



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA IVERMECTINA COMO
AGENTE ANTI-TUMORAL**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

M. en C. MANDY JUÁREZ RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. MARCO A. CERBÓN CERVANTES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres.

Zenaida Rodríguez Hoyos

Quien con su lucha ferviente ha podido vencer
los más grandes retos de la vida, incluido el cáncer

José Rafael Juárez Huerta

Quien con su amor me dio las bases necesarias
para llegar hasta este momento de mi vida

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas se realizó bajo la dirección de:

Dr. Alfonso Dueñas González

*Laboratorio de Epigenética del Cáncer
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología*

El comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Marcela Lizano Soberón

*Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México*

Dr. Marco A. Cerbón Cervantes

*Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México*

Se reconoce la colaboración como Asesoras Técnicas y Académicas en el desarrollo de esta tesis a:

Dra. Alma Delia Chávez Blanco

*Laboratorio de Epigenética del Cáncer
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología*

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

*Laboratorio de Epigenética del Cáncer
Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Zenaida Rodríguez Hoyos y Rafael Juárez Huerta, por haberme criado con amor infinito e incondicional, ustedes han sido toda mi vida mis dos grandes pilares sobre los cuales he construido todo lo que soy hasta ahora. Gracias por cuidarme, escucharme, apoyarme y confiar en mí en todo momento.

A mis hermanos Rafael Juárez Rodríguez y Roberto Juárez Rodríguez, por ser mis consejeros y confidentes. Son las personas más nobles que conozco, ustedes siempre me han motivado a ser un mejor ser humano. Cada vez que me sentía sola, estando lejos de casa, bastaba con pensar en ustedes y la soledad desaparecía, los amo.

A mi tío Antonio Juárez Huerta por haberme mostrado el camino hacia la ciencia, fuiste una de las personas que le dio rumbo a mi vida. Gracias por haber estado en mi vida y darme esos consejos que hasta el día de hoy aplico. No hay día en que no te extrañe.

A mi tía Verónica Juárez Huerta por toda la ayuda que he recibido de ti, por dedicarme tiempo para escucharme y brindarme tus sabios y prácticos consejos. Gracias por la fortaleza que siempre me has mostrado aún en los momentos más difíciles y por enseñarme esas cosas que no se aprenden en la universidad.

A mi tío René Juárez Huerta por toda la confianza que has depositado en mí, agradezco mucho el tiempo que hemos pasado juntos en el que he aprendido mucho acerca de tu vida. Gracias por ser un guerrero que lucha incansablemente por su bienestar y el de la familia.

A mis abuelos Miguel Juárez, Margarita Huerta, Virginia Hoyos y Odilón Rodríguez por haber construido y educado a las familias de las cuales provengo. Gracias por compartir sus experiencias de vida conmigo, por los momentos bonitos que hemos vivido y por darme a mis maravillosos padres.

A mi novio Rogelio Domínguez Cornejo por tu amor, paciencia y apoyo. Gracias por los bellos momentos que hemos vivido juntos, por cuidarme y aceptarme con mis virtudes y defectos y por impulsarme a ser una mejor persona.

Al Dr. Alfonso Dueñas González por abrirme las puertas de su laboratorio donde pude realizar mi tesis doctoral bajo su supervisión y por la confianza depositada en mí.

A mi comité tutorial la Dra. Marcela Soberón y el Dr. Marco Antonio Cerbón por el conocimiento compartido, sus excelentes críticas, propuestas y correcciones durante todos los tutorales que realizamos juntos.

Al mi amigo el Dr. Alejandro Scholnik por todo el conocimiento que me compartiste, por mostrarme tu compromiso y dedicación hacia la ciencia. Te agradezco la experiencia al realizar proyectos en colaboración y también por el tiempo que te tomaste para escucharme y darme tu más objetiva opinión. Gracias por el apoyo que siempre me has brindado y la gran calidad humana que siempre me dejaste ver.

A la Dra. Alma Chávez Blanco y la Dra. Guadalupe Domínguez por ser una guía en mi proyecto de doctorado, por sus correcciones y críticas constructivas al desarrollar este proyecto. A la Dra. Lucy Taja por los comentarios y orientación que recibí de su parte durante mi estadía en el laboratorio. A la Dra. Fela Mendlovic por darme la oportunidad de colaborar en proyectos de investigación, por el tiempo y la paciencia que dedicó para resolver dudas y plantear nuevas propuestas. A la Dra. Rocío Morales por todo el tiempo invertido que pasamos analizando muestras en el citómetro. A todas ustedes mujeres de ciencia muchas gracias, porque han sido para mí una gran inspiración para continuar en este hermoso camino de la investigación.

Al Dr. Enrique Pérez por la orientación y ayuda que recibí cuando así lo necesitaba. Gracias por el tiempo que dedicaste a resolver mis dudas y por las risas en el laboratorio que nunca faltaron.

A Elenita y Doña Rosi quienes con compromiso y dedicación ayudan a todos los integrantes de laboratorio a tener listo el material del laboratorio. Gracias por las experiencias de vida compartidas.

A mis compañeros de laboratorio Desiré, Roberto, David, Lety, Mayreli y Marisol gracias por las risas, las pláticas y la convivencia dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigas Briseida Martínez y Clarita Ramos por la confianza y el cariño que siempre me mostraron, por los momentos bellos que compartimos y por escucharme siempre que lo necesité. A mis amigas Bety García y Luz Guerrero por estar en las buenas, en las malas y en las peores, gracias por el tiempo compartido y por hacerme sentir como en casa. A todas ustedes gracias por ser la familia que siempre estuvo apoyándome y cuidándome.

A mi amigo Mario A. Zamora por el tiempo que compartimos juntos, por las largas pláticas que solíamos tener, gracias por encontrar la concentración perfecta de café que me mantenía despierta y sin ansiedad. Gracias por mostrarme otra perspectiva del mundo y por tu cariño.

A mis amigos Amalia Martínez y Gustavo Hernández por toda la ayuda y apoyo que he recibido de ambos. Disfruto mucho las pláticas con ustedes las cuales me hacen reflexionar sobre las cosas de una manera diferente. Gracias por sus consejos críticos y objetivos que me hacen regresar a la realidad cuando me siento perdida.

A mis amigas Susi Cortés, Cinthya Gurrión y Yiliam Cruz por ser las mejores amigas que la vida me pudo dar, les agradezco por estar presentes cuando más lo he necesitado, por escucharme y apoyarme en todas las decisiones que he tomado.

A mis amados peludos Lemmy, Toulouse, Chícharo, Apolo, Kira, Hedwig y Tifa por darme su amor incondicional, regalarme los momentos más felices y hacer de este mundo un lugar mejor para vivir.

A CONACyT por la beca que me fue otorgada y con la cual pude realizar este proyecto de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Cáncer	3
1.2 El cáncer en la actualidad.....	4
1.3 Células troncales tumorales.....	5
1.4 Ivermectina como antiparasitario	7
1.5 Ivermectina usada para otras condiciones a la parasitosis.....	9
1.6 Estudios de fase I y dosis altas de ivermectina	9
1.7 Farmacocinética de la ivermectina	10
1.8 Reposicionamiento de la ivermectina como agente antitumoral.....	11
2.ANTECEDENTES.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO GENERAL	19
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
7. METODOLOGÍA	
7.1 Líneas celulares y fármacos	20
7.2 Ensayos de viabilidad celular mediante azul de tripano.....	21
7.3 Ensayos de clonogenicidad	21
7.4 Ensayos de apoptois con anexina V	22
7.5 Análisis dl ciclo celular mediante citometría de flujo.....	22
7.6 Cuervas de viabilidad y CI de quimoterapéuticos.....	22
7.7 Interacciones farmacológicas	23

7.8 Obtención de CSC por citometría de flujo	23
7.9 Evaluación de la viabilidad celular en CSC	24
7.10 TR-qPCR.....	24
7.11 Western blot	25
7.12 Estudios <i>in vivo</i> en un modelo murino	26
7.13 Análisis estadísticos	27
8. RESULTADOS	
8.1 El tratamiento con ivermectina inhibe la viabilidad celular y la capacidad clonogénica en líneas celulares de mama y ovario.....	28
8.2 El tratamiento con ivermectina no induce muerte celular por apoptosis.....	30
8.3 El trataamiento con ivermectina induce un arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular.....	33
8.4 La combinación farmacológica de ivermectina y quimioterapéutico estandar tienen un efecto sinérgico	36
8.5 El tratamiento con ivermectina reduce la viabilidad celular y el porcentaje de colonias en la población CSC	40
8.6 El tratamiento con ivermectina reduce el volumen tumoral en un modelo murino alogénico	42
9. DISCUSIÓN	44
10. CONCLUSIONES	48
11. BIBLIOGRAFÍA.....	49
12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	59
13. APÉNDICE.....	65

RESUMEN

Las avermectinas son un complejo de lactonas macrocíclicas de 16 miembros producidas por la fermentación del actinomiceto *Streptomyces avermectinius* [1,2]. Existen ocho compuestos de avermectina (A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b), y entre ellos, la mezcla de 80% de B1a y 20% de B1b, conocida como ivermectina, es la más segura y tiene la mayor actividad antiparasitaria [3]. La ivermectina es un agente antihelmíntico usado en animales y humanos. Fue aprobada por primera vez para su uso en humanos en 1987 por la FDA (*Food and Drug Administration*). Su dosis terapéutica va de los 0.15 a 0.40 mg/kg para tratar oncocercosis [4], filariasis linfática [5], estrongiloidiasis [6], ascariasis y enterobiasis [7]. Sin embargo, en un estudio de fase I en voluntarios sanos se informó que la administración de hasta 2 mg/kg es bien tolerada [8]. Además de su actividad antiparasitaria, existen múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado un efecto antitumoral actuando sobre diferentes blancos terapéuticos [9]. Debido a la diversidad de mecanismos de acción descritos para la ivermectina como fármaco antitumoral, decidimos examinar en 28 líneas celulares tumorales la concentración más alta reportada como segura en humanos según los estudios farmacocinéticos realizados en sujetos sanos [8]. Evaluamos el efecto sobre la viabilidad celular, la capacidad clonogénica, ciclo y la muerte celular, observamos una respuesta diferencial a ivermectina dependiendo de la línea celular siendo las líneas de cáncer de mama y ovario las más sensibles al tratamiento y las líneas celulares de próstata y hueso las más resistentes. Encontramos que las líneas celulares sensibles se arrestan en la fase G0-G1 del ciclo celular. Además, observamos un efecto sinérgico de ivermectina con docetaxel, tamoxifeno y ciclofosfamida. También exploramos la selectividad de ivermectina para las células troncales cancerosas e identificamos un mayor efecto antineoplásico sobre ellas en comparación con la población parental no troncal, a partir de cual se obtuvieron las células troncales cancerosas. Finalmente, demostramos un importante efecto en la reducción del tamaño tumoral, inducido por la administración de ivermectina, *in vivo* en un modelo murino. Nuestros resultados y los antecedentes mencionados hacen que la ivermectina sea un fármaco con gran potencial en el reposicionamiento farmacéutico. Lo cual significa que además de su acción como antiparasitario podría llegar a ser administrado como una terapia antitumoral.

ABSTRACT

Ivermectin is an antiparasitic drug that exhibits antitumor effects in preclinical studies, and as such is currently being repositioned for cancer treatment. However, divergences exist regarding its employed doses in preclinical works. Therefore, the aim of this study was to determine whether the antitumor effects of ivermectin are observable at clinically feasible drug concentrations. Twenty-eight malignant cell lines were treated with 5 μ M ivermectin. Cell viability, clonogenicity, cell cycle, cell death and pharmacological interaction with common cytotoxic drugs were assessed, as well as the consequences of its use on stem cell-enriched populations. The antitumor *in vivo* effects of ivermectin were also evaluated. The breast MDA-MB-231, MDA-MB-468, and MCF-7, and the ovarian SKOV-3, were the most sensitive cancer cell lines to ivermectin. Conversely, the prostate cancer cell line DU145 was the most resistant to its use. In the most sensitive cells, ivermectin induced cell cycle arrest at G0–G1 phase, with modulation of proteins associated with cell cycle control. Furthermore, ivermectin was synergistic with docetaxel, cyclophosphamide and tamoxifen. Ivermectin reduced both cell viability and colony formation capacity in the stem cell-enriched population as compared with the non-stem cell enriched population. Finally, in tumor-bearing mice ivermectin successfully reduced both tumor size and weight. Our results on the antitumor effects of ivermectin support its clinical testing.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un término que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a diferentes órganos y tejidos, se caracteriza por tener una división celular descontrolada y continua, en donde las células tumorales pueden propagarse e invadir otros tejidos en el proceso conocido como metástasis. La transformación de una célula normal en una célula tumoral es un proceso multifásico que puede deberse a la interacción de diversos factores genéticos y ambientales [10]. Entre los factores genéticos podemos mencionar mutaciones que originen problemas en mecanismos de reparación del ADN y en el control del ciclo celular, la inactivación de genes supresores de tumores y activación de oncoproteínas. Entre los factores ambientales podemos mencionar carcinógenos físicos como la radiación ultravioleta e ionizante; carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas y el arsénico y entre los carcinógenos biológicos se encuentran ciertos virus como el Virus del Papiloma Humano y el Virus de la Hepatitis C [10].

Para que una célula normal evolucione progresivamente a un estado neoplásico tiene que adquirir ciertas características que le permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse, como lo son: el mantenimiento de señales proliferativas, la evasión de supresores de crecimiento, inmortalidad, invasión, metástasis, inducción de la angiogénesis, resistencia a la muerte celular, evasión del ataque inmune, cambios en el metabolismo celular, la inestabilidad genómica y procesos inflamatorios [11]. La carcinogénesis es un proceso muy complejo y progresivo en donde una célula tumoral es la fundadora de la enfermedad. Existen varios estadios en el desarrollo tumoral: iniciación, inmortalización, promoción y progresión.

En el estadio de iniciación ocurre la interacción directa con el carcinógeno que origina, generalmente, una alteración genética, la cual no es suficiente para inducir el fenotipo maligno. Sin embargo, ciertas células adquieren la capacidad de ser estimuladas a proliferar en presencia de estímulos apropiados. La división celular, de las células alteradas (iniciadas), es indispensable para la transmisión de la alteración que adquirió. Esta etapa es irreversible e incluye dos fases: la inducción de una o más alteraciones bioquímicas o

genéticas y una fase posterior de proliferación celular. La presencia un agente promotor proporciona un ambiente que favorece la supervivencia (inmortalización) y/o la estimulación selectiva de la proliferación de las células iniciadas respecto a las normales. Posteriormente, un proceso reversible, de tipo epigenético, conocido como promoción facilita la expresión del fenotipo iniciado y la expansión de células iniciadas. Durante la promoción las células en las que se indujo el fenotipo iniciado expresan su potencial de proliferación, estableciendo poblaciones celulares localizadas (nódulos, papilomas, pólipos) de carácter benigno. Finalmente, durante el proceso de progresión la acumulación de alteraciones fenotípicas en la población celular iniciada las convierten del estado pre-maligno en un tipo celular neoplásico [12]. Esta última fase del desarrollo tumoral comienza una vez establecido de forma irreversible el modelo focal de proliferación celular típico durante la promoción, uno o más de esos focos pre-neoplásicos sufren alteraciones adicionales que resultan en la expresión del fenotipo maligno. En esta fase las células presentan una inestabilidad genómica, típicamente son aneuploides, características que puede ser debidas a las mutaciones adquiridas en las fases anteriores, por herencia o factores extracelulares. Otras características de esta etapa son la capacidad de invadir y hacer metástasis, incremento en la velocidad proliferativa, des-diferenciación celular, reducción en la capacidad antigénica y resistencia a agentes quimioterapéuticos [12].

1.2 El cáncer en la actualidad

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, tan solo en 2018 se contabilizaron 18, 078, 957 nuevos casos a nivel mundial, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia y el cáncer de pulmón el de mayor mortalidad (OMS, 2018). En México representa un problema importante de salud pública, es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. En el año 2017 la Secretaría de Salud registró 84 mil 142 defunciones causadas por cáncer (51.2% en mujeres y 48.8 % en hombres). Entre las mujeres, las principales causas de muerte por tumores malignos fueron: cáncer de mama (14.2%), de cuello del útero (11.3%), de hígado (8.3%) y de estómago (7.3%). Entre los hombres fueron el cáncer de próstata (16.1%), de tráquea, bronquios y pulmón (12.8%), de estómago (8.6%) y de hígado (8.2%) (INEGI, 2018). Una de las razones del por qué sigue habiendo una alta tasa de mortalidad en las personas que presentan esta

enfermedad es porque los agentes terapéuticos no apagan completamente todas las vías que promueven el cáncer permitiendo que algunas células tumorales sobrevivan y su progenie se adapte a la presión selectiva impuesta por la terapia aplicada.

