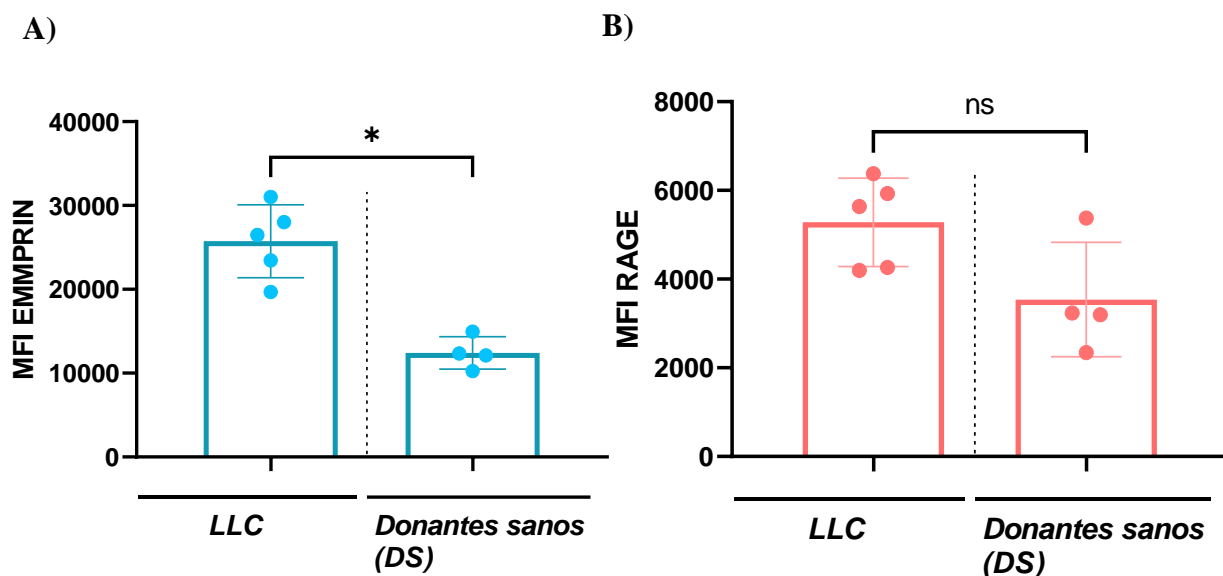
La figura de la izquierda, correspondiente al paciente de LLC, muestra que el 100% de las células expresan este receptor. Por el contrario, la expresión de EMMPRIN en el DS es considerablemente menor, solo un 6,2%, de las células B del DS expresan el receptor. A continuación, en la figura 11 se agrupan los resultados obtenidos del análisis de porcentaje de expresión de los receptores EMMPRIN y RAGE.

En la figura 11 se muestran los niveles de expresión de EMMPRIN y RAGE. Como puede observarse, la comparación del porcentaje de células que expresan ambos receptores entre pacientes con LLC (n= 5) y DS (n= 4) muestran un incremento significativo en las células B tumorales comparadas con células B de los DS.



**Figura 11. Porcentaje de los receptores EMMPRIN y RAGE en células B de pacientes con LLC, y en donantes sanos (DS).** A) Porcentaje de células expresando EMMPRIN B) Porcentaje de células expresando RAGE. Cada punto representa un individuo. Las barras expresan el promedio  $\pm$  SEM, \* indica una diferencia significativa.

Al mismo tiempo, se evaluó la intensidad media de fluorescencia (MFI) para ambos receptores, tanto en los pacientes de LLC como en los donantes sanos. Los resultados se muestran en la figura 12.



**Figura 12. MFI de los receptores EMMPRIN y RAGE en células B de pacientes con LLC, y en donantes sanos (DS).** A) MFI EMMPRIN B) MFI RAGE. MFI: intensidad media de fluorescencia. Cada punto representa un individuo. Las barras expresan el promedio  $\pm$  SEM, \* indica una diferencia significativa.

El análisis de la MFI de EMMPRIN revela una mayor expresión de receptores en las células B de LLC (n=5) en comparación con células B del DS (n=4) obteniendo diferencias significativas (P= 0,0159). Este resultado sumado a que más del 90% de las células B leucémicas expresan este receptor, sugieren una sobreexpresión de esta molécula en pacientes con LLC en comparación con los DS. Por el contrario, para el receptor RAGE no encontramos diferencias significativas en los valores de MFI (entre pacientes con LLC (n=5) y DS (n=4), lo que sugiere que, si bien hay un mayor porcentaje de células que expresan este receptor con respecto al DS, no parecería estar sobreexpresado.

#### **4.1.2 Detección del perfil de glicosilación de EMMPRIN en células de LLC por Western blot**

Continuando con el primer objetivo se decidió estudiar en mayor profundidad el receptor EMMPRIN, que como ha sido mostrado en el punto 3.1.1 se encuentra sobreexpresado en las células B de pacientes con LLC. Para ello decidimos determinar el perfil de glicosilación de este receptor en las células de LLC, ya que, trabajos previos describen que altos niveles de glicosilación, están asociados con la progresión del tumor (90, 91). Según lo reportado esta glicoproteína muestra un Core con un peso aproximado de 27 kDa y dependiendo del grado diferencial de glicosilación se han descrito dos principales glicofomas: 1) altamente glicosilada o “*high glycosylated*” (HG-EMMPRIN) en un rango de ~40-60 kDa, y 2) una forma menos glicosilada o “*low glycosylated*” (LG-EMMPRIN) de aproximadamente 32 kDa (85).

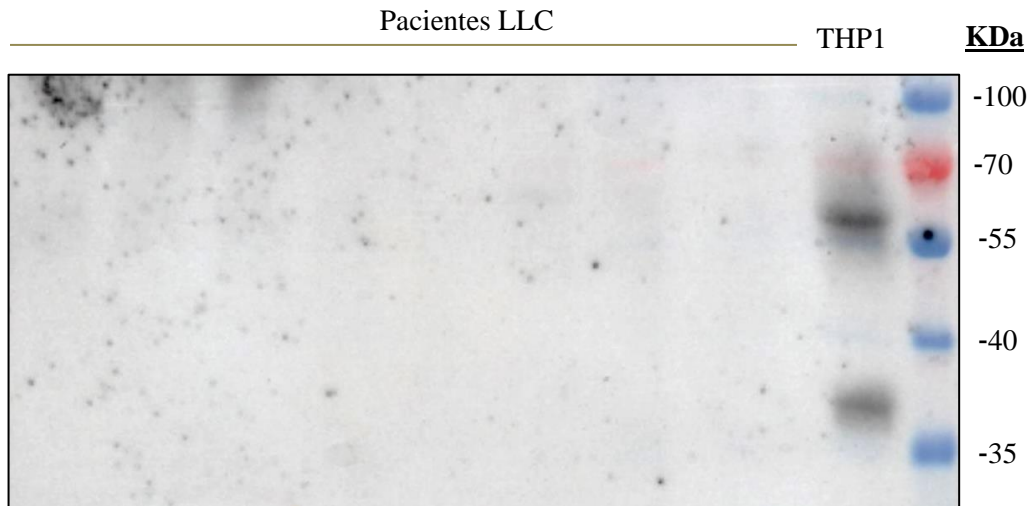
En términos generales el proceso de glicosilación de EMMPRIN comienza cuando el péptido inmaduro (Core) recibe glicosilaciones preliminares en el retículo endoplasmático, formando la forma aún inmadura LG-EMMPRIN, precursor de HG-EMMPRIN. Posteriormente, en el complejo de Golgi LG-EMMPRIN es modificado aún más por una serie de glicosiltransferasas que forman una ramificación compleja de cadenas de carbohidratos, obteniéndose la forma glicosilada madura HG-EMMPRIN que se transloca a la membrana plasmática, y se considera la forma biológicamente funcional de esta proteína (86). Dado que esta glicofoma ha sido asociada con la progresión tumoral, especialmente a través de la inducción y regulación de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), donde HG-EMMPRIN facilita su papel en eventos de carcinogénesis, crecimiento tumoral, invasión y metástasis (87,88). Asimismo, también ha sido asociado a la resistencia a múltiples fármacos en distintas leucemias humanas. Por ejemplo,

Beesley y colaboradores describen que la forma HG-EMMPRIN está estrechamente relacionada con la leucemia linfoblástica aguda y su recaída (89).