1.3 Células troncales cancerosas

Anteriormente, las células que se han transformado a un estado maligno dentro de los tumores eran consideradas como una población homogénea, sin embargo, actualmente sabemos que un tumor es una entidad heterogénea que contienen regiones demarcadas por varios grados de diferenciación, proliferación, vascularidad, inflamación e invasividad. Una subpoblación recientemente estudiada son las denominadas “cáncer stem cells” (CSC) o células troncales cancerosas las cuales conducen al crecimiento, recurrencia del tumor y son resistentes a las terapias convencionales [12,13].

Durante el proceso de maduración de las células troncales normales pueden ocurrir alteraciones genéticas, con las cuales se puede dar inicio al desarrollo tumoral. Puede suceder que una célula troncal normal adquiera una primera mutación (evento pre-tumoral) lo cual provoque inestabilidad genómica contribuyendo a la adquisición de una segunda mutación. También puede ocurrir que una célula troncal normal adquiera una primera mutación que le permita continuar con su proceso de maduración y en el estado de célula progenitora o precursora adquiera una segunda mutación o bien, las células troncales y progenitoras tengan un desarrollo normal y sea hasta que la célula esté completamente diferenciada que se adquiera los eventos genéticos necesarios para el desarrollo de la enfermedad [14]. Lo anterior genera la aparición de una célula iniciadora de tumor que adquiere la capacidad de autorenovación, dando lugar a una *célula troncal cancerosa* (“stem-like”) responsable no sólo de la iniciación, desarrollo, metástasis y recurrencia del tumor sino también de la resistencia terapéutica [15,16].

Una célula troncal se caracteriza por dos propiedades: auto-renovación y la capacidad de desarrollarse en múltiples linajes celulares [17]. Las CSC pueden bloquear su diferenciación debido a alteraciones cromosómicas en factores de transcripción que regulan genes importantes en el mantenimiento de un estado multipotencial [17]. Por otro lado, el incremento en la proliferación celular se debe a la activación de receptores para factores de crecimiento que envían continuamente señales mitogénicas, la activación de vías de

señalización que induzcan a la proliferación celular y desregulación en los niveles de proteínas que regulen el control del ciclo celular [16]. Las CSC poseen numerosos mecanismos de resistencia a las terapias convencionales, incluidas la expresión del transportador con el cassette de unión a ATP (ABC) [18,19] la activación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina [20], activación de las vías de supervivencia Akt/PKB y ATR/CHK1 [21,22], presentan una señalización aberrante de la vía PI3K/Akt/mTOR [23,24], tienen amplificada la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) [25] y el factor NF- κ B está constitutivamente activado [26]. También pueden evadir la apoptosis por la adquisición de alteraciones en genes como BCL2 y FAS [27] y por señales autócrinas mediadas por interleucina (IL)-4 en CSC de colon [28].

Las CSC se pueden identificar y aislar por la presencia de diferentes marcadores de superficie [29] (Tabla 1), su habilidad para formar esferas en un medio no adherente y su habilidad para excluir ciertos fluorocromos [30]. Sin embargo, estos ensayos no permiten identificar completamente a la subpoblación de células troncales cancerosas que se encuentra en un tumor. Por lo que, los ensayos *in vivo* son considerados los más adecuados para determinar la población de este tipo celular; en estos ensayos la población de las células troncales tumorales es medida por la habilidad de producir tumores en diluciones limitadas en modelos murinos [31]. Una de las características más notables de estas células es su habilidad para generar metástasis. El proceso metastásico inicia con la transición epitelial mesenquimal (*Epithelial to Mesenchymal Transition*, EMT). Durante la EMT las células epiteliales pierden sus características diferenciadas, como adhesión y falta de motilidad, y adquieren características de células mesenquimales que le confieren habilidades de migración, invasión y resistencia a la apoptosis [32, 33]. Éstas características de las células troncales tumorales, podrían utilizarse para ser blancos terapéuticos.

Tabla 1. Marcadores de superficie de diferentes células troncales cancerosas

Tipo de tumor	Marcador de superficie	Ref
Cáncer de mama	CD44+/CD24- CD44+/CD24-/ESA+ CD44+/CD24-/ALDH+	[103,104]
Cáncer de ovario	CD133+ CD44+/CD24-	[104]

Glioblastoma	CD133+ CD15+	[105]
Cáncer de próstata	CD44+/A2B1 hi/CD133+	[106]
Cáncer de colon	CD133+/CD44+	[107]
Melanoma	CD20+ ABCB5+	[108]
Cáncer de páncreas	CD44+/CD24+/EpCAM+	[109]

1.4 Ivermectina como antiparasitario.

Las avermectinas son un complejo de lactonas macrocíclicas de 16 miembros producidas por la fermentación del actinomiceto *Streptomyces avermectinius* [1,2]. Existen ocho compuestos de avermectina (A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a y B2b), y entre ellos, la mezcla de 80% de B1a y 20% de B1b, conocida como ivermectina, es la más segura y tiene la mayor actividad antiparasitaria [3]. La ivermectina es un agente antihelmíntico usado en animales y humanos. Fue aprobada por primera vez para su uso en humanos en 1987 por la Administración de medicamentos y alimentos (*Food and Drug Administration*, FDA). Se usa para tratar parasitosis humanas como: oncocercosis en dosis de 0.15-0.20 mg / kg [4], filariasis linfática en dosis de 0.40 mg / kg [5], estrongiloidiasis en dosis de 0.15-0.20 mg / kg [6], ascariasis y enterobiasis en dosis de 0.2 mg / kg [7]. Mientras que la dosis terapéutica humana oscila entre 0.1-0.4 mg / kg, un estudio de fase I en voluntarios sanos informó que la administración de hasta 2 mg / kg es bien tolerada [8]. Como antiparasitario, la ivermectina interacciona con los canales de iones cloruro dependientes de glutamato, evitando su cierre y provocando la hiperpolarización de la membrana plasmática, que a su vez bloquea la neurotransmisión y paraliza los músculos faríngeos y somáticos del parásito, lo que lleva a su muerte [34].

La ivermectina ha sido administrada a millones de pacientes con oncocercosis, y otras infecciones, alrededor del mundo. Los efectos adversos de la terapia oral con ivermectina no son poco comunes, mucho de ellos aparecen dentro de las 24-48 horas posteriores al inicio de la terapia y están relacionados con la dosis de ivermectina y con la carga microfilarial en la piel [35,36]. Algunos de los efectos adversos leves incluyen mialgia, erupciones cutáneas, hinchazón de las articulaciones, extremidades o del rostro, comezón, fiebre y resfriado, estos

efectos son transitorios y no requieren tratamiento [37, 38]. Los efectos moderados a severos son menos comunes y pueden incluir prurito, edema en la piel con la presencia de dolor, artralgia, dolores en los huesos, mareo severo, fiebre alta, disnea e hipotensión (Reacción de Mazzotti). Se ha reportado que ésta reacción no está relacionada con la administración de ivermectina pero sí con la cantidad de parásitos presentes en huésped [36, 39]. Lo anterior sugiere que estas reacciones son debidas al efecto de los parásitos más que a la toxicidad intrínseca de la ivermectina. Adicionalmente a la reacción de Mazzotti se han presentado casos de encefalopatía severa, incluso letal en pacientes con oncocercosis y filariasis posterior al tratamiento con ivermectina; los síntomas de la encefalopatía que comprenden estado mental alterado, incontinencia y dificultad para estar de pie o caminar se presentan 48 horas post tratamiento con ivermectina [40, 41]. Es altamente probable que este efecto adverso sea debido a la obstrucción de la microcirculación cerebral por la acumulación de parásitos paralizados o muertos por la acción de la ivermectina lo cual puede generar una embolia masiva en el cerebro [39,40]. Pacientes infectados con escabies presentaron dolor de cabeza severo, dolor abdominal, náuseas, taquicardia [42,43]. En pacientes con strongiliodiasis crónica se presentaron efectos adversos como náuseas y vómito posterior a la ingesta de ivermectina [44]. En la tabla 2 se resumen los efectos adversos causados por el tratamiento con ivermectina.

Tabla 2. Efectos secundarios del uso de ivermectina.

	Leves	Moderados	Severos	Ref
Oncocercosis	mialgia,erupciones cutáneas, hinchazón de las articulaciones, extremidades o del rostro, comezón, fiebre y resfriado	prurito, edema en la piel con la presencia de dolor, artralgia, dolores en los huesos, mareo severo, fiebre alta, disnea e hipotensión		[4]
Filariasis	dolor de cabeza, náuseas		encefalopatía	[5]
Escabiosis	náuseas	dolor de cabeza severo, dolor abdominal, taquicardia		[6]
Estrongiliodiasis	náusea, vómito			[6]

1.5 Ivermectina usado para otras condiciones diferentes a las parasitosis.

Debido a su posible agonismo para el receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA) [97] la ivermectina se ha utilizado en humanos de manera experimental para tratar otras condiciones. Por ejemplo, en pacientes espasticidad severa provocada por daño en la médula espinal se han administrado hasta 1.6 mg/Kg subcutáneamente 2 veces por semana durante 12 semanas sin la presencia de efectos adversos [45]. También se han realizado estudios de toxicidad en humanos y se ha demostrado que la ivermectina es tolerada a dosis superiores (hasta 2 mg/Kg) a las usadas comúnmente como antiparasitario sin la presencia de efectos adversos [8].

1.6 Estudios fase I y dosis altas de ivermectina

A pesar de que la ivermectina es un antiparasitario muy utilizado en medicina veterinaria, su administración puede provocar efectos tóxicos. La mayoría de ellos derivan de la sobredosificación del compuesto, aunque también se han descrito, a dosis terapéuticas, casos de susceptibilidad a los efectos neurotóxicos del fármaco en determinadas razas o subpoblaciones de animales, así como reacciones anafilácticas por la destrucción masiva de parásitos [46]. Este compuesto tiene un amplio margen de seguridad en rumiantes, cerdos y équidos, así como en la mayor parte de las razas de perros [47,48]. La toxicidad aguda de este compuesto se ha investigado en diversas especies de animales usados como modelos de estudio en la investigación. Los signos de toxicidad fueron semejantes tras la administración oral e intraperitoneal en ratas y ratones y los efectos consistieron en ataxia, temblores, y actividad reducida [49]. En etapas tempranas de desarrollo, la ivermectina a dosis de 0.4-0.8 mg/kg en ratones, 10 mg/kg en ratas y 3-6 mg/kg en conejos, incrementó la incidencia de paladar hendido, sin embargo, no se le consideró embriotóxica dado que la frecuencia de anomalías fue muy baja [50]. Los efectos tóxicos se han relacionado con su interacción con la glicoproteína-P, la cual limita su acceso al sistema nervioso central. La ausencia de ésta proteína determina la acumulación de la ivermectina en el cerebro de ratones transgénicos que no la expresan. Finalmente, en monos adultos que ingirieron diariamente durante 16 días, 1.2 mg/kg, no se detectaron efectos adversos [50]. Hay diversos reportes toxicológicos de la ivermectina en diferentes especies, la dosis letal media reportada en ratones es de 25 mg/kg administrada oralmente y de 30 mg/kg administrada intraperitonealmente, para las ratas la

dosis letal media es de 50 mg/kg por vía oral y 55 mg/kg por vía intraperitoneal, en conejos es de 406 mg/kg en aplicación tópica, en perro es de 80 mg/kg administrada oralmente (reporte FDA, 1996). En conclusión, aunque la ivermectina es, generalmente, un fármaco seguro y bien tolerado, su administración puede dar lugar a algunos efectos tóxicos, bien como consecuencia de la sobredosificación o por hipersusceptibilidad al compuesto.

1.7 Farmacocinética de la ivermectina.

La farmacocinética de la ivermectina ha sido bien estudiada en diversos mamíferos, incluidos los humanos; es un compuesto liposoluble, su concentración máxima en plasma se alcanza de 4-5 horas posterior a su administración oral, su vida media es aproximadamente de 19 horas y se metaboliza en el hígado por el complejo citocromo CYP3A4 generando 10 metabolitos en su mayoría desmetilados e hidroxilados. Su excreción es principalmente por las heces y solo el 1% es excretado por la orina [51]. En individuos sanos y en pacientes infectados con oncocercosis tratados con una dosis de 150 µg/kg de ivermectina no se observaron diferencias significativas en parámetros farmacocinéticos como absorción, distribución, metabolismo y excreción. En la tabla 3 se muestran los datos farmacocinéticos de la ivermectina en humanos infectados con parásitos y en humanos sanos a diversas dosis de ivermectina [51, 8].

Tabla 3. Datos farmacocinéticos de la ivermectina en humanos

Población	Dosis (mg/kg)	Vía de admin.	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC µg/h/mL	Ref.
Pacientes con oncocercosis	0.1 - 0.2	Oral	52.0	5.2	2.852	[51]
Sanos	0.35 - 0.6	Oral	87.0	4.2	1.444	[8]
Sanos	0.7 - 1.1	Oral	165.2	3.6	2.099	[8]
Sanos	1.4 - 2.0	Oral	247.8	4.2	4.547	[8]

La concentración molar alcanzada tomando en cuenta la exposición total de la droga medida por el área bajo la curva (AUC) en individuos sanos o pacientes es de: **3.25 µM/hora** en pacientes parasitados con una dosis de 0.1-0.2 mg/kg, **1.64 µM/hora** en sujetos sanos con

una dosis de 0.35- 0.6 mg/kg, **2.4 $\mu\text{M/hora}$** en sujetos sanos con una dosis de 0.7-1.1 mg/kg y de **5.2 $\mu\text{M/hora}$** en sujetos sanos con una dosis de 1.4 a 2 mg/kg [8]

1.8 Reposicionamiento de la ivermectina como agente antitumoral.

Actualmente se sabe que la ivermectina tiene diversas funciones más allá de su papel antiparasitario [9], y existen múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado un efecto antitumoral en varios tipos de cáncer. Algunos de los blancos que son afectados por la ivermectina incluyen la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR) [59], las rutas Akt / mTOR y WNT-TCF [60, 61], la proteína PAK1 [62, 63], el andamio molecular SIN3 [64], la helicasa NS3 DDX3 [65], los genes de pluripotencia *Nanog*, *Sox2* y *Oct4* [66], los receptores de los canales de cloruro [67] y los receptores P2X4 / PX27 [68,69]. Además, se reconoce su efecto para inducir daño en el ADN, lo que lleva a la detención del ciclo celular [70,71]. Los diferentes mecanismos moleculares que se han descrito para la ivermectina conducen a la muerte de las células cancerosas y a la reducción del volumen tumoral. Estos antecedentes hacen que la ivermectina sea un fármaco con gran potencial para reposicionar terapéuticamente. Lo cual significa que además de su acción como antiparasitario podría llegar a ser administrado como una terapia antitumoral.

2. ANTECEDENTES

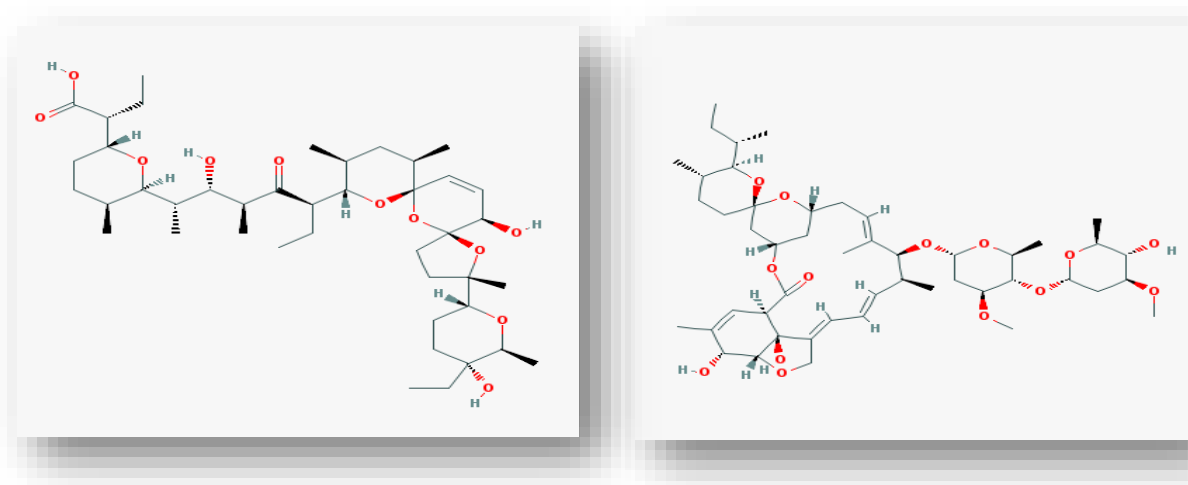
En el año 2009 se publicaron los resultados de un "screening" mediante el uso de una librería de 16,000 compuestos para encontrar drogas con actividad selectiva o preferencial sobre la población de CSC de cáncer de mama, las cuales fueron aisladas mediante citometría de flujo con la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia, usando los marcadores CD44⁺/CD24⁻. Únicamente el 2% de los compuestos mostraron en menor o mayor grado selectividad para las células de esta subpoblación, resultando la salinomicina el compuesto más prometedor con esta actividad. La salinomicina es un ionóforo que es rápidamente embebido en las membranas biológicas, plasmática y mitocondrial [73] y se usa como antiparasitario en la medicina veterinaria, sin embargo, su uso en humanos no está aprobado. Debido a que se demostró que la salinomicina puede inhibir el crecimiento de las CSC, en nuestro grupo de investigación y en colaboración con el Dr. José L. Medina-Franco se realizó un modelado *in silico* [81] para buscar drogas que se parecieran estructuralmente a la

salinomicina [66], partiendo del principio de la similitud molecular el cual establece que compuestos estructuralmente similares demuestran propiedades similares [98,99]. Con el objetivo de poder identificar fármacos que estuvieran aprobados por la FDA y que tuvieran similitud estructural a la salinomicina se realizó una búsqueda computacional en la base de datos DrugBank 4.0. La estructura química de la salinomicina se usó para calcular la similitud en dos dimensiones de cada uno de los 1623 compuestos de DrugBank, se utilizaron las claves del Sistema de Acceso Molecular [100] y el coeficiente de Tanimoto [101]. Los resultados de este estudio mostraron que la ivermectina tuvo el valor de similitud más alto 0.78 (Figura 1) Con estos datos podemos hipotetizar que la ivermectina podría tener propiedades biológicas similares a la salinomicina y al ser un fármaco aprobado por la FDA podría reposicionarse en la terapia del cáncer.

Aunque el mecanismo exacto sobre cómo la salinomicina ataca preferencialmente a las CSC no está claro, hay diversos reportes que han contribuido a comprender algunos mecanismos y modos de acción de la salinomicina sobre éste tipo celular. Inhibe la viabilidad celular particularmente de las CSC, así como la formación de mamosferas, el tamaño del tumor y el proceso de metástasis en un modelo *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama [72]. Induce muerte celular por apoptosis, la cual puede ser diferente dependiendo el tipo celular. Por ejemplo, en células leucémicas la apoptosis es independiente de caspasas [74,75], por el contrario en células de cáncer de próstata activa la vía mitocondrial de apoptosis y el procesamiento de PARP mediado por Caspasa3, también puede mediar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) conduciendo a la apoptosis [76]. Se ha demostrado que la salinomicina es un potente inhibidor del transportador ABC (P-glycoprotein/MDR1) en diferentes líneas celulares [76,77]. Existen reportes en los que se observó que la salinomicina reduce los niveles del correceptor Wnt (LRP6) y de los genes blanco de la vía de Wnt (LEF1 y Ciclina D1) en células de leucemia linfocítica crónica, lo cual conduce a su muerte [78]. También puede inhibir la fosforilación oxidativa en la mitocondria, lo cual conduce a la muerte celular [73]. Finalmente, la salinomicina puede promover la diferenciación de las CSC e inducir a la reprogramación epitelial de las células que han entrado en la EMT, mediante la regulación de genes involucrados en este proceso [72, 79].

A pesar que éstos datos son muy alentadores la salinomicina es un fármaco que no está aprobado para su uso en humanos, por lo que, su reposicionamiento terapéutico para el

tratamiento del cáncer en humanos requeriría de más información preclínica y clínica en comparación a otros fármacos que ya se usen en humanos para alguna enfermedad diferente al cáncer. Aun así, cabe mencionar que se ha administrado salinomicina a 5 pacientes: dos con cáncer de mama, y una paciente con cáncer de ovario, uno con cáncer de cabeza y cuello y una paciente con cáncer de vulva. La salinomicina se administró en 12 ocasiones por vía subcutánea a una dosis de 200-250 $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$. En todos los pacientes se observó una regresión tumoral y una detención de la progresión de la enfermedad. Los efectos secundarios presentes en los pacientes fueron taquicardia y temblor, sin toxicidad tardía [80].



Salinomicina

Ivermectina

Figura 1. Estructuras químicas de la salinomicina e ivermectina.

En 1999 se publicó el primer reporte de la funcionalidad de las avermectinas como un posible fármaco antitumoral [82]. En este reporte se evaluó el efecto del complejo de avermectinas (aveseptina) y de las avermectinas por separado (A1, A2, B1 y B2) en la línea leucémica linfoide P-388, observaron que a concentraciones de 0.1 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hay una inhibición del crecimiento celular y una inducción a la muerte celular mediante la vía apoptótica. La sensibilidad de las células a aveseptina fue mayor en comparación a las avermectinas por separado; sólo la avermectina A1 tuvo actividad citotóxica a la concentración administrada. La avermectina A2 tuvo actividad *citostática* y las avermectinas B1 y B2 no presentaron actividad en estas condiciones experimentales. Posteriormente, se demostró que la aveseptina a una concentración de 0.1 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inhibe

la proliferación celular de las líneas ECA (Erllich Carcinoma Ascites), Hep2 (carcinoma de laringe) y Ns/o (mieloma murino) y se demostró que la inhibición de la proliferación fue debido al arresto en el inicio del ciclo celular y al bloqueo del ciclo mitótico. Los investigadores observaron características de muerte celular por apoptosis (condensación y fragmentación de la cromatina y ADN). Nuevamente reportaron que la avermectina A1 tuvo actividad citotóxica a la concentración administrada y además de la avermectina A2, la avermectina B2 tuvo actividad citostática, sin embargo la avermectina B1 no presenta actividad en estas condiciones experimentales [83]. Por otra parte, se ha demostrado que las avermectinas, en las líneas celulares quimioresistentes Hep2 y P388, modifican la sensibilidad a los agentes antineoplásicos como el paclitaxel y la vincristina, los cuales se une a los microtúbulos impidiendo su despolimerización y polimerización durante la división celular respectivamente, haciéndolas más susceptibles a la muerte celular [84]. Finalmente, en 2001 se demostró que la avermectina B1, a una dosis de 1 mg/kg, incrementa la supresión del crecimiento tumoral de las líneas ECA y P388, inducido por vincristina, el cuál es un fármaco que inhibe la polimerización de la tubulina durante la metafase de la mitosis [85].

Diversos grupos de investigación han reportado que la ivermectina (avermectina B1a-B1b en proporciones 80:20, es un potencial agente antitumoral, inhibe el crecimiento celular en diferentes líneas tumorales y reduce el tamaño del tumor en modelos murinos [9]. De manera general, la ivermectina actúa como un regulador alostérico en diversas vías de señalización involucradas en la proliferación, muerte celular, diferenciación celular y metástasis. Particularmente, en líneas de cáncer de ovario se describió que bloquea la actividad cinasa PAK1 [62]. Esta proteína está involucrada en diversas vías de señalización que juegan un papel importante en la dinámica del citoesqueleto, adhesión celular, migración, proliferación, apoptosis y mitosis y es requerida para el crecimiento de aproximadamente el 70% de diversas neoplasias [86]. En estos trabajos monitorearon la actividad cinasa de PAK1 evaluando la fosforilación de uno de sus blancos principales, RAF-1, y se observó una disminución considerable en dicha fosforilación, indicando que la ivermectina inactiva a PAK1, dando como resultado la inhibición del crecimiento celular a concentraciones superiores a 10 μ M [62]. En líneas de cáncer de mama, la ivermectina estimula la macroautofagia/autofagia citostática *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que puede inhibir la vía

de ATK/mTOR al promover la degradación por ubiquitinación de PAK1, esta proteína se une a AKT, lo cual facilita la fosforilación y activación de AKT. Sin embargo, ivermectina interrumpe dicha interacción, lo cual resulta en la inactivación de la vía AKT/mTOR que es un modulador negativo en la inducción de autofagia en el cáncer de mama; los efectos de la ivermectina como antitumoral se observaron a concentraciones superiores a 10 μ M [63].

En células de glioblastoma se observó que inhibe el crecimiento y la formación de colonias dependientes de anclaje y suprime el crecimiento tumoral en dos modelos murinos. En éstas células bloquea la actividad enzimática del complejo I de la cadena respiratoria, con lo que disminuye la respiración mitocondrial, el potencial de membrana, los niveles de ATP e incrementa la generación de superóxidos, lo cual induce a la muerte por apoptosis dependiente de caspasas. También se observó una inhibición de la angiogénesis al inhibir la formación de redes capilares; los efectos en éste tipo celular se observaron a concentraciones superiores a 5 μ M [60]. En células leucémicas, la ivermectina induce la muerte celular y disminuye el crecimiento de tumor en modelos murinos. Esto es debido a un incremento en la concentración de cloro intracelular, lo cual genera un incremento en el tamaño celular e índice la hiperpolarización de la membrana, así como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). El efecto antitumoral se observó con concentraciones superiores a 10 μ M [67].

La sobreexpresión de los receptores P2X4/7 correlaciona con el crecimiento tumoral y la metástasis, la ivermectina modula alostéricamente a dichos receptores en células triple negativo de cáncer de mama humanas y murinas, las cuales careen de los receptores de estrógeno, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano. Esta modulación induce a la muerte celular por autofagia y la liberación de ATP y a través de un incremento en las señales purinérgicas dependientes de P2X7 asociadas con la activación de las caspasas 1 y 3, promueve la muerte celular apoptótica y necrótica, estos efectos fueron evidentes a concentraciones superiores a 8 μ M [68]. Por otra parte, también se ha reportado que en células de cáncer de hígado la ivermectina inhibe a YAP1, *in vitro* e *in vivo*, el cual es un regulador transcripcional, activa la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular y suprime genes apoptóticos. Dicha inhibición detiene la proliferación celular y reduce el tamaño tumoral a concentraciones superiores a 10 μ M [87].

Recientemente se ha reportado que la ivermectina es un inhibidor de la ARN helicasa en su dominio NS3 DEAD-box, el cual es indispensable para la replicación de flavovirus [88], por tal motivo en 2015 se realizaron ensayos en donde muestran que la ivermectina inhibe la actividad de la ARN helicasa DDX23, la cual está encargada del procesamiento del miR21. Éste microARN se ha asociado con la regulación de la proliferación celular e invasión debido a que tiene la capacidad de regular a dos supresores tumorales: PTEN y RECK. Los resultados indican que la ivermectina inhibe la proliferación celular e invasión y disminuyen el crecimiento tumoral en líneas de glioblastoma, cérvix, pulmón, próstata y páncreas a concentraciones de 25 μM [65].

Se sabe que la vía de señalización de WNT/TCF está constitutivamente activa en diversos tipos de cáncer y regula genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular. Se ha demostrado que la ivermectina puede inhibir la vía de señalización de WNT-TCF al disminuir los niveles de un blanco directo de ésta vía, la ciclina D1, afectando también la fosforilación de la Beta-catenina, lo anterior conduce a la inhibición de la proliferación e incrementa la apoptosis en células tumorales de pulmón y colon, *in vivo* reduce el tamaño tumoral dependiente del factor celular T (TCF), estos efectos son evidentes a concentraciones superiores a 5 μM [61].

Finalmente se ha demostrado que la ivermectina y la selamectina inhiben la interacción del co-represor SIN3 con el dominio SID de la proteína MAD, lo cual resulta en una inducción de la expresión de CDH1 y ESR1 y el restablecimiento a la sensibilidad al tamoxifen en un modelo de cáncer de mama triple negativo. *In vitro* se observó una disminución en la formación de mamosferas y en modelos *in vivo* se observó una disminución de en la capacidad de metástasis por la reducción de la expresión de genes involucrados en el mantenimiento del estado pluripotencial (*Sox2* y *Nanog*); estos resultados se observaron con una concentración de 1 μM de ivermectina, es importante mencionar que los estudios *in vivo* únicamente se realizaron con salemectina [64]. La tabla 5 resume los diferentes estudios publicados sobre ivermectina como un potencial agente antitumoral.

Tabla 5. Efectos de la ivermectina como agente antitumoral.

Tumor	Línea celular	Concentración molar	Efectos	Modelo <i>in vivo</i> y dosis	Efectos	Mecanismo de acción	Ref
Leucemia y próstata	OCI-AML2 HL60 U937 K61a DU145 PPC-1	10, 15 y 20 μM	Inducción de muerte celular. Induce un incremento en la cantidad de ROS	Ratones desnudos NOD/SCID 3 mg/kg	Reduce el volumen tumoral	Incrementa el cloro intracelular y genera hiperpolarización de la membrana plasmática	[67]
Glioblastoma	U87 T98G HBMEC	10 μM	Inhibición del crecimiento y la formación de colonias. Inducción de apoptosis dependiente de caspasas	Ratones desnudos SCID 40 mg/kg	Reduce el volumen tumoral y angiogénesis.	Inhibición de la respiración mitocondrial al bloquear la actividad enzimática del complejo I mitocondrial	[60]
Ovario	RMUG-S TYK HEI-193	10, 100 μM	Inhibición de la proliferación	No hay experimentos <i>in vivo</i>		Inhibición de la actividad cinasa de PAK1	[62]
Mama	MDA-MB435231 ,468, 361 MCF7 HS578T	10, 20 y 40 μM	Inhibición de la proliferación celular. Estimula la autofagia	Ratones desnudos NOD/SCID 6 mg/kg	Reduce el volumen tumoral	Promueve la degradación, de PAK1 e inactivación la vía AKT-mTOR	[63]
Mama	MDA-MB231 MCF7 SKBR3 4T1.2	8, 16 y 32 μM	Inhibición de la proliferación celular y capacidad clonogénica. Induce un incremento en la cantidad de ROS	No hay experimentos <i>in vivo</i>		Modula los receptores P2X4/P2X7 lo cual induce apoptosis y necrosis. Induce autofagia	[68]
Cérvix Pulmón Próstata Páncreas	U87MG HeLa A549 DU145 PANC-1	25 μM	Inhibición de la proliferación celular e invasividad	Ratones desnudos Balb/c 3 y 10 mg/kg	Reduce el volumen tumoral	Inhibe la actividad de DDX23 generando una disminución de miR-21	[65]

Hígado	H1299 H290 KKU- M213	10 μM	Inhibición de la proliferación celular	Ratones desnudos Balb/c 10 mg/kg	Reduce el volumen tumoral	Inhibe YAP1.	[86]
--------	-------------------------------	-----------------------------	--	--	---------------------------	--------------	------

Es evidente que el efecto de la ivermectina es pleiotrópico y depende del tipo celular. Su efecto sobre otros tipos de células tumorales es aún desconocido y en los reportes anteriores las dosis que se han usado en líneas celulares y en modelos murinos son superiores a la dosis máxima aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en humanos. Por este motivo, en este proyecto queremos responder si la ivermectina es capaz de reducir la viabilidad de líneas celulares tumorales de diferentes orígenes y si tiene actividad antitumoral *in vivo* en un modelo murino a la dosis máxima tolerada en humanos.

3. JUSTIFICACIÓN

Diversos autores han demostrado que la ivermectina tiene la capacidad de inducir la muerte celular de diversas líneas celulares cancerosas y es capaz de reducir el tamaño tumoral en modelos murinos. Sin embargo, los tratamientos con ivermectina han sido usados a concentraciones superiores a la máxima reportada como segura en humanos. Por esta razón, en este proyecto evaluaremos si este fármaco tiene las mismas capacidades a concentraciones que entran en el margen de seguridad para los humanos; *in vitro*, en líneas celulares de diversos orígenes, así como en la población CSC e *in vivo* en un modelo murino. Con lo cual, esperamos a mediano plazo permita reposicionar a la ivermectina como un tratamiento para pacientes con cáncer.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con ivermectina a la concentración más alta reportada como segura en humanos producirá efectos de inhibición de crecimiento o muerte en líneas celulares tumorales y efectos antitumorales en un modelo murino.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si ivermectina a la concentración más alta reportada como segura en humanos produce efectos de inhibición de crecimiento o muerte en líneas celulares tumorales y efectos antitumorales en un modelo murino.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de la ivermectina (5 μ M) en la viabilidad celular, potencial de clonogenicidad, ciclo y muerte celular, en diversas líneas celulares cancerosas de diferentes orígenes (mama, ovario, próstata, colon, riñón, cérvix, estómago, páncreas, vejiga, hígado, piel, endometrio, sarcoma, linfoma).
2. Determinar si existe sinergismo entre la ivermectina y fármacos usados como terapia estándar en los diferentes tipos de cáncer derivados de las líneas más sensibles y más resistentes.
3. Analizar el efecto de la ivermectina (5 μ M) sobre las células troncales tumorales de las líneas más sensibles al tratamiento.
4. Determinar si el tratamiento con ivermectina, a una dosis de 3 mg/kg, tiene un efecto antitumoral *in vivo* en un modelo murino de cáncer.