#### **4.1.2.1 Puesta a punto de la detección de EMMPRIN por Western Blot**

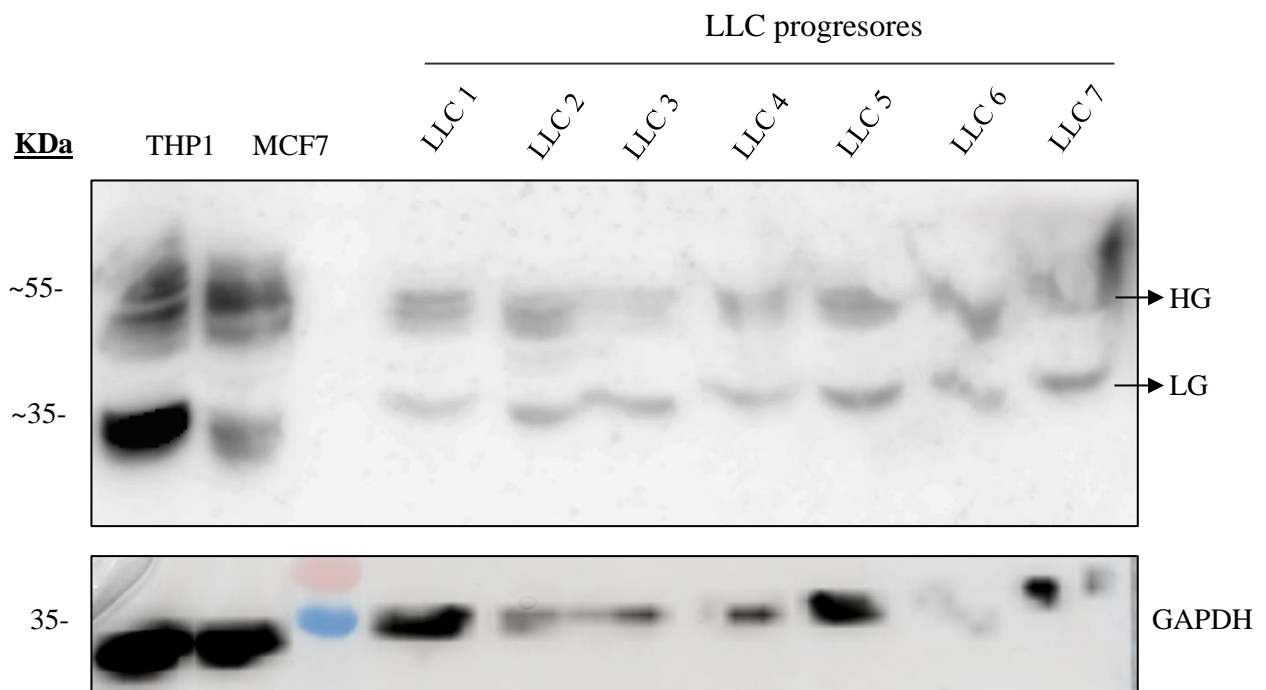
En primer lugar, para estandarizar las condiciones óptimas para la detección de EMMPRIN por Western Blot se realizaron varios experimentos. Se evaluaron distintos anticuerpos, diferente cantidad de proteína a cargar (20-50  $\mu\text{g}$ ), las condiciones de transferencia, y diferentes concentraciones de los anticuerpos primarios (entre 1:50 y 1:500) y secundarios (entre 1:2500 y 1:5000).

En una primera etapa se evaluó la detección de EMMPRIN utilizando un anticuerpo de la compañía Abcam y otro de la compañía Santa Cruz (Tabla 4). Para determinar las diluciones óptimas del uso de estos anticuerpos, se probaron diferentes diluciones de anticuerpo primario: 1:50, 1:100 y 1:500. De igual forma, se probaron los anticuerpos secundarios con diluciones entre 1:2000 y 1:5000. Sin embargo, luego de algunos ensayos con el anticuerpo de Abcam no se detectó ninguna señal en el Western Blot, por lo que se decidió continuar los ensayos de puesta a punto con el anticuerpo de Santa Cruz. Para los ensayos con este anticuerpo se comenzó sembrando un aproximado de 20  $\mu\text{g}$  de lisado de proteínas de CMSP provenientes de pacientes con LLC por carril. Como control positivo para verificar que el anticuerpo primario se une correctamente a la proteína se cargó lisado de proteínas de THP1, línea celular que expresa EMMPRIN. El resultado se muestra a continuación en la figura 13, en la cual, si bien se observa una banda en el carril correspondiente al control positivo, no se observan bandas en los carriles correspondientes a las muestras de pacientes con LLC.



**Figura 13. Western Blot representativo de EMMPRIN en los experimentos de puesta a punto.** Los primeros 8 carriles corresponden a muestras de lisado de proteína de pacientes de LLC, el carril 9 corresponde a lisado de proteínas de THP1 (Control positivo), en el último carril (10) se observa el peso molecular. A un lado se muestran los pesos moleculares en kDa.

Este resultado nos demostró que el anticuerpo era capaz de unirse a la proteína de interés, y que tanto la concentración utilizada del anticuerpo como las condiciones experimentales del ensayo eran correctas, estableciendo las diluciones para las pruebas siguientes: 1:100 del anticuerpo primario anti-EMMPRIN y 1:5000 para el anticuerpo secundario anti-ratón HRP. No obstante, el resultado nos sugirió la necesidad de utilizar una mayor concentración de proteínas (50 µg) con el objetivo de identificar a EMMPRIN en muestras de pacientes. Al mismo tiempo, optimizamos la extracción proteica sometiendo a las muestras a pulsos ultrasónicos (sonicación), lo cual permitió obtener mayor rendimiento en este paso. De este modo, se procedió a realizar los experimentos realizando estas modificaciones. El resultado se muestra en la figura 14, correspondiente a una membrana de Western Blot representativa de los ensayos en condiciones óptimas. Como podemos observar en la figura 14. los dos primeros carriles corresponden a los controles positivos THP1 y MCF7, y los siguientes a muestras de pacientes. Existiendo bandas específicas tanto en los controles positivos de las líneas celulares como en los carriles correspondientes a muestras de pacientes de LLC.



**Figura 14. Western Blot de EMMPRIN.** Los primeros dos carriles corresponden a los controles positivos (THP1 y MCF7). En los carriles siguientes (4-10) se sembraron pacientes de LLC progresores. Se utilizó la proteína GAPDH (35 kDa) como control de carga. A un lado se muestran los pesos moleculares en kDa.

Este Western Blot nos permitió identificar dos bandas específicas en todos los pacientes: una banda a un peso ~55kDa correspondiente con la forma altamente glicosilada (HG), y una segunda de menor peso de ~35kDa correspondiente a la forma poco glicosilada (LG) del receptor EMMPRIN, confirmando la presencia de un perfil de glicosilación en el lisado de proteínas de los pacientes de LLC.

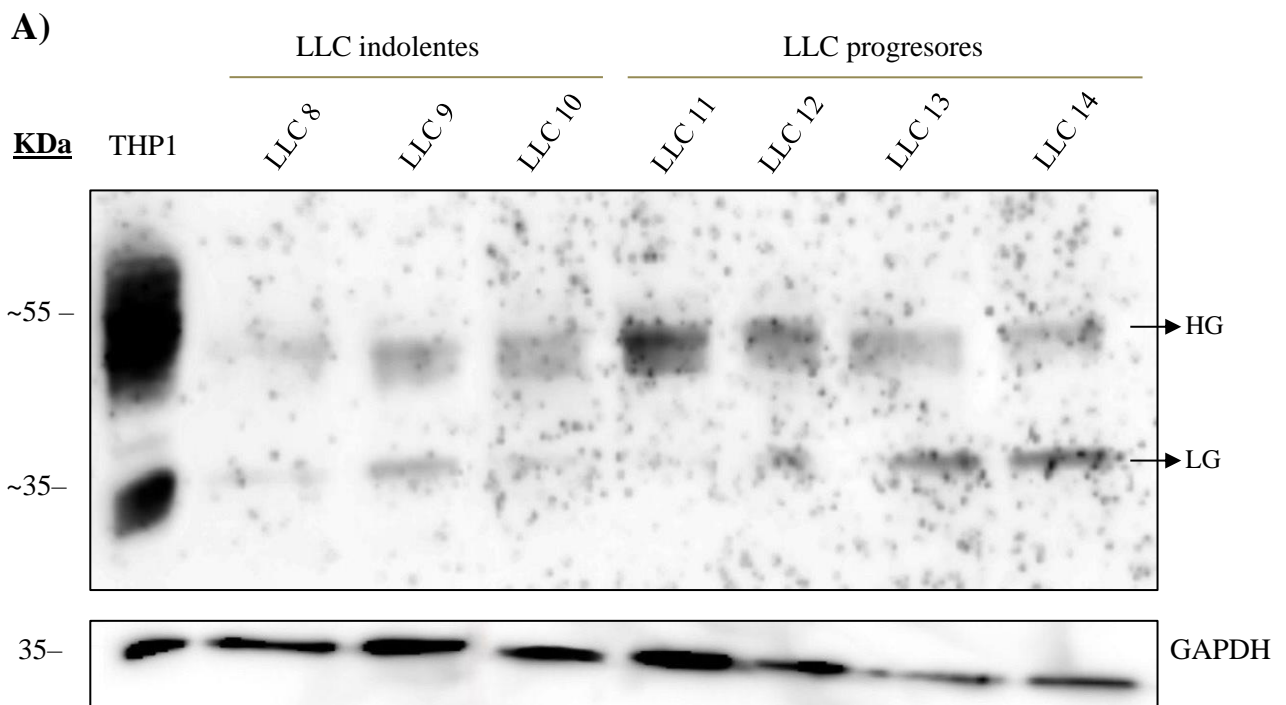
Esta primera parte nos permitió determinar las condiciones óptimas para el ensayo de detección por Western Blot de EMMPRIN, mencionadas en detalle en la sección de metodología (Véase punto 3.5.2).

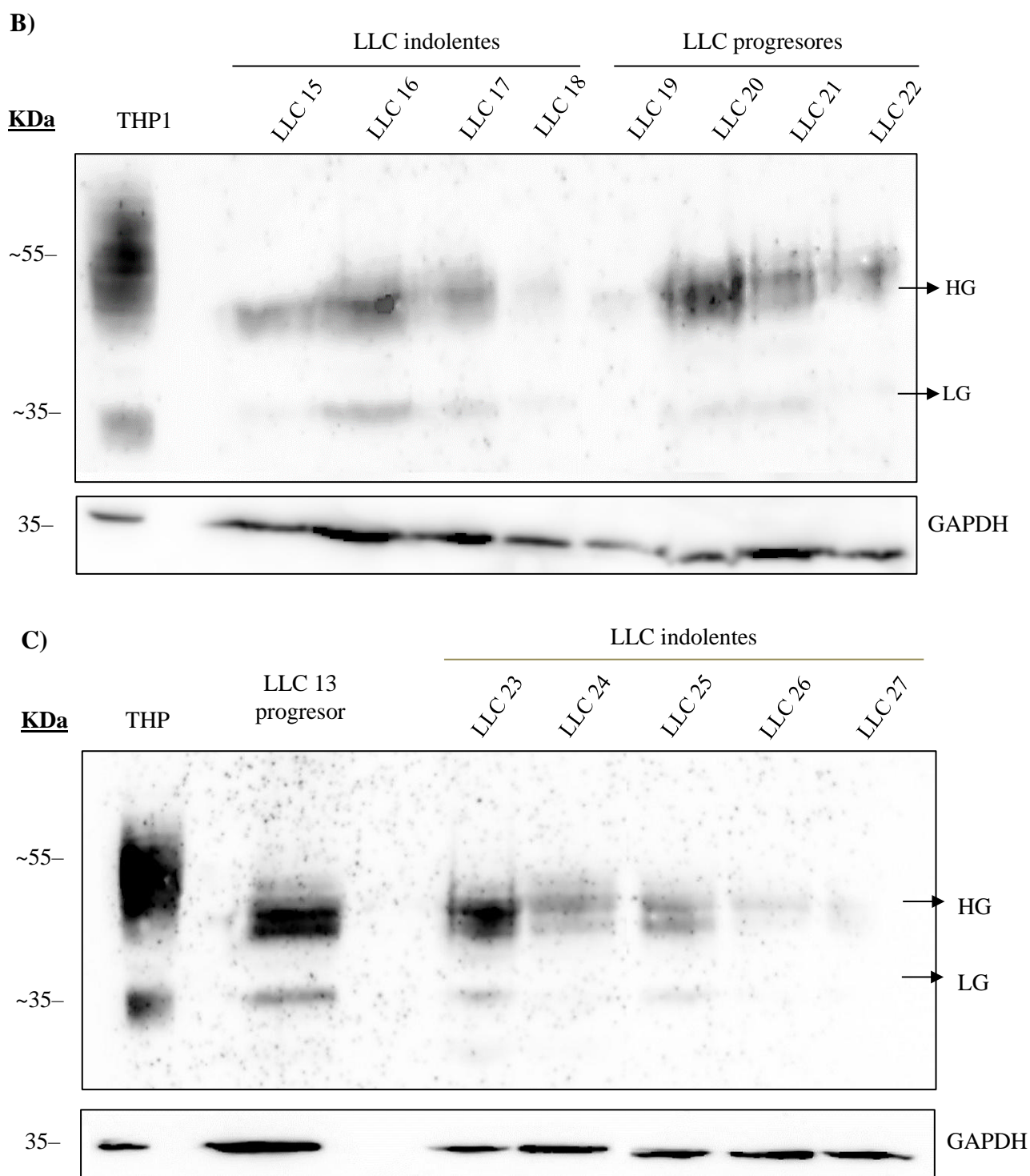
#### 4.1.2.2 Comparación del perfil de glicosilación de EMMPRIN entre pacientes indolentes y progresores

Una vez puesta a punto la técnica de Western Blot para la detección de EMMPRIN se continuaron realizando ensayos incluyendo pacientes con LLC indolentes y progresores, con el objetivo de estudiar si existían diferencias en el perfil de glicosilación entre estos pacientes con distinta evolución clínica. Ya que, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la forma HG de EMMPRIN tiene relevancia en diferentes neoplasias, sobre todo en la progresión

tumoral (91, 92). Por esta razón, nos llevó a hipotetizar que, aquellos pacientes de peor pronóstico (pacientes progresores) presentarían mayor proporción de EMMPRIN y su forma altamente glicosilada (HG), en comparación con los pacientes indolentes.

A continuación, en la figura 15 se muestran tres membranas de Western Blot de EMMPRIN, donde se sembraron tanto pacientes indolentes como progresores, donde volvemos a encontrar bandas específicas en todos los pacientes. Para estos ensayos semicuantitativos, luego de obtener la señal del anticuerpo anti-EMMPRIN, se removieron los anticuerpos de las membranas mediante “*stripping*” con cloruro de guanidina. Permitiendo la re-incubación con un anticuerpo que reconoce la proteína GAPDH, la cual por su característica de “*housekeeping*” es una molécula utilizada como control de carga proteica, ya que se expresa constitutivamente en todas las muestras. Esto fue utilizado para normalizar los niveles de proteínas detectados y realizar la cuantificación relativa de EMMPRIN. En la figura 15 se observa una única banda del peso molecular esperado (35 kDa) correspondiente a GAPDH.

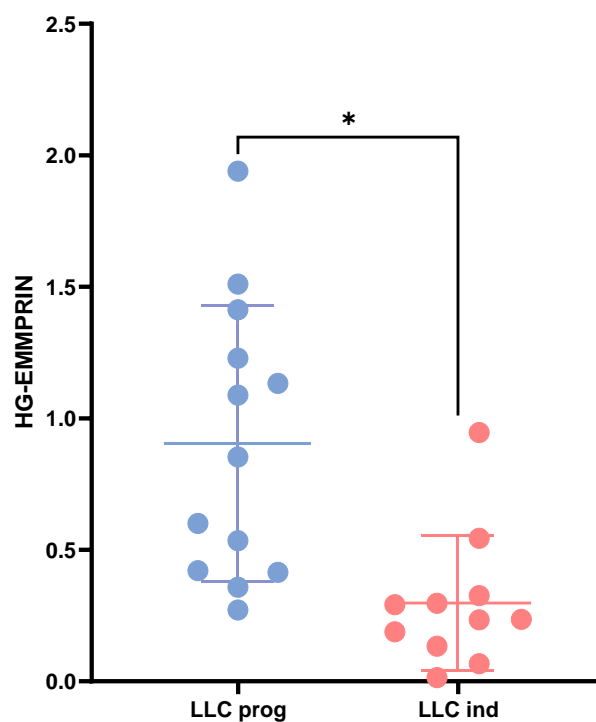




**Figura 15. Western Blots representativos de EMMPRIN, en pacientes progresores e indolentes de LLC (A, B, C).** Se pueden observar las dos bandas características de EMMPRIN: HG (~55) y LG (~35). Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. En todas las membranas se incluye el control positivo de lisado de proteínas de células THP1.

Como se observa en las membranas de Western Blot, se detectó la presencia de la forma HG en todas las muestras analizadas, mientras que la forma LG no se detectó en todas las muestras. Observamos que los pacientes progresores presentan en su mayoría mayor proporción de la forma HG, lo que coincide con nuestra hipótesis original. En la figura 15C se sembraron mayormente pacientes indolentes, aumentando el número de pacientes con esta condición clínica, con el fin de confirmar la tendencia mencionada anteriormente. Se observa que el paciente progresor en esta membrana presenta una intensidad en la señal mucho mayor que los pacientes indolentes, resultado consistente con lo que se había obtenido anteriormente.