7. METODOLOGÍA

7.1 Líneas celulares y fármacos.

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). Los medios se suplementaron con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Invitrogen, ThermoFisher scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y estreptomycin/anfotericina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) a una concentración final de 100 µg/mL y 0.25 µg/mL respectivamente. Las líneas celulares utilizadas en este proyecto, así como su tejido de origen y el medio de cultivo utilizado, se pueden encontrar en la tabla suplementaria 1. Particularmente, para la línea celular MCF10-A se utilizó el medio DMEM/Ham's F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT) suplementado con suero de caballo al 5% (Invitrogen, CA, USA), 20 µg / ml de factor de crecimiento epidermal humano (hEGF) (Sigma-Aldrich, MO, EE), 0.5 µg/ml de hidrocortisona (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA), 10 µg/ml de insulina (Eli Lilly, IN, USA) y estreptomycin/anfotericina a una concentración final de 100 µg/mL y 0.25 µg/mL respectivamente. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. A continuación, se enlistan los fármacos y sus respectivos vehículos usados en este proyecto.

Fármaco	Vehículo	Concentración	Catálogo
Ciclofosfamida	Solución salina	0.2, 0.5, 1, 1.5 µM	469M98 (Laboratorios PiSA S.A de C.V)
Docetaxel	Etanol absoluto	6, 10,40 y 100 pM 0.1,0.15,0.20 y 0.25 nM	307M2011 (Laboratorios PiSA S.A de C.V)
Ivermectina	Etanol absoluto	0.2, 0.4,0.8, 1 y 5µM	I8898 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Tamoxifeno	Etanol absoluto	0.6, 1, 2, 3 µM	T-5648 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Paclitaxel	Solución salina	0.03, 0.06, 0.09 y 0.15 nM	322M2000 (Laboratorios PiSA S.A de C.V)

7.2 Ensayos de viabilidad celular mediante ensayo de exclusión con azul de tripano.

Para cada línea celular se sembraron 5×10^4 células por pozo en placas de 12 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) con 1 ml de su respectivo medio, durante un período de pre-incubación de 24 h. Posteriormente, las células se trataron con dosis crecientes de ivermectina (0.2, 0.4, 0.8, 1 y 5 μM) y con el vehículo (etanol absoluto al mismo volumen que el de la dosis más alta evaluada de ivermectina), durante un período de 72 h. El medio con las diferentes dosis de ivermectina y del vehículo fue reemplazado cada 24 h. Después de las 72 h, las células se recuperaron con una solución de 0.5% de tripsina 10X - 1% de EDTA (Gibco, NY, USA e Invitrogen, CA, USA, respectivamente). Para el recuento celular con el ensayo de exclusión con azul de tripano las células se mezclaron suavemente en una proporción de 1:1 con la solución de tinción de azul de tripano al 0.4% (Life Technologies®), la viabilidad celular se evaluó con un contador de células automatizado TC10™ (BioRad®). El efecto citotóxico de cada tratamiento se expresó como el porcentaje de la viabilidad celular en relación con las células control. Los datos obtenidos se introdujeron en el software SigmaPlot® versión 10.0., con lo cual se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento y las concentraciones inhibitorias (IC) 10-50 se obtuvieron mediante curvas de supervivencia.

7.3 Ensayos de clonogenicidad

A partir de los ensayos de viabilidad celular se recuperaron 1000 células por cada condición, las cuales se resuspendieron para permitir la formación de una colonia por cada célula. Se cultivaron en cajas Petri cuadradas para cultivo celular (60x15 mm; Corning Incorporated, Corning, NY, USA®) con 2 ml de su respectivo medio de cultivo libre de fármaco durante un período de 14 -21 días, dependiendo de la tasa de replicación de cada línea celular (tabla suplementaria 2). Posteriormente, las colonias se fijaron con una solución de metanol y ácido acético (3: 1 v/v), y se tiñeron con cristal violeta al 0.4% (Sigma-Aldrich, Merck KGaA). El número de colonias formadas se cuantificó automáticamente utilizando el software ImageJ (versión 2.0).

7.4 Ensayos de apoptosis con anexina V mediante citometría de flujo.

Las líneas celulares MCF-7, SKOV-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y DU145 se trataron con ivermectina (5 μ M) o vehículo (etanol absoluto al 0.1%) durante 72 h. Después, las células se recuperaron con una solución de 0.5% de tripsina 10X-1% de EDTA y se lavaron dos veces con PBS 1X. Posteriormente, las células se marcaron con anexina-V-FLUOS (Roche®, Alemania) e yoduro de propidio (Sigma®) y se cuantificaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II. 50,000 eventos por muestra fueron analizados para apoptosis y necrosis mediante el software BC FACSDiva™ V6.1.3 (Becton Dickinson, USA). En el caso de la apoptosis temprana el marcador anexina-V-FLUOS fue positivo y el marcador yoduro de propidio negativo, mientras que para la apoptosis tardía ambos marcadores fueron positivos. Para la detección de la necrosis se estableció con el marcador anexina-V-FLUOS negativo y el marcador yoduro de propidio positivo.

7.5 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

Las líneas celulares MCF-7, SKOV-3, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y DU145 se trataron con ivermectina (5 μ M) o vehículo (etanol absoluto al 0.1%) durante 72 h. Después, las células se recuperaron con una solución de 0.5% de tripsina 10X-1% de EDTA y se lavaron dos veces con PBS. Inmediatamente, las células se resuspendieron en una solución de etanol al 70% y se fijaron a 4 ° C durante 30 minutos. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS. Finalmente, se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma®) durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se contabilizaron 50,000 eventos por muestra para evaluar el porcentaje de células que se encuentran en las diferentes fases del ciclo celular con un citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson, USA). El análisis de cada evento se realizó con el software ModFit LT V.2.0 (Verity Software House).

7.6 Curvas de viabilidad e identificación de concentraciones inhibitorias (CI) de los fármacos quimioterapéuticos.

Se sembraron 5×10^4 células, de las líneas celulares DU145, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y SKOV-3, en microplacas de 12 pozos con 1 ml de su respectivo medio durante un período de preincubación de 24 h. Posteriormente, las células se trataron con dosis crecientes de cisplatino (1, 3, 5, 10 o 20 μ M), ciclofosfamida (0.5, 1, 3, 5 o 10 μ M), docetaxel (1, 10,

100 pM, 1 o 10 nM), paclitaxel (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 o 1 nM), o tamoxifeno (0.5, 1, 3, 5 o 10 μ M), o con su vehículo correspondiente, durante un período de 72 h. El medio de cultivo con las diferentes dosis de los quimioterapéuticos o el vehículo fue reemplazado cada 24 h. Después de 72 h se cuantificó la viabilidad celular como se indicó anteriormente. Finalmente, los valores CI₂₀, 30, 40 y 50 se identificaron con el software SigmaPlot®

7.7 Combinaciones farmacológicas

Las concentraciones inhibitorias (CI) CI₂₀, CI₃₀, CI₄₀ y CI₅₀ de ivermectina se combinaron con las CI₂₀, CI₃₀, CI₄₀ y CI₅₀ de paclitaxel, docetaxel, tamoxifeno, ciclofosfamida o cisplatino, determinadas en cada una de las líneas celulares DU145, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 y SKOV-3 durante 72 h, para posteriormente realizar ensayos de viabilidad como se describió anteriormente. Las posibles interacciones farmacológicas resultantes de la combinación de ivermectina con las diferentes quimioterapias se determinaron utilizando el método del índice de combinación (IC) de la fórmula de Chou y Talalay, con el software Calcsyn (Biosoft®) [89].

7.8 Obtención de CSC a través de marcadores de troncalidad mediante citometría de flujo.

Se cultivaron las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-468 y SKOV-3 en una caja de cultivo de 75 cm² (Corning Incorporated, Corning, NY, USA), con su respectivo medio hasta que alcanzaron 80 % de confluencia. Posteriormente, las células se colectaron con una solución de PBS-EDTA (Invitrogen, CA, USA), y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, se resuspendieron en 1 ml de la solución de lavado (PBS+ 3% SFB). Un millón de células se incubaron con anticuerpos monoclonales (2 μ g/mL) conjugados con un fluoróforo contra CD44-FITC humano (BD Biosciences, 555742) y CD24-PE humano (BioLegend, Inc, 311106), o contra sus respectivos controles de isotipo (FITC-IgG2 κ , BD Biosciences, 555742; PE-IgG2 α , BD Biosciences, 555574) a 4 °C en condiciones de oscuridad durante 40 minutos. Las células marcadas se lavaron 2 veces con la solución de lavado. La población con características de troncalidad con los marcadores CD44⁺/CD24⁻ se separó del resto de la población celular mediante el citómetro de flujo BD FACSAria II (BD Biosciences) y se utilizó el software BD FACSDiva versión 6.1.3 (BD Biosciences). La población troncal se

sembró en cajas de baja adherencia (Corning, ME, USA) en condiciones de troncalidad, como se describe en la siguiente sección, a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 15 días.

7.9 Evaluación de viabilidad celular en CSC.

Las células con características de troncalidad (CD44⁺/CD24⁻) recuperadas de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-468 y SKOV-3 se cultivaron en cajas de baja adherencia (Corning, ME, USA) con medios de cultivos que favorecen el crecimiento de este tipo celular. Para la línea celular de cáncer de ovario se utilizó el siguiente medio: DMEM/Ham's F12 (Caisson Labs, UT, USA) suplementado con 4 µg/ml de insulina (Eli Lilly, IN, USA), 20 ng/ml de hEGF (Sigma-Aldrich, MO, USA), 1 ng/ml de hidrocortisona (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA) y suplemento B27 (Gibco, NY, USA). Para las líneas celulares de cáncer de mama, se utilizó el siguiente medio: MammoCult (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA) suplementado con 10% de suplemento de proliferación MammoCult (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA), 4 µg/ml de heparina (Sigma-Aldrich, MO, USA) y 0.48 µg/ml de hidrocortisona (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA). El medio suplementado de todas las líneas celulares se cambió cada 2 días. Después de un período de crecimiento de 15 días, las esferas alcanzaron una confluencia cercana al 60-70%, posteriormente, se recuperaron y centrifugaron a 350 g durante 5 minutos. A continuación, se sembraron 5x10³ células de cada línea celular en placas de 24 pozos de baja adherencia (Corning, ME, USA) y se trataron con ivermectina (5 µM) o etanol durante 72 h. Finalmente, las células se tiñeron con azul de tripano para evaluar la viabilidad celular como se describió anteriormente.

7.10 Retro-transcripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)

La expresión de genes fue cuantificada mediante RT-qPCR. La población no- y la población CSC de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-468 y SKOV-3 se trataron con ivermectina (5 µM) o etanol durante 72 h como se describió anteriormente. Posteriormente, se aisló el ARN total mediante el empleo de TRIzol (Gibco, ThermoFisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usó 1 µg de ARN total para la síntesis de ADNc con el kit

GeneAmp ARN PCR Core (Applied Biosystems; ThermoFisher Scientific, Inc.). El ADNc se mezcló con iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad Laboratories, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones qPCR se realizaron utilizando un termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Inc.). Las condiciones del ciclo de qPCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. Los datos se analizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (12), y se reportaron como el cambio en la expresión de los genes normalizado con el control endógeno para el cual se utilizó al gen *hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa 1* (HPRT1). Los cebadores utilizados para cada gen fueron los siguientes: *Nanog* (forward 5'-ACC TCG CTG ATT AGG CTC CAA-3', reverse 3'-AGT CTGGAC ACT GGC TAA TCC-5'); *Oct-4* (forward 5'-CAG GCC CGA AAG AGA AAG C-3', reverse 3'-CCA CAC TCG GAC CAC ATC CT-5'); *Sox-2* (forward 5'-GCT AGT CTC CAA GCG ACG AAA-3', reverse 3'-AAT TCA GCA AGA AGC CTC TCC TT-5') y *Maml3* (forward 5'-GGG CGG CAT AAA CAC CAA-3', reverse 5'-GAC ACG CGC GAC ACA CA-3').

7.11 Western Blot

Las líneas celulares DU145, MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 y se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² y se trataron con ivermectina (5 µM) o su vehículo durante 72 h, como se mencionó anteriormente. Las proteínas totales se extrajeron con tampón de radioinmunoprecipitación (NaCl 150 mM; IGEPAL CA-630 al 1.0%; desoxicolato de sodio al 0.5%; SDS al 0.1%; Tris 50 mM, pH 8.0) en presencia de inhibidores de proteasas (catálogo no. P8340, Sigma-Aldrich, Merck KGaA). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de ácido bicinonínico. Se usaron 30 µg de proteína, se separaron mediante SDS-PAGE en un gel al 12% o 15%, y se hizo la transferencia a una membrana de difluoruro de polivinilideno (cat. No 162-0177, Bio-Rad Laboratories, Inc). La membrana se bloqueó con leche desnatada al 10% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con los siguientes anticuerpos primarios: anti-PCNA (1: 1500; cat. No. SC56, Santa Cruz Biotechnology), anti-Ciclina E (1: 1500; cat. No. SC198, Santa Cruz Biotechnology), anti-Ciclina D (1: 1500; cat. No. SC753, Santa Cruz Biotechnology), anti-p21 (1: 1500; cat. No. SC- 6246, Santa Cruz Biotechnology) y anti-β-actina (1: 20000; cat. No. A 3854, Sigma-Aldrich) todos los anticuerpos se incubaron en

solución de bloqueo (5% de leche descremada en TBS + 0.1% Tween20), toda la noche a 4°C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: para ciclina E y ciclina D, bovino anti-conejo (1: 2000; cat. No. Sc-2370, Santa Cruz Biotechnology); para p21 y PCNA bovino anti-ratón (1: 2000; cat. No sc-2371, Santa Cruz Biotechnology) todos acoplados a peroxidasa y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas se visualizaron usando el sustrato cromogénico Clarity Western Enhanced Chemiluminescence Substrate (catálogo no. 1705060; Bio-Rad Laboratories, Inc.). Finalmente, las bandas se cuantificaron densitométricamente usando Image J versión 1.50f (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7.12 Estudios *in vivo* en un modelo murino

Todos los experimentos con animales fueron aprobados y realizados bajo las pautas de los comités Científicos y de Bioética del Instituto Nacional de Cancerología con números de protocolo CEI/1145/17 y 017/016/IBI, respectivamente. Se realizaron ensayos de viabilidad celular y clonogenicidad en la línea celular murina de cáncer de mama JC (ATCC) como se describió anteriormente, para evaluar si el tratamiento con ivermectina tiene efecto antitumoral en esta línea celular. Posteriormente esta línea celular se cultivó hasta alcanzar un 80% de confluencia y se verificó que tuviera una viabilidad $\geq 95\%$ previo al trasplante. Enseguida 500,000 células JC se inocularon en el flanco derecho de ratones hembra BALB/c de 6 semanas de edad ($n = 36$), cuando el tumor alcanzó 200 mm^3 los ratones fueron asignado aleatoriamente al grupo control ($n = 18$) o tratado ($n = 18$). Los ratones se trataron con el vehículo ciclodextrina [90] o con ivermectina conjugada con ciclodextrina (concentración final del 45%) para una dosis final de 3 mg / kg. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con los compuestos durante un período de 21 días. El volumen del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula: $\text{volumen} = (\text{eje mayor} \cdot \text{eje menor}^2) \cdot (\pi/6)$ [91]. Los volúmenes tumorales y el peso global de los ratones se midieron cada tercer día hasta el sacrificio en el día 21. Los animales se mantuvieron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h y se les proporcionó agua y comida *ad libitum*.