A partir de estas membranas se realizó el análisis de la intensidad de señal de las bandas por densitometría, como se menciona en detalle en la sección de metodología (Véase punto 3.2.6). Los resultados se presentan a continuación en la figura 16.

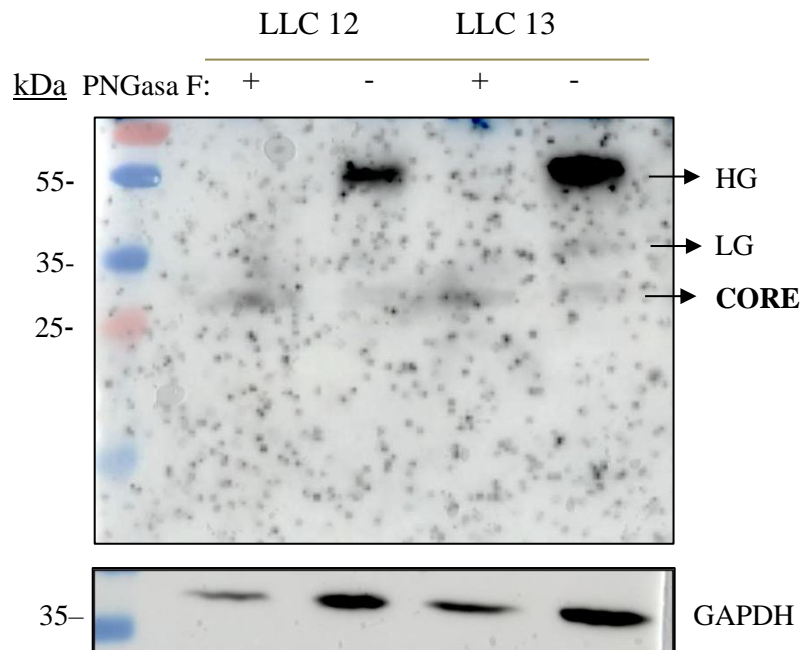


**Figura 16. Cuantificación relativa de la señal de Western Blot de HG-EMMPRIN.** En la gráfica se muestra la cuantificación de la señal de HG-EMMPRIN (normalizada al valor de GAPDH, EMMPRIN/GAPDH) en pacientes progresores (LLC prog) e indolentes (LLC ind). Las barras expresan el promedio  $\pm$  SEM, \* indica una diferencia significativa.

La cuantificación relativa de la señal de la forma HG de EMMPRIN en los pacientes utilizados en estos ensayos (n prog=13, n ind=10) nos muestran un incremento significativo (P= 0,0005) de la expresión de la forma HG en los pacientes con una mala evolución clínica (progresores) comparados con el grupo de pacientes con una enfermedad más indolente. Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta la existencia de estudios previos que reportan que la forma HG juega un papel importante en el crecimiento tumoral, invasión, proliferación y metástasis (85–87). Jia y col. reportaron que la forma HG contribuye al potencial de metástasis en células de hepatocarcinoma de ratón al alterar el nivel de N-glicanos, y que al desglicosilar EMMPRIN las células disminuían su capacidad metastásica (90). Por consiguiente, nuestros resultados muestran por primera vez en la LLC una asociación de la expresión de EMMPRIN con la progresión tumoral, lo que nos sugiere un posible rol del receptor EMMPRIN y de su ligando la proteína S100-A9 en la progresión tumoral de las células leucémicas.

#### **4.1.2.3 Ensayo de desglicosilación enzimática de EMMPRIN**

Como hemos visto anteriormente, una de las características más llamativas de EMMPRIN es su perfil diferencial de glicosilación. Los pesos moleculares de la proteína pueden variar mucho entre una forma altamente glicosilada (HG) y una menos glicosilada (LG). En consecuencia, nos planteamos continuar ahondando en el posible rol del perfil de glicosilación de EMMPRIN investigando el tipo de glicosilación que presenta esta proteína. Para esto realizamos un ensayo de desglicosilación de proteínas en muestras de pacientes progresores a través del tratamiento con una N-glicosidasa F (PNGasa F). Esta enzima cliva oligosacáridos unidos a asparagina; específicamente cataliza la hidrólisis de oligosacáridos de alta manosa, híbridos o complejos (N-glicosilaciones). El resultado de este ensayo se visualiza a continuación en la figura 17, en donde lisados de proteínas provenientes de pacientes progresores de LLC fueron sometidos a digestión por la enzima PNGasa F y luego se realizó un Western Blot.



**Figura 17. Ensayo de desglicosilación de EMMPRIN.** Se muestran el resultado del tratamiento con PNGasa F en lisados de proteínas de dos pacientes con LLC tratados (+) y el control sin tratar (-). Se pueden observar las dos bandas características de EMMPRIN: HG (~55) y LG (~35), y una nueva banda referente al CORE de la proteína (~27). A un lado se muestran los pesos moleculares en kDa.

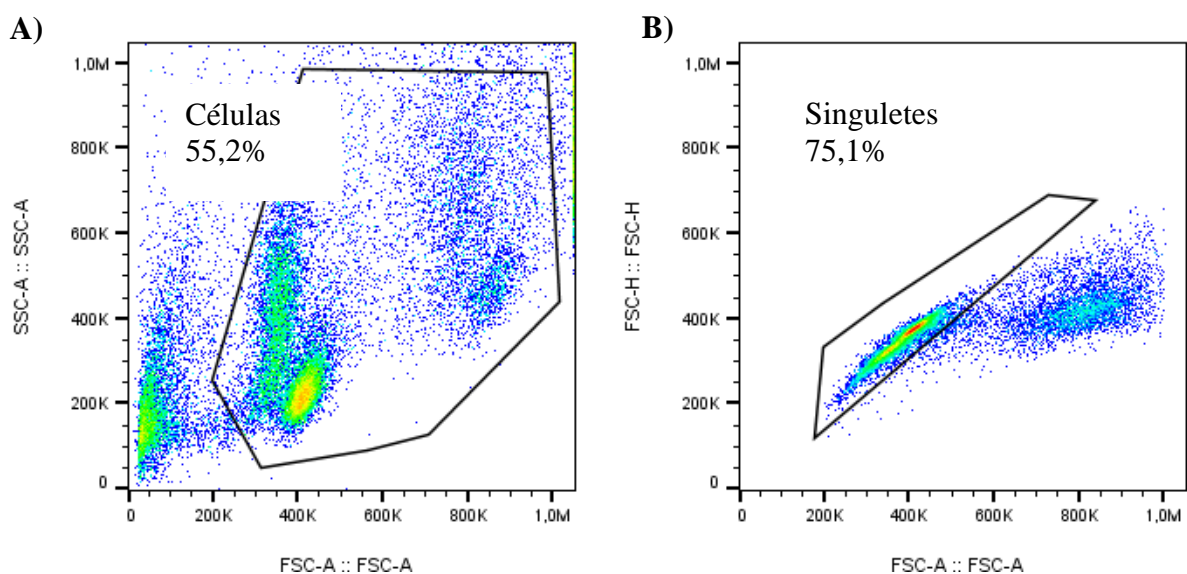
Observamos que luego de la digestión enzimática tanto la forma HG como la LG ya no fueron detectables, desapareciendo por completo, mientras que en su lugar aparece una nueva banda de ~27 kDa, consistente con el tamaño de la proteína sin glicosilar (core). Este resultado confirma que EMMPRIN se compone principalmente de glicanos N-ligados de tipo complejo, e indican que estos contribuyen a casi la mitad del tamaño de la molécula final. Esto resulta interesante ya que un estudio previo realizado por Huang y col. confirmaron que la N-glicosilación de EMMPRIN, particularmente los N-glicanos ramificados  $\beta$ 1,6, contribuyen a la progresión tumoral a través de su actividad inductora de MMP en células SMMC-7721, una línea celular de hepatocarcinoma humano (91).

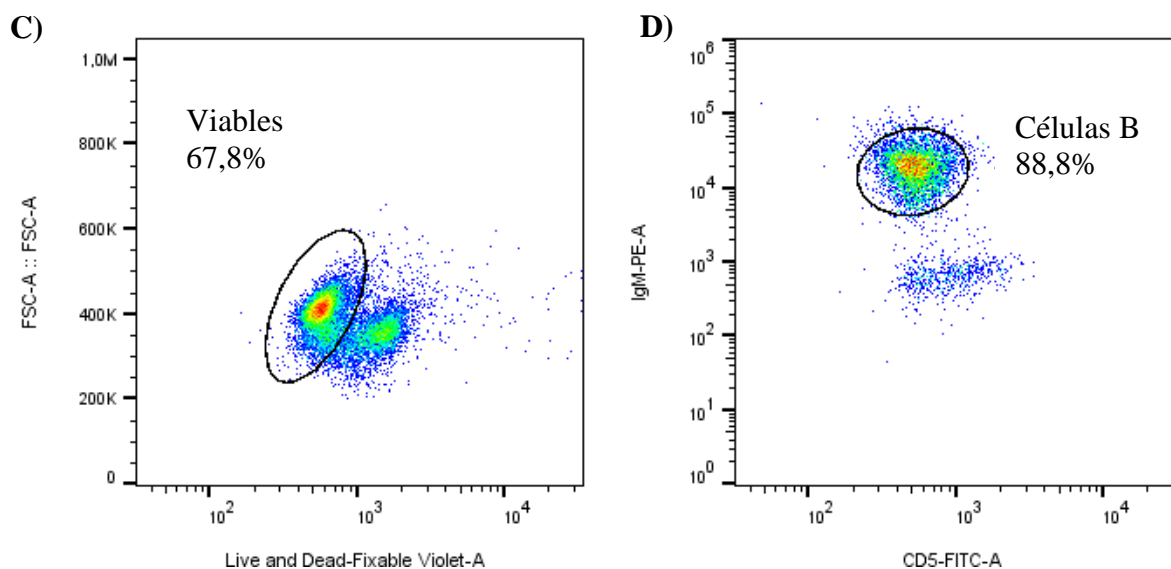
#### 4.2 Evaluación de la vía de señalización PI3K/AKT luego de la activación con la proteína S100-A9

Como se mencionó anteriormente, un estudio previo del laboratorio de iLLC demostró la presencia de S100-A9 en los exosomas de pacientes progresores de LLC, mientras que no se encontraba en los exosomas de pacientes indolentes. Los exosomas cargados con la proteína

S100-A9 eran capaces de activar la vía de señalización NFK-B en células B-LLC (60). Esto nos llevó a profundizar en el estudio de esta proteína evaluando otras vías de señalización relevantes como PI3K/AKT. En la LLC esta vía de señalización es clave en la relación entre las células de LLC y el microambiente tumoral, y ha sido descrita por varios artículos como constitutivamente activada en la LLC (92–93). Siendo relacionada con una respuesta proliferativa y antiapoptótica, ya que interviene en la transmisión de señales de distintos receptores de membrana como el BCR, CXCR4 y CD40; y su activación sostenida genera mayor viabilidad de las células leucémicas y una mayor expresión de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1, Bcl-xL y XIAP (93).

Por consiguiente, dentro del segundo objetivo de este trabajo se planteó estudiar si la proteína S100-A9 era capaz de inducir la fosforilación de AKT en las células leucémicas *in vitro*. Para esto las CMSP provenientes de pacientes con LLC se incubaron durante 72 horas con S100-A9 o en su ausencia (células no estimuladas) y se evaluó la fosforilación de un residuo clave (Ser<sup>473</sup>) indicador de la activación de la vía PI3K/AKT. Luego del período de incubación las células fueron recuperadas del cultivo y analizadas mediante citometría de flujo. La estrategia de *gating* se presenta a continuación (figura 18). La población de linfocitos se separó en función del tamaño y granularidad, eliminando los restos celulares y los dobletes. Con el marcador de viabilidad *Live and Dead* se seleccionaron aquellas células vivas (“viables”). Para seleccionar el clon tumoral se utilizó CD5 e IgM. Una vez seleccionada la población de células B leucémicas (CD5+ IgM+) se determinaron los valores de MFI para p-AKT.



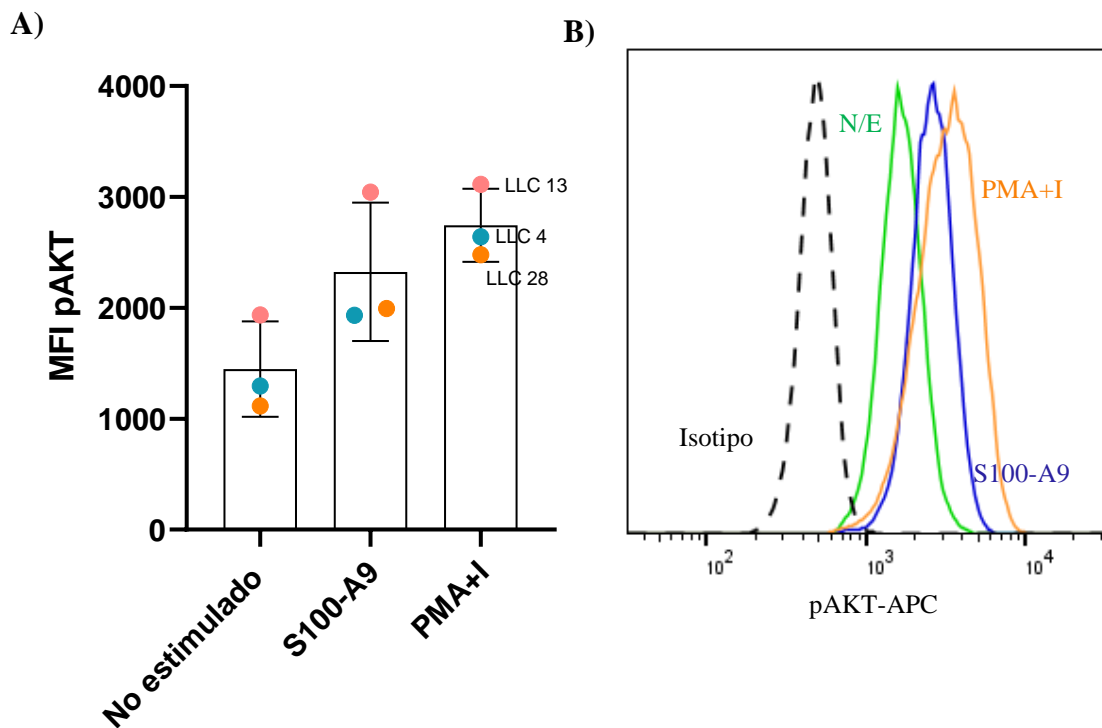


**Figura 18. Estrategia de Gating para el ensayo de activación con S100-A9.** Se muestra un ejemplo de análisis en células sin estimular, tomadas como referencia para el análisis. A) En el *dot plot* de Side Scatter (SSC-A) y Forward Side (FSC-A) se seleccionaron las células por tamaño y granulosidad, excluyendo restos celulares. B) Se aplicó dicha región y en el *dot plot* de FSC-H y FSC-A se excluyeron los agregados celulares seleccionando sólo los singletes (células individuales). C) Seleccionando los singletes en el *dot plot* de FSC-A y *Live/Dead* se seleccionaron aquellas células no marcadas, que corresponden a las células viables. D) Tomando la región de células viables en el *dot plot* de CD5 e IgM se seleccionaron diferencialmente las células B (Clon tumoral) caracterizadas por ser CD5+ y IgM+. Por último, seleccionando el clon tumoral se analizaron los valores de MFI para las diferentes condiciones.

A continuación, la figura 19 muestra los valores de MFI obtenidos para las células B sin estimular y estimuladas con S100-A9 de tres pacientes con LLC. Tal como se visualiza, los resultados muestran como tendencia un aumento en los valores de MFI de las células estimuladas con S100-A9, en comparación a las células no estimuladas. Estos resultados nos sugieren una mayor fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup> en las células B de pacientes estimuladas con S100-A9. Como control positivo del ensayo se estimularon las células con PMA+I, encontrando como se esperaba valores mayores de MFI que en las otras condiciones. Estos compuestos son frecuentemente utilizados para la activación celular: PMA es un inductor fuerte de la proteína quinasa C, mientras que la ionomicina es un ionóforo de calcio, en conjunto la estimulación con estos compuestos conduce a la activación de varias vías de señalización intracelular que conducen a la activación de las células y la producción de una variedad de citocinas (94). En la figura 19B se muestran los histogramas representativos para las distintas condiciones del ensayo. Consistente con lo mencionado anteriormente, se observa un corrimiento positivo de

las células estimuladas con S100-A9, indicando que estas presentan mayor fosforilación en la Ser<sup>473</sup>, con respecto al control sin estimular (N/E). También, se visualiza el histograma representativo del control positivo de PMA+I.

Estos resultados sugieren que la activación de las células leucémicas con S100-A9, a través de sus receptores, promueve la fosforilación de AKT, y por consecuente sugiere la activación de la vía PI3K/AKT. Los resultados previamente publicados en el laboratorio (60) así como los obtenidos en estos ensayos sugieren un rol clave de S100-A9 en la progresión leucémica.