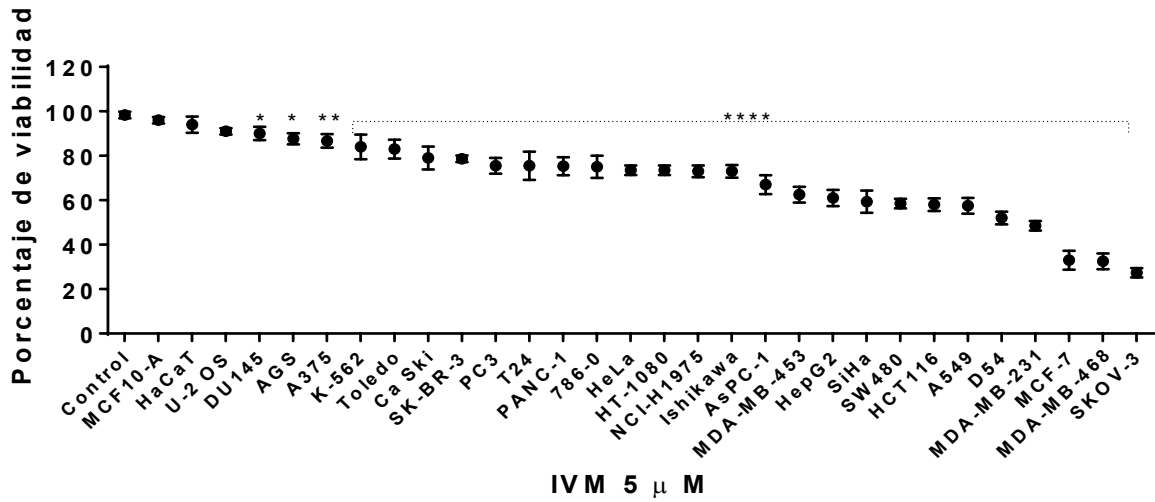
7.13 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism (versión 6.0; GraphPad Software, CA, USA). Todos los experimentos *in vitro* e *in vivo* se realizaron al menos por triplicado, con tres réplicas internas. Para los ensayos de apoptosis, ciclo celular, viabilidad celular y clonogenicidad de la población CSC, así como, para el peso de los ratones los valores de p se calcularon usando la prueba t de Student no pareada seguida de la prueba post-hoc de Welch's, para la viabilidad celular y los ensayos de clonogenicidad de las 30 líneas celulares se utilizó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc de Tukey y para el volumen del tumor se empleó ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Kruskal-Wallis. Los datos se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

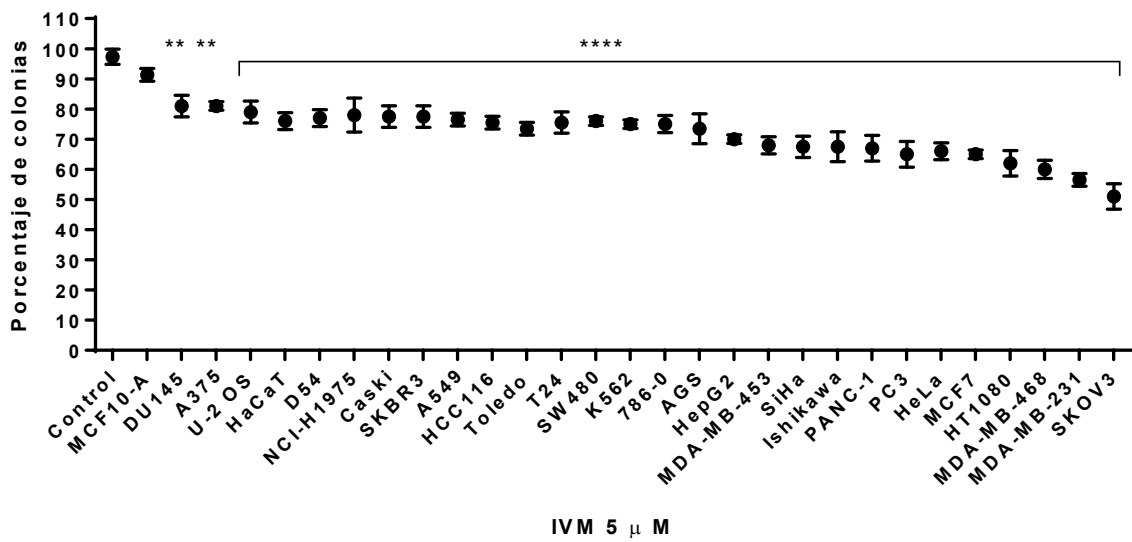
8. RESULTADOS

8.1 El tratamiento con ivermectina inhibe la viabilidad celular y la capacidad clonogénica, preferencialmente en líneas celulares de mama y ovario. Se evaluaron 28 líneas celulares cancerosas de diferentes orígenes y 2 líneas celulares inmortalizadas pero no tumorigénicas (Tabla suplementaria 1) con diferentes concentraciones de ivermectina (0.2, 0.4, 0.8, 1 y 5 μM), las cuales se encuentran dentro del rango de concentraciones reportadas como seguras en humanos, durante 120 h. Se observó que las dos líneas celulares inmortalizadas MCF10-A y HaCaT, así como, las líneas celulares cancerosas U-2SO y DU145 fueron las más resistentes al tratamiento con ivermectina a una concentración de 5 μM , ya que el porcentaje de viabilidad sólo disminuyó en un 4%, 7%, 7% y 9% respectivamente, comparado con sus respectivos controles. Por el contrario, las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 y SKOV-3 fueron las líneas más sensibles al tratamiento con ivermectina a una concentración 5 μM , ya que la viabilidad celular disminuyó en un 58%, 67%, 67% y 70% respectivamente (Figura 1A). Para determinar el efecto de la ivermectina sobre la habilidad para formar colonias, se realizaron ensayos de clonogenicidad en las 30 líneas celulares. No se observó un efecto significativo en la capacidad clonogénica de las líneas celulares MCF10-A, DU145, A375 y U-2SO. Por el contrario, una disminución significativa en la capacidad de formar colonias fue observada en las líneas celulares HT-1080, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y SKOV-3 (Figura 1B-C). Posteriormente, se realizó una correlación lineal entre viabilidad celular y capacidad clonogénica para seleccionar a las líneas celulares empleadas en futuros ensayos. La línea celular de cáncer de próstata, DU145 fue seleccionada como la línea resistente y las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 y SKOV3 como las líneas más sensibles al tratamiento con ivermectina (Figura 1D). Las curvas de viabilidad celular y de clonogenicidad de las 30 líneas celulares a las concentraciones 0.2, 0.4, 0.8 y 1 μM se muestran en las figuras suplementarias 1A- H.

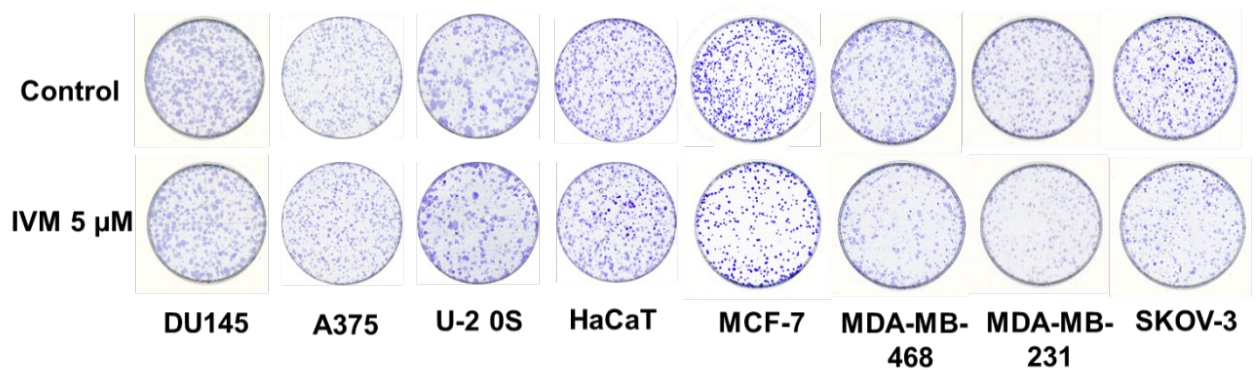
A



B



C



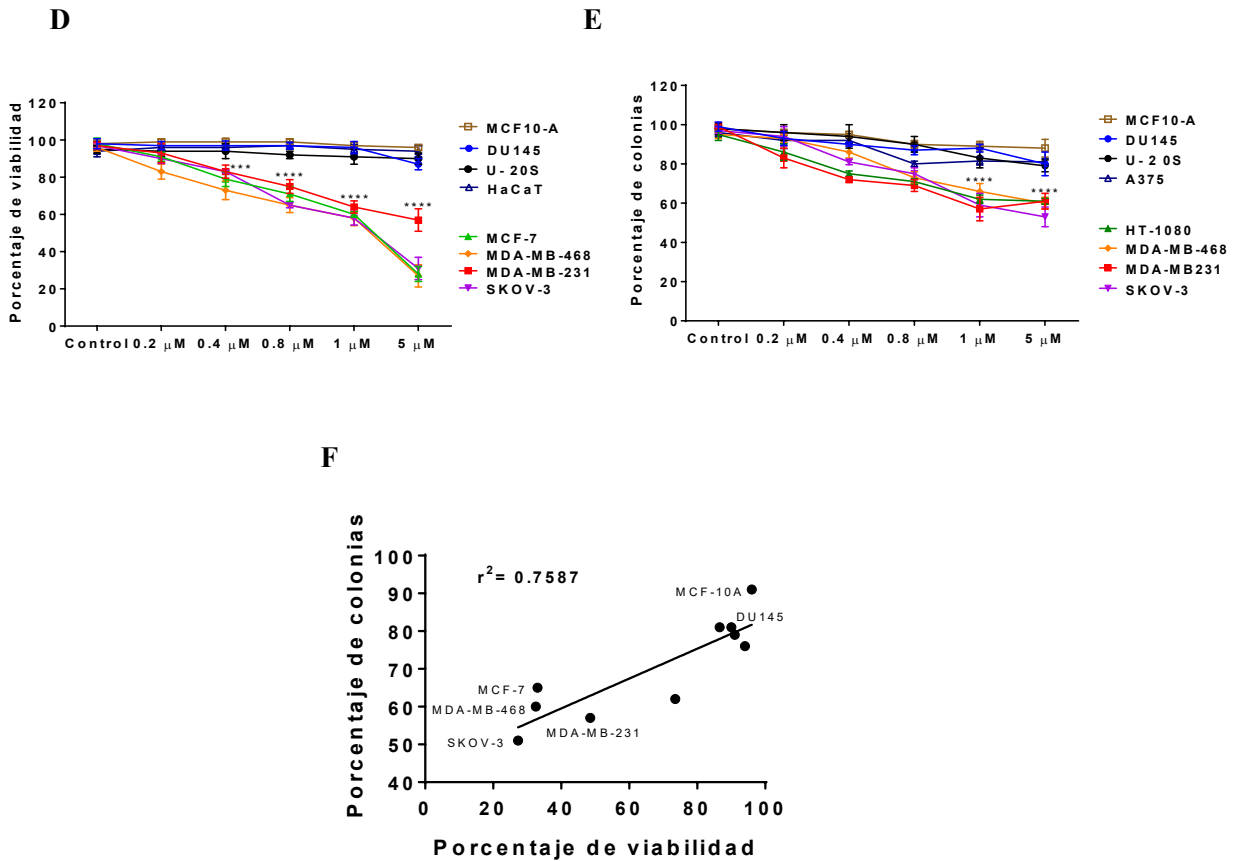


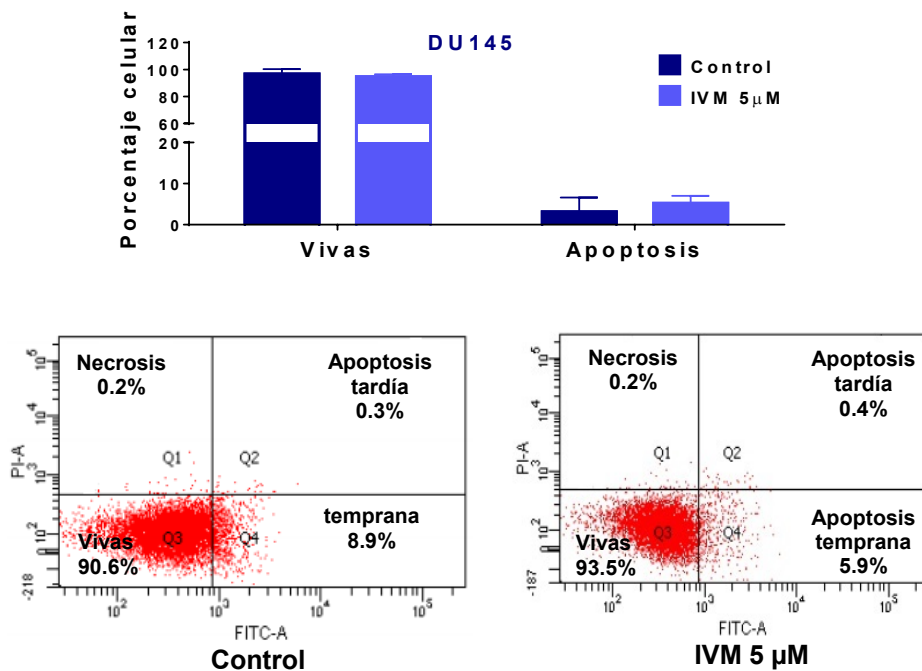
Figura 1. Efecto de la ivermectina sobre la viabilidad celular y clonogenicidad en diversas líneas tumorigénicas. Respuesta al tratamiento con ivermectina sobre diferentes líneas celulares (A). Respuesta al tratamiento con ivermectina medido como capacidad clonogénica sobre diferentes líneas celulares (B-C). Evaluación de la viabilidad celular en las líneas más resistentes y sensibles al tratamiento con ivermectina a diferentes concentraciones molares (D). Evaluación de la capacidad clonogénica en las líneas más resistentes y sensibles al tratamiento con ivermectina a diferentes concentraciones molares (E). Correlación lineal entre viabilidad celular y clonogenicidad en las líneas más sensibles y resistentes al tratamiento con ivermectina (F). En todos los ensayos el control que se utilizó fue etanol, el cual es el vehículo en el que se disuelve la ivermectina. *IVM*: ivermectina; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

8.2 El tratamiento con ivermectina no induce muerte celular por apoptosis.

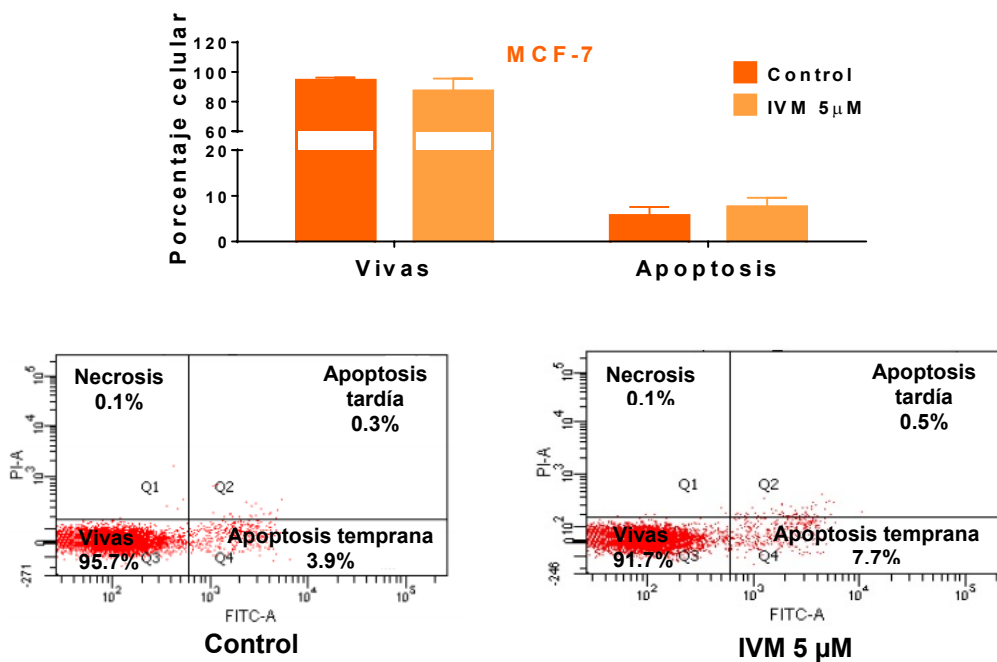
Para determinar si la reducción en la viabilidad celular posterior al tratamiento con ivermectina fue debido a apoptosis o necrosis, tratamos a la línea más resistente DU145 y a las líneas más sensibles MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 con ivermectina 5 μ M. No se observó un efecto significativo en apoptosis o necrosis en ninguna de las líneas celulares

evaluadas (Figura 2 A-E). Estos resultados sugieren que el tratamiento con ivermectina 5 μM no induce a una muerte celular por apoptosis o necrosis.