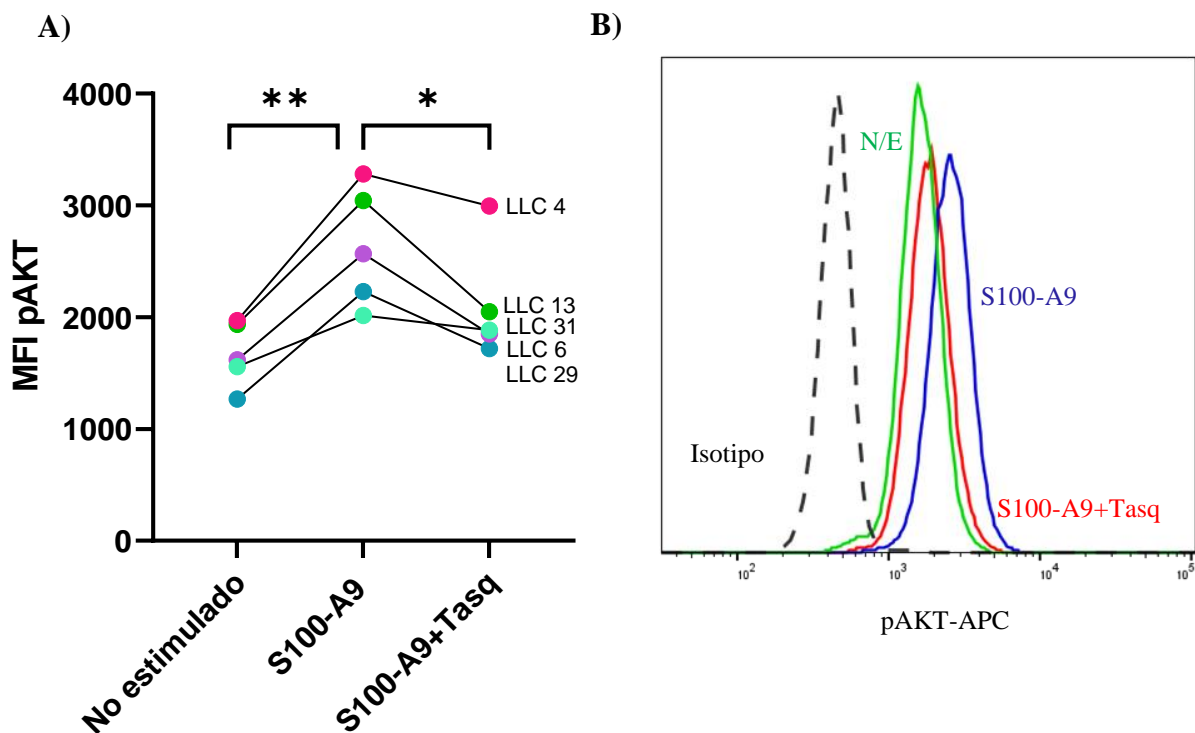


**Figura 19. Ensayos de activación S100-A9.** A) MFI de la fosforilación de pAKT1<sup>Ser473</sup> para las condiciones del ensayo. Cada paciente fue representado con un color. B) Histogramas representativos del ensayo. En línea verde se muestran las células no estimuladas (N/E), en azul las estimuladas con S100-A9 y en naranja aquellas estimuladas con PMA+I (control positivo).

### 4.3 Inhibición de la proteína S100-A9 con Tasquinimod y evaluación de la vía de señalización PI3K/AKT

A partir de los resultados obtenidos nos propusimos confirmar los resultados y profundizar el estudio sobre la función de la proteína pro-inflamatoria S100-A9 en el contexto del clon tumoral y sus implicancias en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Decidimos utilizar

Tasquinimod, una molécula diseñada para inhibir la función de la proteína S100-A9. Este compuesto es una droga disponible comercialmente que ha demostrado actividad anti-tumoral en pacientes con otros cánceres (76,78,80–83), encontrándose actualmente en marcha un ensayo clínico fase 1 en pacientes con Mieloma Múltiple (84). Para llevar a cabo nuestros experimentos se cultivaron las células por 72 hs en medio de cultivo al cual se le añadió S100-A9 y Tasquinimod, incubando previamente la mezcla de estos compuestos por 30 min antes de agregar al cultivo. Se incluyó en este ensayo células estimuladas solo con S100-A9, y células sin ninguna estimulación. Pasado el tiempo de cultivo se recolectaron las células y analizó la fosforilación de AKT por citometría de flujo. En la figura 20A se presentan los valores de MFI obtenidos para las distintas condiciones del ensayo. En la figura 20B se presentan los histogramas representativos del ensayo.



**Figura 20. Ensayo de inhibición con tasquinimod.** A) MFI de fosforilación de AKT1 (Ser<sup>473</sup>) en las distintas condiciones. Cada color diferencia un paciente (n=5). \* indican una diferencia significativa. B) Histogramas representativos del experimento de inhibición con tasquinimod. En línea puntada negra se muestra el isotipo, en línea verde las células no estimuladas, en azul las estimuladas con S100-A9 y en rojo aquellas tratadas con S100-A9 y Tasquinimod.

Como se aprecia en la figura 20, pudimos confirmar los resultados obtenidos previamente en un nuevo grupo de pacientes (n=5), observando un aumento estadísticamente significativo en

la MFI de las células estimuladas con S100-A9 con respecto a las no estimuladas ( $P= 0,0025$ ), indicando un aumento en la fosforilación de  $AKT^{Ser473}$  que sugiere la activación de la vía de señalización PI3K/AKT (Figura 20B). En contraste, al tratar las células con S100-A9 y con el inhibidor Tasquinimod vemos una disminución significativa en la MFI en comparación con las células tratadas solo con S100-A9 ( $P= 0,0262$ ). Este resultado indica que Tasquinimod es capaz de inhibir la acción de S100-A9, y que al menos en parte esta proteína juega un papel preponderante en la activación de una de las vías de proliferación tumoral como lo es la vía PI3K/AKT en la LLC. Estos resultados sugieren la necesidad de profundizar en el estudio sobre la función de la proteína S100-A9 en la biología de la LLC, y plantea la hipótesis sobre la posibilidad de usar inhibidores de S100-A9 como una posible herramienta terapéutica futura en la LLC.

## Conclusiones

---

El análisis de los experimentos llevados a cabo en este trabajo de final de carrera nos permite aportar las siguientes conclusiones:

- Los receptores de S100-A9 (RAGE y EMMPRIN) se encuentran expresados en un mayor porcentaje de células B de pacientes con LLC comparados con donantes sanos. Específicamente, el receptor EMMPRIN se encuentra sobreexpresado en las células B leucémicas comparada con células B de donantes sanos.
- Se logró poner a punto la detección de EMMPRIN en Western Blot. El perfil de glicosilación de este receptor sugiere una asociación entre la mayor proporción de la glicofoma alta (HG) de EMMPRIN en el linfocito tumoral y una LLC de peor pronóstico.
- La glicosilación del receptor EMMPRIN en las células de LLC está compuesta principalmente por N-glicanos.
- Se observó que la proteína S100-A9 promueve la fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup> en las células leucémicas. Estos datos sugieren que la vía de señalización PI3K/AKT puede ser inducida en el clon leucémico a través de la proteína pro-inflamatoria S100-A9, apoyando los datos previamente publicados en nuestro grupo.
- La inhibición de S100-A9 utilizando Tasquinimod disminuye la fosforilación de AKT<sup>Ser473</sup> en las células leucémicas.
- En conjunto, los resultados sugieren la necesidad de profundizar en el estudio sobre la función de la proteína S100-A9 en la biología de la LLC. Plantea la posibilidad de considerar a esta proteína como un nuevo blanco terapéutico, al usar inhibidores de S100-A9 como una posible herramienta terapéutica futura en la LLC.

## Perspectivas

---

Los resultados de este trabajo final de carrera muestran que EMMPRIN, uno de los receptores de la proteína S100-A9 se encuentra sobre-expresado en células primarias de pacientes con LLC, y que la incubación de ellas con la proteína pro-inflamatoria S100-A9 induce la fosforilación *in-vitro* de la vía PI3K/AKT, siendo que esta vía puede ser inhibida con el inhibidor de S100-A9 Tasquinimod.

Estos resultados nos llevaron a plantear la hipótesis de que pacientes portadores de una LLC grave tienen un microambiente tumoral inmunológicamente activo con un importante componente inflamatorio. En este nicho celular el aumento de la expresión de S100-A9 y la interacción S100-A9/EMMPRIN origina la proliferación y sobrevida tumoral a través de la activación de vías de señalización como NFκB y PI3K/AKT. Además, dicha interacción favorece la expresión de metaloproteinasas (MMPs), las cuales a su vez inducen la capacidad migratoria de las células LLC.