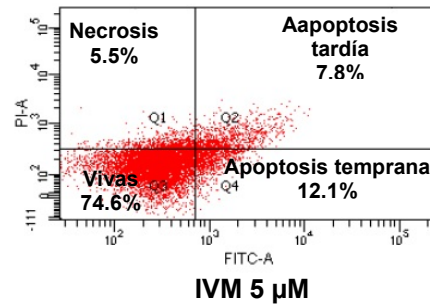
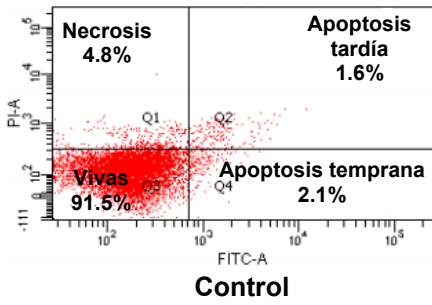
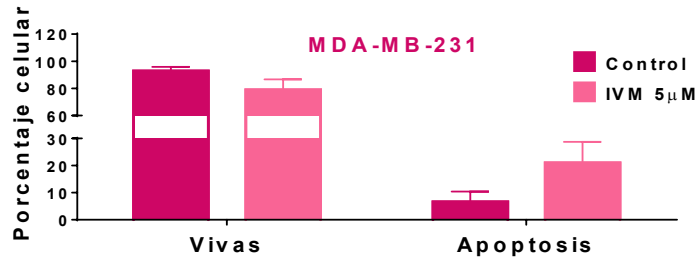
A



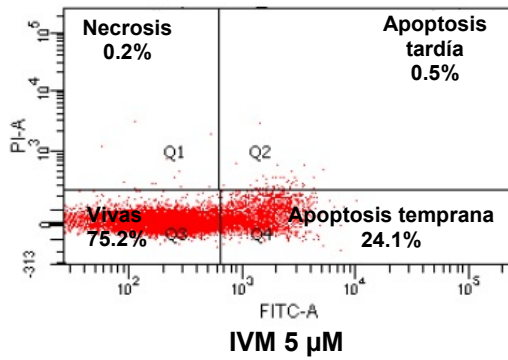
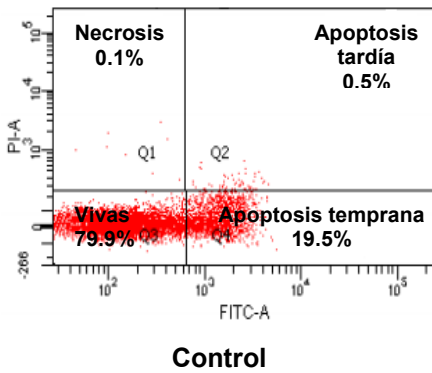
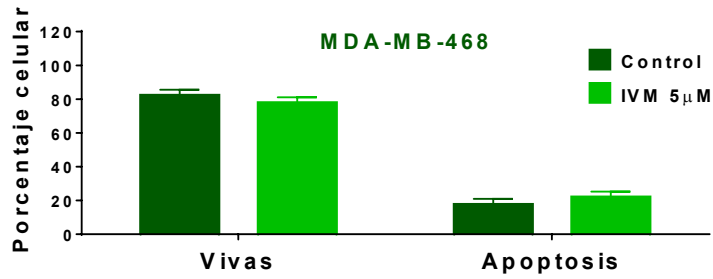
B



C



D



E

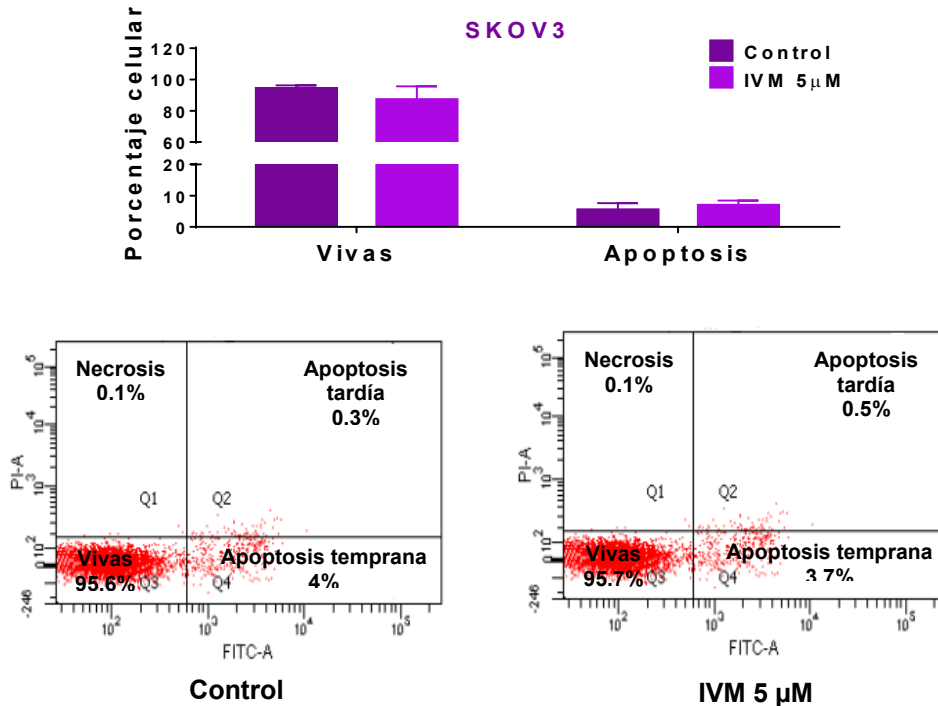


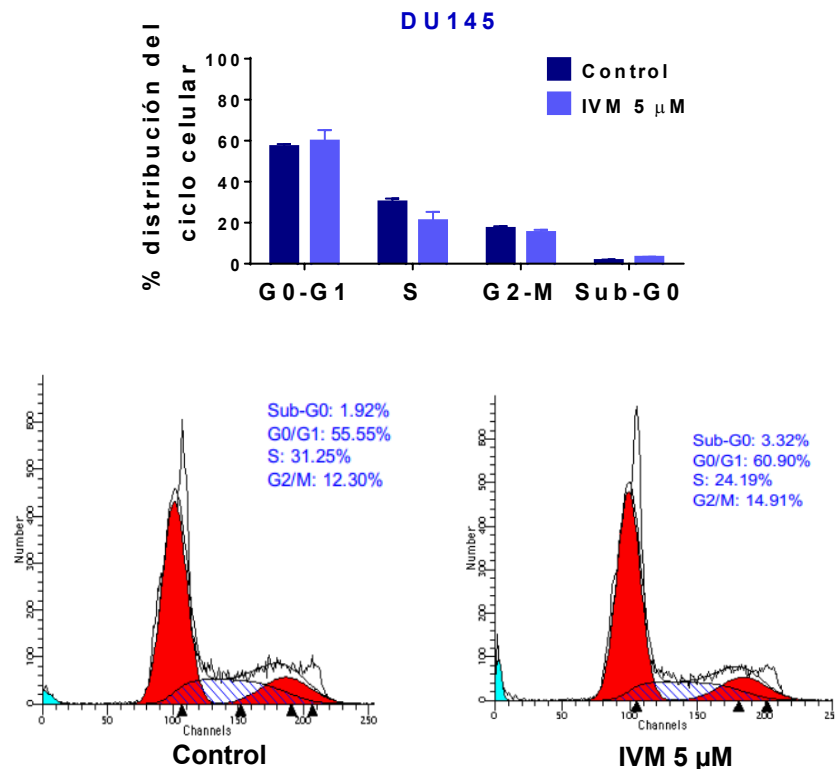
Figura 2. El tratamiento con ivermectina 5 μM no conduce a la muerte celular por apoptosis. Ensayos de apoptosis en la línea celular más resistente DU145 (A) y en las líneas más sensibles MCF-7 (B), MDA-MB-231 (C), MDA-MB-468 (D) y SKOV-3 (E) posterior al tratamiento con ivermectina. No se observaron cambios significativos en apoptosis o necrosis en ninguna de las líneas celulares evaluadas. La apoptosis temprana y tardía se midió por la cantidad de células anexina V-FITC positivo e ioduro de propidio negativo o positivo, respectivamente. La necrosis se midió por la cantidad de células anexina V-FITC negativo e ioduro de propidio positivo.

8.3 El tratamiento con ivermectina induce un arresto en la fase G₀-G₁ del ciclo celular e induce cambios en reguladores del ciclo celular.

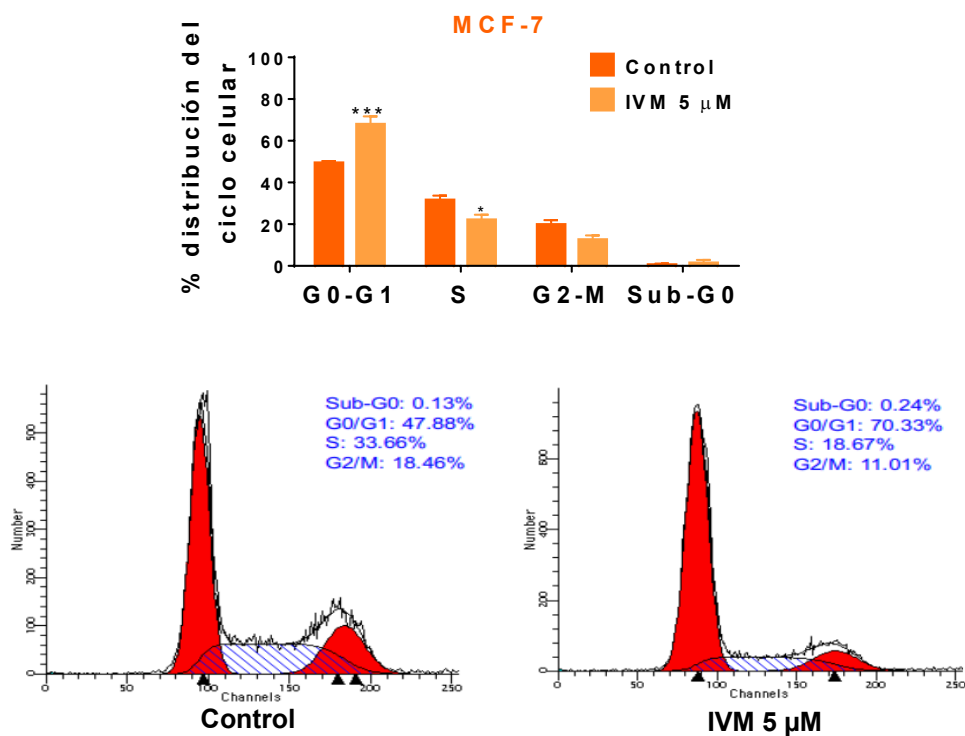
Al no observar efecto directo sobre la muerte celular por apoptosis con ivermectina, decidimos evaluar si el mismo tratamiento tiene algún efecto sobre el ciclo celular en las líneas celulares sensibles y resistentes. Para este objetivo, se realizaron ensayos de ciclo celular mediante citometría de flujo. Los resultados no mostraron cambios significativos en la línea resistente DU145 (Figura 3A), por el contrario, observamos un arresto en la fase G₀-G₁ del ciclo celular de las líneas sensibles MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468 (Figura 3B-D). Posteriormente se analizaron los niveles de expresión de las proteínas involucradas en el ciclo celular como ciclina D, ciclina E, PCNA y p21 mediante ensayos *Western blot*, para los cuales se utilizaron 30 μg de proteína. Los resultados demostraron una disminución en las proteínas ciclina D, ciclina E y PCNA y un incremento en los niveles de p21 en las

líneas sensibles. No se observó ningún cambio significativo en los niveles de expresión de proteínas en la línea resistente DU145 (Figura 3 E-F).

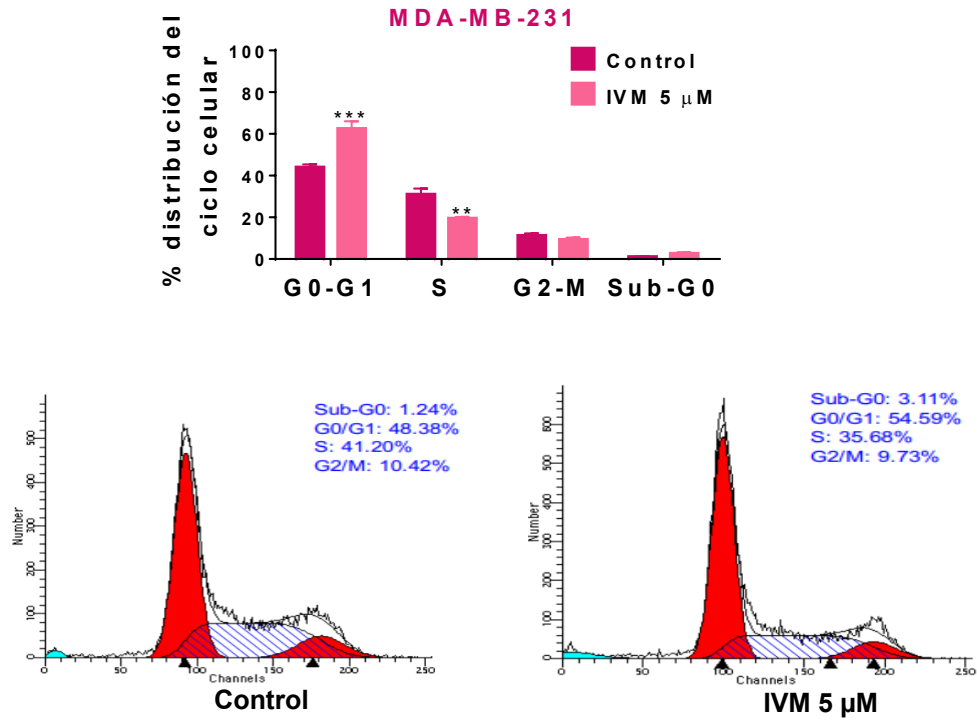
A



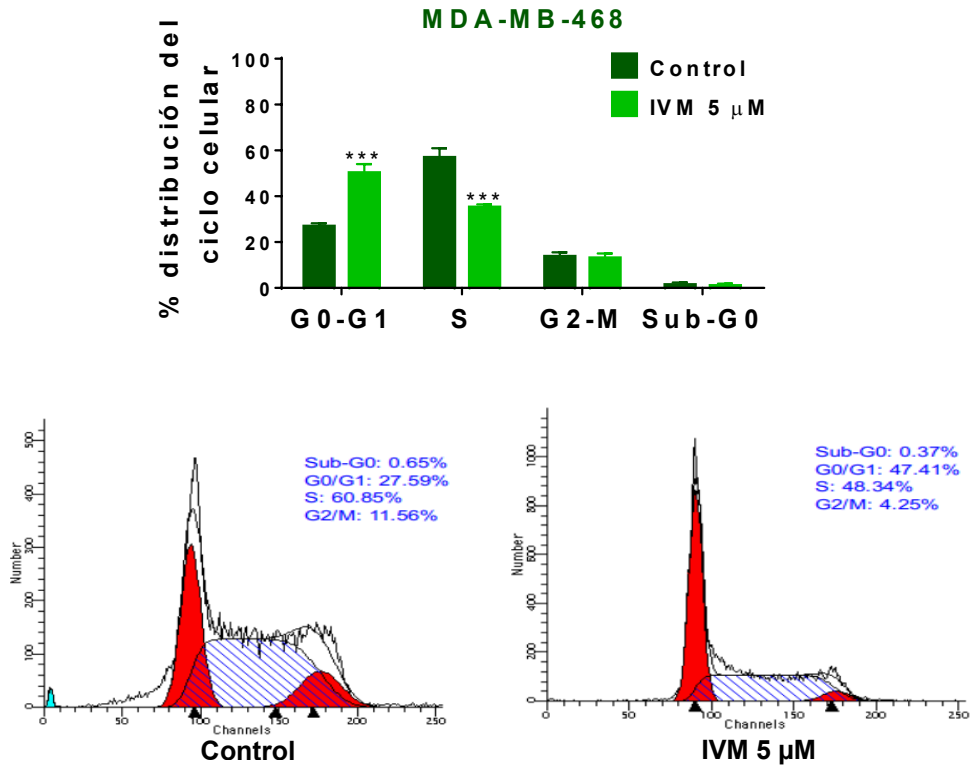
B



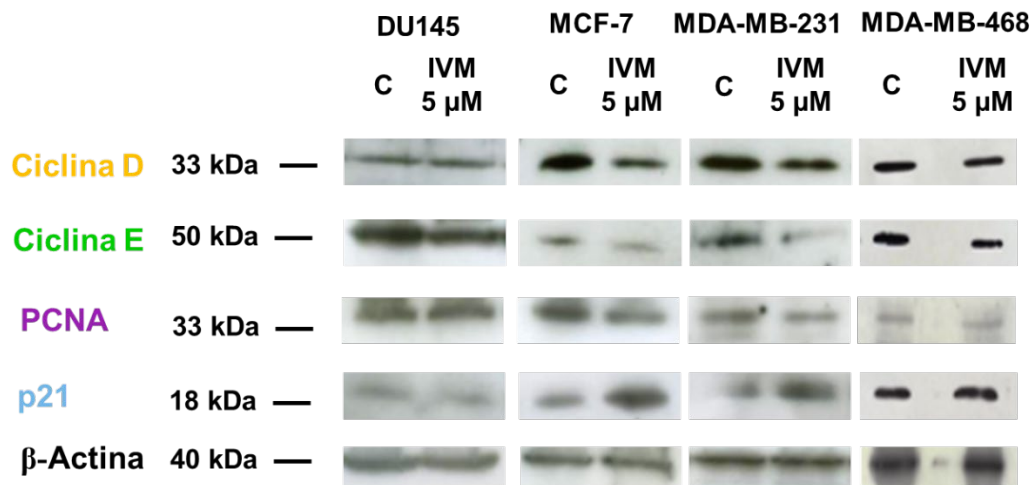
C



D



E



F

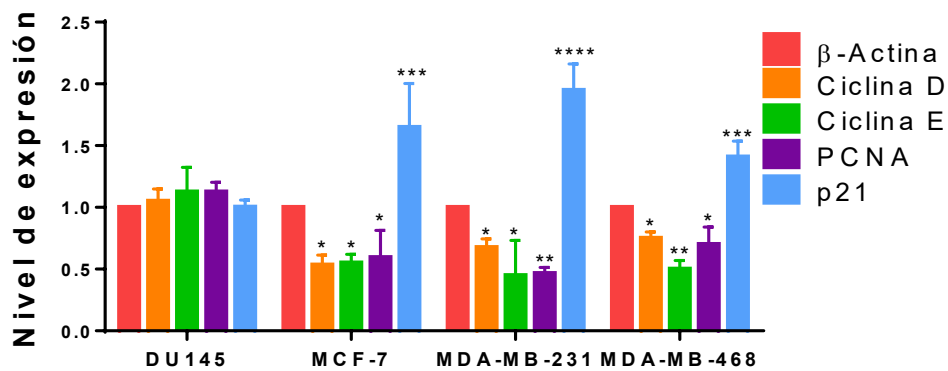


Figura 3. El tratamiento con ivermectina 5 μM induce a un arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular e induce cambios en reguladores del ciclo celular. Ensayo de ciclo celular en la línea resistente DU145 (A), MCF-7 (B), MDA-MB-231 (C) and MDA-MB-468 (D). Se utilizaron 30 μg de proteína para realizar Western blot de ciclina D, ciclina E, PCNA, p21 y β-actina en las líneas mencionadas (E) y su respectiva comparación mediante densitometría (F). *IVM*: ivermectina; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