Para estudiar esta hipótesis como perspectivas a futuro proponemos entender los mecanismos moleculares a través de los cuales la proteína S100-A9 es responsable de la progresión leucémica, y aportar datos que consoliden a los inhibidores de S100-A9 como una estrategia terapéutica alternativa o complementaria en la LLC. Para esto plantamos a cabo la caracterización de los mecanismos moleculares de activación de las vías de señalización PI3K/AKT y NFκB en células primarias de pacientes con LLC. Así como la evaluación de la capacidad migratoria tumoral mediada por metaloproteinasas a través de la activación del eje S100-A9/EMMPRIN. Por último, nos planteamos realizar una caracterización funcional *in-vivo* en un modelo murino la vía S100-A9/EMMPRIN evaluando la proliferación, la sobrevida y la migración tumoral.

De esta manera, si la hipótesis se cumple y logramos demostrar que el eje S100-A9/EMMPRIN tiene un rol relevante en la evolución clínica de la LLC, estaríamos generando las bases teóricas para involucrar a los inhibidores de S100-A9 en la terapia de la LLC.

## Referencias Bibliográficas

1. Rozman C, Montserrat E. Chronic Lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1995;333(16):1052–1057.
2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol.* 2019;94(11):1266–1287.
3. Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia.* 2003;17(12):2385–2391.
4. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, O'Brien S, Gribben J, Rai K. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017;3:16096.
5. Burger JA, O'Brien S. Evolution of CLL treatment — from chemoimmunotherapy to targeted and individualized therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018;15(8):510–527.
6. Fürstenau M, Hallek M, Eichhorst B. Sequential and combination treatments with novel agents in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2019;104(11):2144–2154.
7. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2008;371(9617):1017–1029.
8. American Cancer Society. Estadísticas importantes sobre la leucemia linfocítica crónica. [Internet]. Atlanta, USA: American Cancer Society; 2022 [citado 2022 Jul 27]. Disponible desde: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-cronica/acerca/estadisticas-clave.html>
9. Sociedad de Hematología del Uruguay. Registro Nacional Leucemia Linfocítica Crónica 2016. [Internet]. Montevideo, Uruguay; 2016 [citado 2022 Jul 27]. Disponible desde: [http://www.shu.com.uy/images\\_hematologia/info\\_util/registro\\_leucemias/2016LLC.pdf](http://www.shu.com.uy/images_hematologia/info_util/registro_leucemias/2016LLC.pdf)

10. Ghia P, Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. *Leukemia*. 2018;32(6):1307–1316.
11. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198–206.
12. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219–234.
13. Victor Hoffbrand A, Hamblin TJ. Is “leukemia” an appropriate label for all patients who meet the diagnostic criteria of chronic lymphocytic leukemia? *Leuk. Res.* 2007;31(3):273–275.
14. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 2016;43(2):233–240.
15. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic Lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840–1847.
16. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic Lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848–1854.
17. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick HD, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk. Lymphoma*. 1996;22(5–6):439–447.
18. 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.

19. Patel K, Pagel JM. Current and future treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 2021;14(1):69.
20. James DF, Kipps TJ. Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Adv. Ther.* 2011;28(7):534–554.
21. Cramer P, von Tresckow J, Bahlo J, Robrecht S, Tausch E, Fürstenau M, Langerbeins P, Al-Sawaf O, Fink A-M, Fischer K, et al. Durable remissions after discontinuation of combined targeted treatment in patients with chronic Lymphocytic leukemia (CLL) harbouring a high-risk genetic lesion (del(17p)/TP53 mutation). *Blood.* 2018;132(Supplement 1):694–694.
22. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, Verdugo M, Wu J, Punnoose EA, Jiang Y, et al. Fixed duration of venetoclax-rituximab in relapsed/refractory chronic Lymphocytic leukemia eradicates minimal residual disease and prolongs survival: Post-treatment follow-up of the MURANO phase III study. *J. Clin. Oncol.* 2019;37(4):269–277.
23. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Céligny P, Warzocha K, Loscertales J, Catalano J, Afanasiev B v, Larratt L, Geisler CH, Montillo M, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(10):1756–1765.
24. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, Goede V, Herling CD, Cramer P, Langerbeins P, von Tresckow J, Engelke A, Maurer C, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood.* 2016;127(2):208–215.
25. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, Wierda WG, Stingo F, Plunkett W, Smith SC, Kantarjian HM, Freireich EJ, Keating MJ. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2016;127(3):303–309.

26. Zenz T, Gribben JG, Hallek M, Döhner H, Keating MJ, Stilgenbauer S. Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy. *Blood*. 2012;119(18):4101–4107.
27. Moreno C. Standard treatment approaches for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia after frontline chemoimmunotherapy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2020;2020(1):33–40.
28. Yosifov DY, Wolf C, Stilgenbauer S, Mertens D. From biology to therapy: The CLL success story. *HemaSphere*. 2019;3(2):e175.
29. Palma M, Mulder TA, Österborg A. BTK inhibitors in chronic Lymphocytic leukemia: Biological activity and immune effects. *Front. Immunol*. 2021;12:686768.
30. Charalambous A, Schwarzbich M-A, Witzens-Harig M. Ibrutinib. *Recent Results Cancer Res*. 2018;212:133–168.
31. Mihalyova J, Jelinek T, Growkova K, Hrdinka M, Simicek M, Hajek R. Venetoclax: A new wave in hematooncology. *Exp. Hematol*. 2018;61:10–25.
32. Morabito F, Gentile M, Seymour JF, Polliack A. Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target. *Leuk. Lymphoma*. 2015;56(12):3250–3256.
33. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst BF, Hillmen P, D’Rozario J, Assouline S, Owen C, Robak T, de la Serna J, Jaeger U, et al. Four-year analysis of murano study confirms sustained benefit of time-limited venetoclax-rituximab (VenR) in relapsed/refractory (R/R) Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*. 2019;134(Supplement\_1):355–355.
34. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, Bairey O, Hillmen P, Bartlett NL, Li J, et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic Lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2015;373(25):2425–2437.

35. Markham A. Idelalisib: first global approval. *Drugs*. 2014;74(14):1701–1707.
36. Iskierka-Jażdżewska E, Puła B, Szeremet A, Hus M, Gołos A, Hołojda J, Piszczek W, Steckiewicz P, Wojciechowska M, Zaucha JM, et al. Ibrutinib discontinuation in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated in a compassionate use program: A report from the Polish Adult Leukemia Study Group (PALG). *Adv. Clin. Exp. Med.* 2019;28(8):1051–1057.
37. Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, George B, James D, Kantarjian H, Burger J, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015;125(13):2062–2067.
38. Ma S, Chan RJ, Gu L, Xing G, Rajakumaraswamy N, Ruzicka BB, Wagner-Johnston ND. 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 and Leukemia*. 2021;21(5):e432–e448.
39. Coutre SE, Barrientos JC, Brown JR, de Vos S, Furman RR, Keating MJ, Li D, O’Brien SM, Pagel JM, Poleski MH, et al. Management of adverse events associated with idelalisib treatment: expert panel opinion. *Leukemia & Lymphoma* 2015:2779–2786.
40. Puła B, Gołos A, Górniak P, Jamroziak K. Overcoming ibrutinib resistance in chronic Lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1834.
41. Burger JA, Landau DA, Taylor-Weiner A, Bozic I, Zhang H, Sarosiek K, Wang L, Stewart C, Fan J, Hoellenriegel J, et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat. Commun.* 2016;7:11589.
42. Burger JA. Bruton tyrosine kinase inhibitors: Present and future. *Cancer J*. 2019;25(6):386–393.
43. Burger JA. The CLL cell microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013;792:25–45.

44. Caligaris-Cappio F. Inflammation, the microenvironment and chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(3):353–355.
45. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell–derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655–2663.
46. Granziero L, Circosta P, Scielzo C, Frisaldi E, Stella S, Geuna M, Giordano S, Ghia P, Caligaris-Cappio F. CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood*. 2003;101(5):1962–1969.
47. Svanberg R, Janum S, Patten PEM, Ramsay AG, Niemann CU. Targeting the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2021;106(9):2312–2324.
48. Ngiow SF, Young A. Re-education of the tumor microenvironment with targeted therapies and immunotherapies. *Front. Immunol*. 2020;11:1633.
49. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114(16):3367–3375.
50. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin. Cancer Biol*. 2014;24:71–81.
51. Dubois N, Crompton E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B. Importance of crosstalk between chronic Lymphocytic leukemia cells and the stromal microenvironment: Direct contact, soluble factors, and extracellular vesicles. *Front. Oncol*. 2020;10:1422.
52. Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*. 2010;115(9):1755–1764.