8.4 La combinación farmacológica de ivermectina y quimioterapéuticos estándar tiene un efecto sinérgico.

Debido a que la ivermectina es un fármaco con potencial para ser reposicionado decidimos evaluar un posible efecto sinérgico en combinación con quimioterapéuticos que son comúnmente usados para tratar cáncer de mama (tamoxifen, ciclosfosfamida y paclitaxel) y próstata (docetaxel). Primero realizamos curvas de dosis-respuesta, las CIs 20, 30, 40 y 50

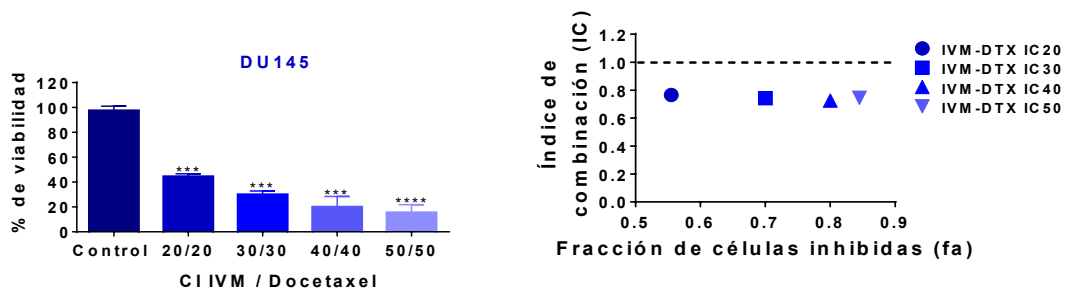
se calcularon para ivermectina y para los quimioterapéuticos, y posteriormente, el IC fue determinado con las diferentes CIs de ivermectina y de los quimioterapéuticos (Tabla 5). Para establecer el tipo de interacción que existe entre ivermectina y los otros quimioterapéuticos se calculó el IC, un concepto planteado por Chou y Talalay en 1983, el IC comprende una ecuación general de dosis-efecto la cual permite cuantificar la relación de sinergismo o antagonismo de los fármacos combinados, en donde un efecto sumativo será igual a 1 (IC=1), un efecto sinérgico será menor a 1 (IC<1) y un efecto antagónico será mayor a 1 (IC>1) [89]. En una interacción sumativa los efectos de los fármacos, en la viabilidad celular, que se obtienen son iguales a la suma de sus efectos por separado. En una interacción sinérgica los efectos de los fármacos, en la viabilidad celular, que se obtienen son superiores a la suma de sus efectos por separado y en una interacción antagónica los efectos de los fármacos, en la viabilidad celular, disminuyen o se anulan por la acción del otro fármaco. Interesantemente, la línea resistente DU145 presentó el mayor efecto sinérgico, ya que desde la combinación CI₂₀ de ivermectina con docetaxel mostró valores por debajo de 1 (Figura 4A). En las líneas sensibles MCF-7, MDA-MB-231y MDA-MB-468 el efecto sinérgico se observó a partir de la combinación de CI₃₀ (Figura 4B-D). Por el contrario, todas las combinaciones de CI de ivermectina y paclitaxel resultaron en un efecto antagónico (Figura 4E). Estos resultados sugieren que ivermectina podría administrarse en conjunto con otras terapias estándar como tratamiento para ciertos tipos de cáncer.

Tabla 5. Interacciones farmacológicas resultantes de la combinación de ivermectina con quimioterapéutico estándar.

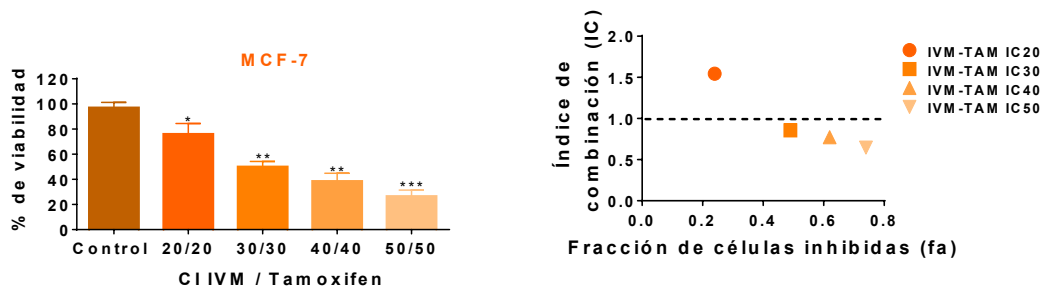
Línea celular	Quimioterapéutico	CI 20-50	CI 20-50 Ivermectina	CI 20-50 Quimioterapéutico	Índice de combinación	Interacción farmacológica
DU145	Docetaxel	20	10.3 µM	0.000006 µM	0.766	Sinergismo
	Docetaxel	30	11.5 µM	0.00001 µM	0.743	Sinergismo
	Docetaxel	40	12.5 µM	0.00004 µM	0.726	Sinergismo
	Docetaxel	50	13.5 µM	0.00011 µM	0.746	Sinergismo
MCF-7	Tamoxifeno	20	0.42 µM	0.57 µM	1.54	Antagonismo
	Tamoxifeno	30	0.69 µM	1.16 µM	0.85	Sinergismo
	Tamoxifeno	40	1.09 µM	1.86 µM	0.77	Sinergismo
	Tamoxifeno	50	1.66 µM	2.8 µM	0.64	Sinergismo

MDA-MB-231	Docetaxel	20	0.47 μ M	0.000096 μ M	3.8	Antagónico
	Docetaxel	30	0.85 μ M	0.00013 μ M	1	Sumativo
	Docetaxel	40	2 μ M	0.00017 μ M	0.7	Sinergismo
	Docetaxel	50	5 μ M	0.00022 μ M	0.5	Sinergismo
MDA-MB-468	Ciclofosfamida	20	0.31 μ M	0.23 μ M	5.65	Antagonismo
	Ciclofosfamida	30	0.55 μ M	0.56 μ M	0.79	Sinergismo
	Ciclofosfamida	40	0.93 μ M	1.06 μ M	0.73	Sinergismo
	Ciclofosfamida	50	1.52 μ M	1.65 μ M	0.22	Sinergismo
SKOV-3	Paclitaxel	20	0.42 μ M	0.03 nM	1.29	Antagónico
	Paclitaxel	30	0.63 μ M	0.06 nM	1.37	Antagónico
	Paclitaxel	40	0.93 μ M	0.09 nM	1.42	Antagónico
	Paclitaxel	50	1.39 μ M	0.14 nM	1.40	Antagónico

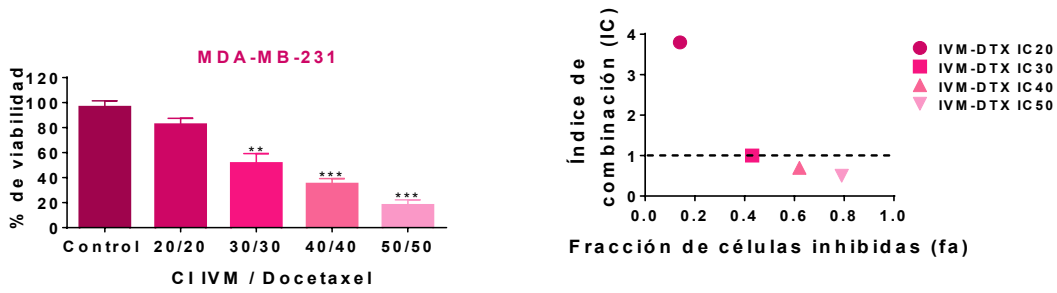
A



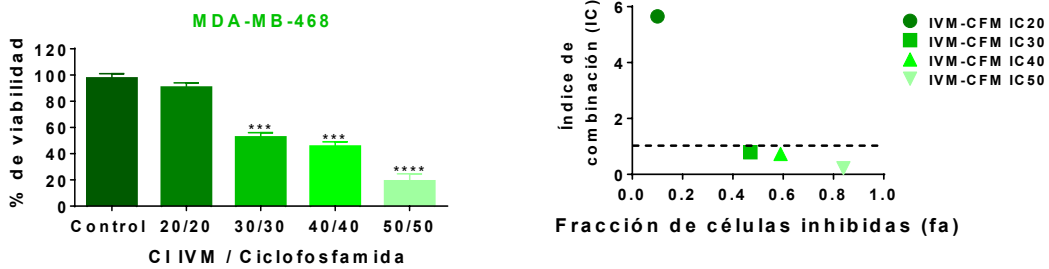
B



C



D



E

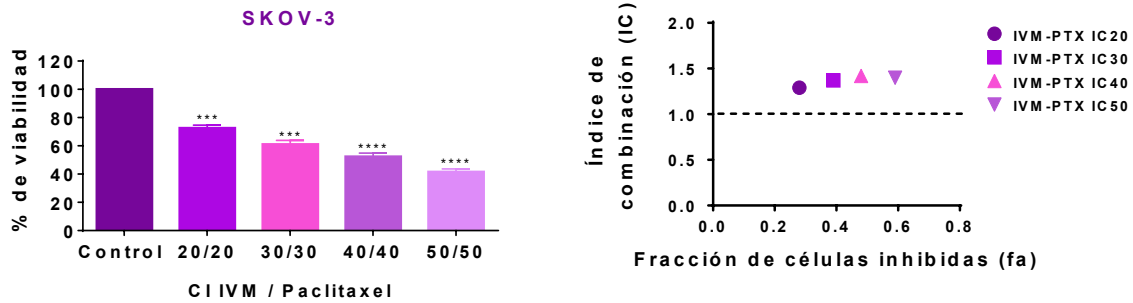
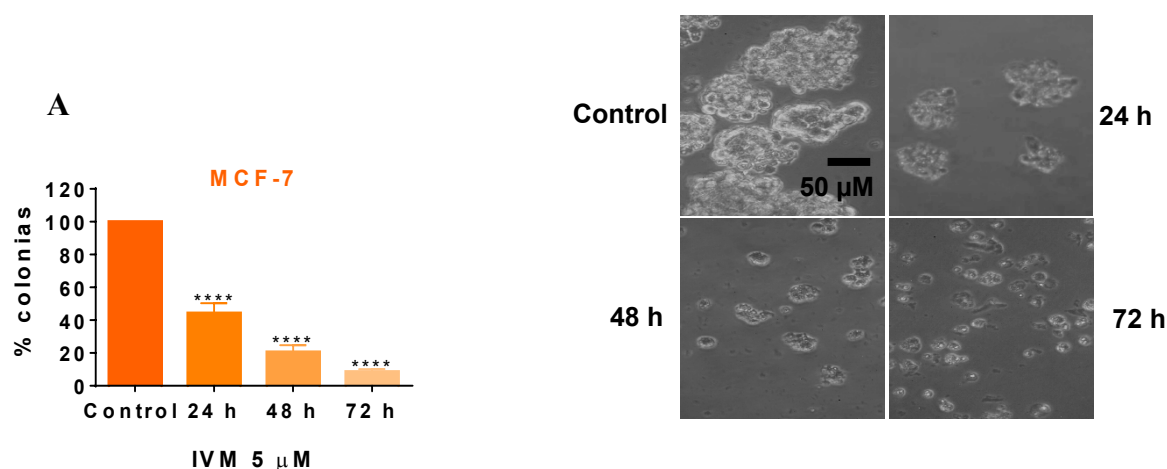
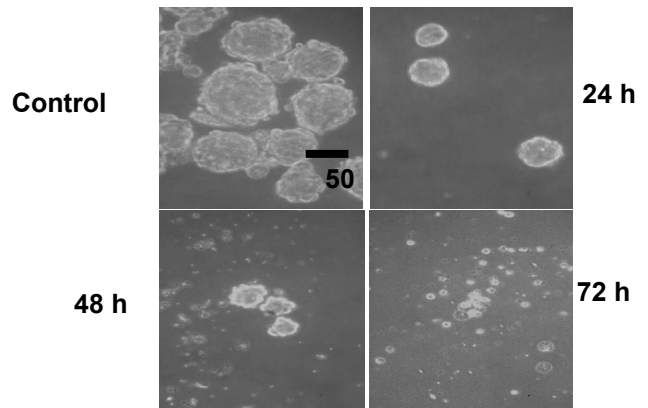
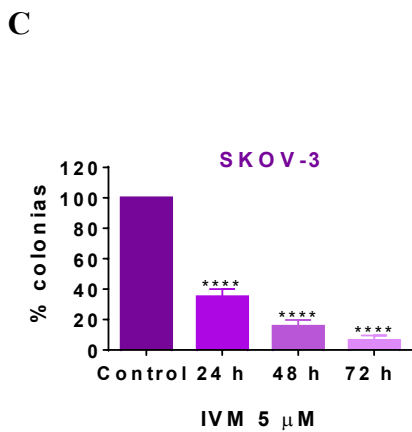
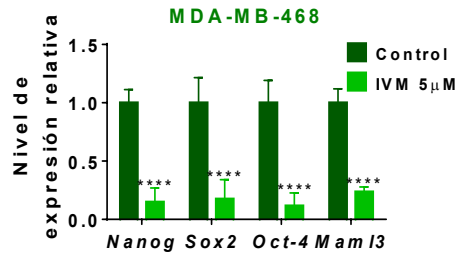
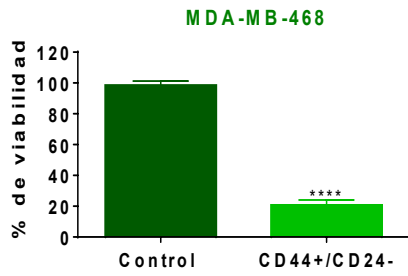
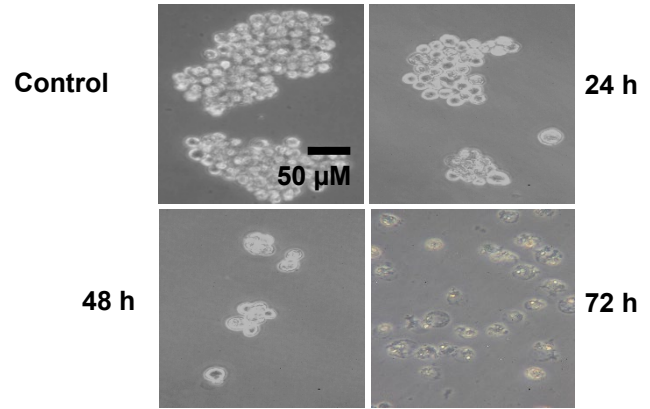
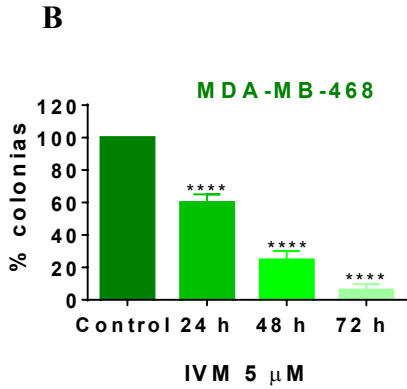
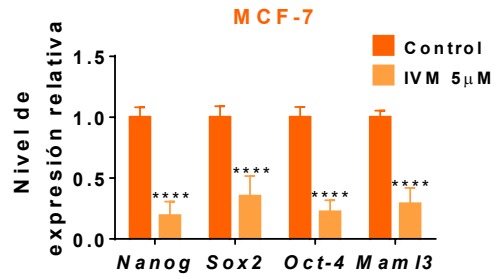
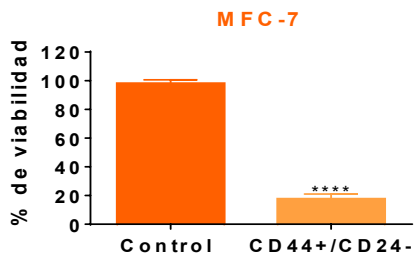


Figura 4. La combinación de ivermectina con agentes quimioterapéuticos tiene un efecto sinérgico. Efecto en la viabilidad celular e interacciones farmacológicas entre las concentraciones inhibitorias (CI) 20-50 de ivermectina y docetaxel, tamoxifen, ciclofosfamida o paclitaxel en las líneas celulares DU145 (A), MCF-7 (B), MDA-MB-231 (C), MDA-MB-468 (D) y SKOV-3 (E). *IVM*: ivermectina; *DTX*: docetaxel; *TAM*: tamoxifen; *CFM*: ciclofosfamida; *PTX*: paclitaxel. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

8.5 El tratamiento con ivermectina reduce la viabilidad celular y el porcentaje de colonias en la población de células troncales tumorales.