53. van Attekum MHA, Eldering E, Kater AP. Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk. *Haematologica*. 2017;102(9):1469–1476.
54. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* 2005;115(3):755–764.
55. Bianchi S, Moreno P, Landoni AI, Naya H, Oppezzo P, Dighiero G, Gabús R, Pritsch O. Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2010;51(11):2070–2078.
56. Palacios F, Moreno P, Morande P, Abreu C, Correa A, Porro V, Landoni AI, Gabus R, Giordano M, Dighiero G, et al. 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*. 2010;115(22):4488–4496.
57. Palacios F, Abreu C, Prieto D, Morande P, Ruiz S, Fernández-Calero T, Naya H, Libisch G, Robello C, Landoni AI, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*. 2015;29(1):115–125.
58. Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, Sison C, Kaufman MS, Kolitz JE, Allen SL, et al. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(23):4832–4842.
59. Oppezzo P, Dighiero G. “Role of the B-cell receptor and the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood Cancer J*. 2013;3(9):e149.
60. Prieto D, Sotelo N, Seija N, Sernbo S, Abreu C, Durán R, Gil M, Sicco E, Irigoien V, Oliver C, et al. S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF- $\kappa$ B activity during disease progression. *Blood*. 2017;130(6):777–788.
61. Mondet J, Chevalier S, Mossuz P. Pathogenic roles of S100A8 and S100-A9 proteins in acute myeloid and lymphoid leukemia: clinical and therapeutic impacts. *Molecules*. 2021;26(5).

62. Srikrishna G. S100A8 and S100-A9: new insights into their roles in malignancy. *Journal of innate immunity*. 2012;4(1):31–40.
63. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Huh. S100-A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer research*.
64. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med*. 2012;18(6):883–891.
65. Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2015;15(2):96–109.
66. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, Gabrilovich. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100-A9 protein. *The Journal of experimental medicine*. 2008;(10):2235–2249.
67. Chen X, Eksioglu EA, Zhou J, Zhang L, Djeu J, Fortenbery N, Epling-Burnette P, van Bijnen S, Dolstra H, Cannon J, et al. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest*. 2013;123(11):4595–4611.
68. Wang Y, Fang C, Gao H, Bilodeau ML, Zhang Z, Croce K, Liu S, Morooka T, Sakuma M, Nakajima K, et al. Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis. *J. Clin. Invest*. 2014;124(5):2160–2171.
69. Xiong L, Edwards 3rd CK, Zhou L. The biological function and clinical utilization of CD147 in human diseases: a review of the current scientific literature. *Int. J. Mol. Sci*. 2014;15(10):17411–17441.

70. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang D, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J. Transl. Med.* 2009;7(1):17.
71. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell.* 1999;97(7):889–901.
72. Reis JC, Travado L, Seixas E, Sousa B, Antoni MH. 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 Behav Immun Health.* 2022;21(100433):100433.
73. Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol. Int.* 2006;56(7):359–367.
74. Weidle UH, Scheuer W, Eggle D, Klostermann S, Stockinger H. Cancer-related issues of CD147. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7(3):157–169.
75. Björk P, Björk A, Vogl T, Stenström M, Liberg D, Olsson A, Roth J, Ivars F, Leanderson T. Identification of human S100-A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. *PLoS Biol.* 2009;7(4):e97.
76. Polman C, Barkhof F, Sandberg-Wollheim M, Linde A, Nordle O, Nederman T, Group L in RMSS. Treatment with laquinimod reduces development of active MRI lesions in relapsing MS. *Neurology.* 2005;64(6):987–991.
77. Comi G, Pulizzi A, Rovaris M, Abramsky O, Arbizu T, Boiko A, Gold R, Havrdova E, Komoly S, Selmaj K, et al. Effect of laquinimod on MRI-monitored disease activity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet.* 2008;371(9630):2085–2092.

78. Bengtsson AA, Sturfelt G, Lood C, Rönnblom L, van Vollenhoven RF, Axelsson B, Sparre B, Tuvevsson H, Ohman MW, Leanderson T. 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 Rheum.* 2012;64(5):1579–1588.
79. Mehta AR, Armstrong AJ. Tasquinimod in the treatment of castrate-resistant prostate cancer - current status and future prospects. *Ther. Adv. Urol.* 2016;8(1):9–18.
80. Raymond E, Dalglish A, Damber J-E, Smith M, Pili R. Mechanisms of action of tasquinimod on the tumour microenvironment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014;73(1):1–8.
81. Shen L, Sundstedt A, Ciesielski M, Miles KM, Celander M, Adelaiye R, Orillion A, Ciamporcerio E, Ramakrishnan S, Ellis L, et al. Tasquinimod modulates suppressive myeloid cells and enhances cancer immunotherapies in murine models. *Cancer Immunol. Res.* 2015;3(2):136–148.
82. Sternberg C, Armstrong A, Pili R, Ng S, Huddart R, Agarwal N, Khvorostenko D, Lyulko O, Brize A, Vogelzang N, et al. 2016. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study of Tasquinimod in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 34(22):2636–2643.
83. Escudier B, Faivre S, Van Cutsem E, Germann N, Pouget J-C, Plummer R, Vergote I, Thistlethwaite F, Bjarnason GA, Jones R, et al. 2017. A Phase II Multicentre, Open-Label, Proof-of-Concept Study of Tasquinimod in Hepatocellular, Ovarian, Renal Cell, and Gastric Cancers. *Targeted Oncology.* 12(5):655–661.
84. Vogl DT, Nefedova Y, Wileyto EP, Sembhi H, Strakovsky I, Nguyen C, Taneja R, Bondesson E, Eriksson H, Tuvevsson H. A phase 1 study of tasquinimod in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood.* 2020;136(Supplement 1):17–18.
85. Tang W, Chang SB, Hemler ME. Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Molecular Biology of the Cell.* 2004;15(9):4043–4050.

86. Bai Y, Huang W, Ma LT, Jiang JL, Chen ZN. Importance of n-glycosylation on CD147 for its biological functions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(4):6356–6377.
87. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(1):24–27.
88. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 Production through CD147/Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer Interactions 1. *CANCER RESEARCH*. 2001;61:2276–2281.
89. Beesley AH, Cummings AJ, Freitas JR, Hoffmann K, Firth MJ, Ford J, de Klerk NH, Kees UR. The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: Implications for mechanisms of therapy failure. *British Journal of Haematology*. 2005;131(4):447–456.
90. Jia L, Zhou H, Wang S, Cao J, Wei W, Zhang J. Deglycosylation of CD147 down-regulates matrix metalloproteinase-11 expression and the adhesive capability of murine hepatocarcinoma cell HcaF in vitro. *IUBMB Life*. 2006;58(4):209–216.
91. Huang W, Luo WJ, Zhu P, Tang J, Yu XL, Cui HY, Wang B, Zhang Y, Jiang JL, Chen ZN. Modulation of CD147-induced matrix metalloproteinase activity: Role of CD147 N-glycosylation. *Biochemical Journal*. 2013;449(2):437–448.
92. Hamanaka Y, Mukai M, Shimamura M, Kitagawa T, Nishida T, Isohashi F, Ito T, Nishizawa Y, Tatsuta M, Matsuda H, et al. Suppression of PI3K/mTOR pathway rescues LLC cells from cell death induced by hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;330(1):318–326.

93. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2008;111:846–855.

94. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment. *OPEN ACCESS Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013;10:10.

**ANEXO 1.**

**Tabla. Características de los pacientes con LLC utilizados en este trabajo.**

<b>Nº de Paciente</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Linfocitosis</b>	<b>Estadío</b>	<b>AID</b>	<b>LPL</b>	<b>Perfil mutacional de genes VH</b>	<b>Evolución clínica</b>
<b>LLC 1</b>		M	215800	C		(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 2, LLC 21(t2)</b>	52	M	421000	C	(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC3</b>		M			(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 4, LLC 7 (t1), LLC 11 (t4)</b>	62	M	170000	C	(-)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 5</b>	66	M	135.500	C	(+)	(+)	Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 6</b>	51	M	120000	C	(-)	(-)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 8</b>	79	M		A	(-)	(+)	No Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 9</b>	55	F	22900	A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 10</b>	50	M			(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 12</b>	72	F		B	(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 13</b>	58	F	50000	B	(+/-)	(+)	No Mutado (IgG)	<b>Progresor</b>
<b>LLC 14</b>	63	M		II/B	(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 15</b>	71	F	30422	A		(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 16</b>	69	F			(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 17</b>	61	M		A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 18</b>	59	F	59300	A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 19</b>	57	M			(+/-)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 20</b>	64	M	64740	B - III	(+/-)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>

<b>LLC 22</b>	79	M	213300	IVC	(+)	(-)	Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 23</b>	65	F			(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 24</b>	61	M	15372	A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 25</b>	69	F	7000	A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 26</b>	79	F	22520	A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 27</b>	56	M		A	(-)	(-)	Mutado	<b>Indolente</b>
<b>LLC 28</b>	57	F	40900	I	(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 29</b>	77	M	137780	B	(+)	(-)	Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 30</b>	61	F		A	(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>
<b>LLC 30</b>	61	F		A	(+)	(+)	No Mutado	<b>Progresor</b>

t: tiempo de progresión. LPL: Lipoproteinlipasa