Previamente se reportó por nuestro grupo de investigación que el tratamiento con ivermectina disminuye la viabilidad celular de las CSC en la línea celular MDA-MB-231, al regular negativamente los niveles de ARNm y de proteína de genes de pluripotencialidad como *Nanog*, *Sox2* and *Oct4* [18]. Por esta razón, quisimos determinar si la ivermectina tiene el mismo efecto en las líneas MCF-7, MDA-MB-468 y en la línea enriquecida con CSC SKOV-3. Para cumplir con este objetivo, aislamos la población troncal del resto de las células mediante citometría de flujo usando los marcadores de superficie CD44⁺/CD24⁻. El porcentaje de CSC para cada línea celular son diferentes; MCF-7 tiene 5 % de CSC, MDA-MB-468 tiene 24% de CSC y SKOV-3 tiene 24% de CSC. Las poblaciones troncales separadas fueron tratadas con ivermectina 5 μ M, en todas las líneas celulares evaluadas observamos una disminución en la viabilidad celular y en la capacidad de formar colonias, esta disminución fue más evidente que en sus correspondientes líneas parentales (Figura 5A-C). Posteriormente, realizamos ensayos de qPCR para medir los niveles de transcrito de los genes *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* y *Maml3*, las cuales son proteínas que regulan la transcripción de genes implicados en el mantenimiento de un estado indiferenciado. Observamos que los niveles de expresión de estos genes disminuyeron de manera significativa en todas las líneas evaluadas posterior al tratamiento con ivermectina (Figura 5D-F). Estos datos sugieren que ivermectina tiene un efecto preferencial sobre la población troncal tumoral.





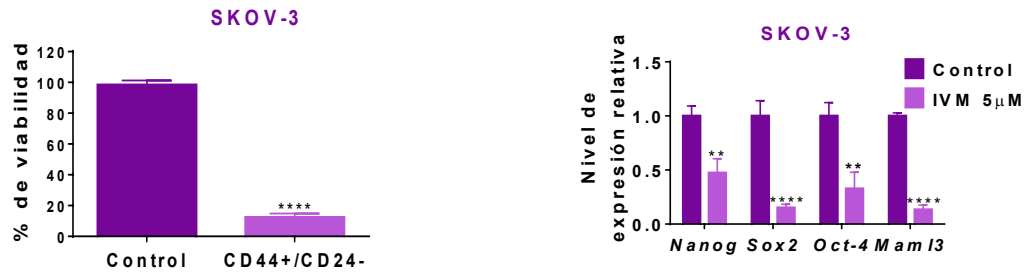


Figura 5. El tratamiento con ivermectina reduce la viabilidad celular y la capacidad de formar colonias en la población troncal tumoral. Efecto en la viabilidad celular y la habilidad de formar colonias posterior al tratamiento con ivermectina en la población troncal tumoral de las líneas celulares MCF-7 (A), MDA-MB-468 (B) y SKOV-3 (C). Niveles relativos de ARNm de genes de pluripotencialidad de las líneas celulares MCF-7 (D), MDA-MB-468 (E) and SKOV-3 (F). *IVM*: ivermectina; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

8.6 El tratamiento con ivermectina reduce el volumen tumoral en un modelo murino alógeno.

Debido a que utilizamos una línea celular murina de cáncer de mama para evaluar el efecto de la ivermectina *in vivo*, lo primero que hicimos fue evaluar si el tratamiento con ivermectina a 5 µM tiene algún efecto en la viabilidad y capacidad clonogénica de esta línea celular *in vitro*. Observamos que la viabilidad celular de la línea JC disminuyó hasta un 75% posterior al tratamiento con ivermectina (Figura 6A), y el porcentaje de formación de colonias disminuyó en un 21% (Figura 6B) comparado con el control algo que habíamos observado en otras líneas de cáncer de mama como MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB231. Posteriormente, se inocularon ratones subcutáneamente con la línea JC para inducir los tumores y a continuación se trataron por un periodo de 21 días con ivermectina 3 mg/kg y observamos que los tumores de los ratones tratados con ivermectina+ciclodextrina crecieron más lentamente en comparación con el grupo control al cual se le administró únicamente ciclodextrina (Figura 6C). Al día 21 del tratamiento, el volumen promedio del tumor de los ratones tratados fue 63% menor que el grupo control (Figura 6D-E). De manera interesante, el peso del tumor de los ratones tratados disminuyó un 56% con respecto al grupo control (Figura 6F), el peso del ratón no mostró diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control (Figura 6G). Estos resultados son consistentes con nuestras observaciones previas, donde la ivermectina detiene la proliferación celular *in vitro* y sugiere que probablemente ivermectina actúe de la misma manera *in vivo*.

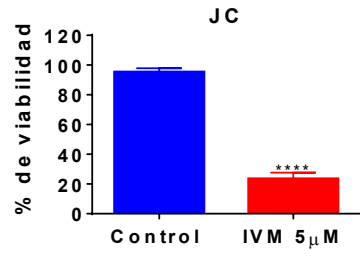
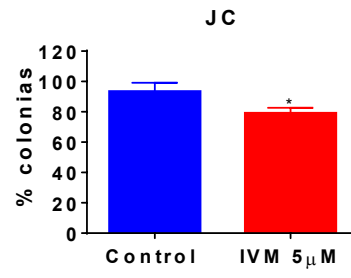
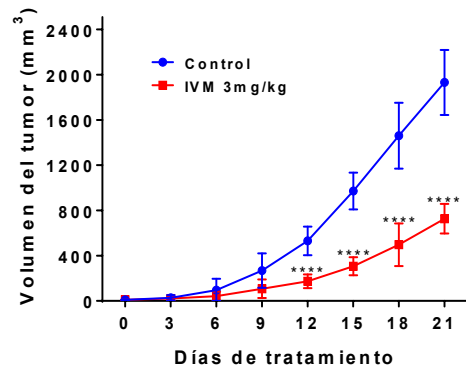
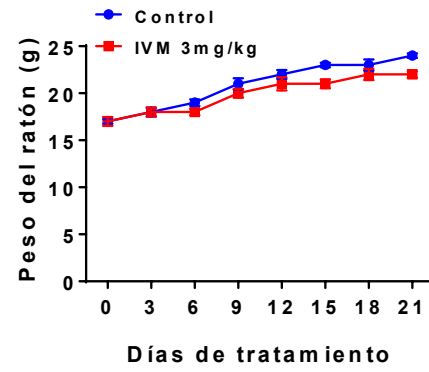
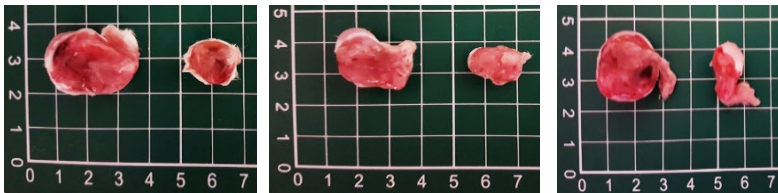
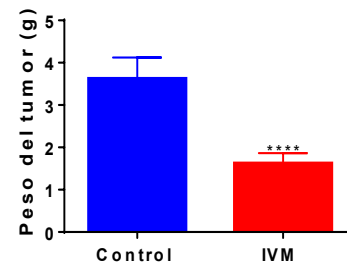
A**B****C****D****E****F****G**

Figura 6. El tratamiento con ivermectina reduce el volumen y el peso del tumor en un modelo murino. Disminución de la viabilidad celular de la línea murina de cáncer de mama JC posterior al tratamiento con ivermectina (A). Reducción del porcentaje de colonias en la línea JC posterior al tratamiento con ivermectina (B). Volumen tumoral a través del tiempo (C). Peso de los ratones a través del tiempo (D). Fotografías representativas de los ratones y tumores control y tratados con ivermectina al día 21 de tratamiento (E-F). Peso del tumor al día 21 de tratamiento (G). *IVM*: ivermectina; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

9. DISCUSIÓN

Actualmente, la asequibilidad de medicamentos contra el cáncer más seguros y efectivos se necesita con urgencia para los pacientes, por esta razón el reposicionamiento terapéutico es una estrategia muy eficaz para el nuevo uso de medicamentos, ya que ofrece diversas ventajas, como la reducción de gastos generados por la investigación de nuevos fármacos, el desarrollo farmacéutico es más rápido y los efectos secundarios han sido previamente estudiados, lo cual proporciona un amplio margen de seguridad para los pacientes. Entre los diversos medicamentos que actualmente están en estudio bajo el enfoque del reposicionamiento terapéutico, la ivermectina es un fármaco muy prometedor ya que ha demostrado tener efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* [9]. Además, se ha administrado a millones de pacientes en el mundo sin la presencia de efectos adversos y por lo tanto la convierten en un medicamento seguro. Los pacientes con enfermedades parasitarias tratados con ivermectina reciben dosis que van de los 150 - 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en estos pacientes la concentración en plasma alcanza su punto máximo 5.2 horas después de su administración y el área bajo la curva después de 48 horas alcanza una concentración de 2852 $\text{ng}\cdot\text{h}/\text{ml}$ [51]. Una farmacocinética similar fue reportada en voluntarios sanos que recibieron una dosis de hasta 2 mg/kg sin la presencia de efectos adversos que comprometan la vida de las personas, el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima del fármaco en la sangre (T_{max}) se alcanzó a las 4.2 h después de su administración y el área bajo la curva fue de 4.547 $\text{ng}\cdot\text{h}/\text{ml}$, lo cual equivale a una concentración 5 μM [8]. Los resultados de diversos grupos de investigación, indican que más de 50 líneas celulares cancerígenas humanas son inhibidas en algún grado por la ivermectina [9], sin embargo, las concentraciones usadas en estos estudios son superiores a la concentración reportada como segura en humanos. En este proyecto de investigación se realizó un cribado en 30 líneas tumorales y observamos que la

ivermectina, a la concentración máxima reportada como segura para su uso humano, tiene un efecto antitumoral principalmente en líneas de cáncer de mama y ovario (MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 y SKOV-3). Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-468 pertenecen al subtipo basal, lo cual significa que no expresan los receptores de estrógenos, progesterona y del factor de crecimiento epidermal (HER2) por lo cual la terapia hormonal no es funcional para este tipo de cáncer. Por el contrario la línea celular MCF-7 expresa los receptores de estrógenos y progesterona pero no expresa a HER2 por lo que pertenece al subtipo luminal A. La viabilidad de estas líneas celulares se reduce entre 58% y 70% posterior al tratamiento con ivermectina. Lo cual puede indicar que la ivermectina se podría utilizar como tratamiento en pacientes con cáncer de mama con un fenotipo basal.

La sensibilidad de estas líneas celulares al tratamiento puede estar relacionada al porcentaje de CSC presentes en la población total, se ha reportado que las líneas MDA-MB-23, MDA-MB-468 y SKOV-3 tienen un alto contenido de células troncales tumorales [92,93]. MCF-7 no es una línea enriquecida con este tipo celular [94], sin embargo, expresa el gen *Wnt7B* [95] el cual está relacionado con el mantenimiento de la pluripotencialidad. Para comprobar que el efecto antitumoral de ivermectina sobre estas líneas celulares es debido a la presencia de la población CSC, enriquecimos a esta población mediante marcadores de superficie CD44⁺/CD24⁻. El porcentaje de CSC en las líneas celulares sensibles al tratamiento con ivermectina de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-468 es de 5% y 24%, respectivamente y para la línea celular de cáncer de ovario es de 35% SKOV-3. En el caso de la línea resistente de cáncer de próstata DU145 el porcentaje de CSC es muy reducido 0.3%. Posterior a la separación de la población troncal la tratamos con la ivermectina y observamos que el efecto sobre la disminución de la viabilidad celular y la capacidad clonogénica es más evidente en la población troncal con respecto a la población parental en las líneas sensibles. El tratamiento con ivermectina desencadena una modulación transcripcional de genes que están asociados a la EMT y el mantenimiento de un fenotipo troncal, esto tiene como consecuencia que las CSC no puedan autorenovarse, disminuyendo su capacidad clonogénica *in vitro*. Se ha demostrado que la ivermectina inhibe preferentemente la viabilidad de las poblaciones enriquecidas con CSC (CD44⁺/CD24⁻), en comparación con las células parentales, en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 [66]. Para ampliar estas observaciones, en este

trabajo mostramos que la ivermectina inhibe preferentemente la población de células CD44⁺/CD24⁻, de dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-468) y una de cáncer de ovario (SKOV-3). Estos efectos se asociaron con una disminución de la expresión de los genes de pluripotencialidad y autorenovación *Sox2*, *Nanog*, *Oct4* y *Maml3* [96]. Todavía se desconoce el mecanismo por el cual la ivermectina tiene este efecto sobre las CSC. Sin embargo, un estudio mostró que la ivermectina inhibe la función de SIN3, que es parte de un complejo que regula positivamente a *Nanog* y *Sox2* [64]. De acuerdo con estas observaciones, la ivermectina ha demostrado reducir el crecimiento de esferas tumorales de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo con una concentración de 2.5 μ M [64] y cáncer de colon a una concentración de 1 μ M [61]. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con ivermectina a una concentración de 5 μ M, reduce la viabilidad celular de las CSC en un 90%.

Además de las células sensibles a ivermectina, observamos un grupo de células que fueron resistentes al tratamiento con ivermectina, entre las cuales se encuentran las líneas inmortalizadas pero no tumorales MCF-10A y HaCaT, líneas celulares tumorales como la de cáncer de próstata DU145; para estas líneas celulares la reducción en la viabilidad celular no va más allá del 10%. La resistencia al tratamiento con ivermectina de la línea DU145 fue previamente reportada por Schimmer y col [67] donde observaron que en esta línea el flujo de iones cloruro hacia el interior de la célula es menor que en las células más sensibles. Como se esperaba, no se observó ningún efecto significativo posterior al tratamiento con ivermectina en los ensayos de ciclo celular y apoptosis en la línea DU145, mientras que en las células sensibles, se observó un arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular, pero no se observó la muerte celular por apoptosis. Estos resultados coinciden en parte con otros trabajos donde la ivermectina inhibe la proliferación celular [60,62,63,68,70,71]. Un estudio mostró que en las células de carcinoma de colon, la ivermectina indujo la expresión de p21 y redujo la expresión de ciclina D1 [71]. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con ivermectina induce un arresto en la fase G0-G1 del ciclo celular y hay un incremento en la expresión de p21 y una disminución en la expresión de las ciclinas D y E, así como de PCNA. Estas modificaciones en los niveles de expresión de dichas proteínas puede explicar la inducción del arresto celular generado posterior al tratamiento con ivermectina.

La ivermectina puede considerarse como un fármaco con múltiples blancos terapéuticos, ya que modula directa o indirectamente al menos nueve blancos o vías [9]. Estos resultados sugieren que usar terapias convencionales de quimioterapia concomitante con ivermectina puede aumentar las acciones antitumorales de la ivermectina. Se ha reportado que en las células de leucemia mieloide la ivermectina tiene sinergismo farmacológico con la daunorrubicina y la citarabina [67]. En este proyecto demostramos la existencia de sinergismo farmacológico entre ivermectina y docetaxel en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Se observó el mismo efecto farmacológico en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con la combinación de ivermectina y tamoxifeno, así como, en la línea celular MDA-MB-468 con la combinación de ivermectina y ciclofosfamida. De manera interesante, la línea celular de cáncer de próstata DU145 la cual es muy resistente al tratamiento con ivermectina, en combinación con docetaxel se observó una fuerte interacción sinérgica. El docetaxel se une al heterodímero de α y β -tubulina que conforma a los microtúbulos estimulando su ensamblaje, los estabiliza e inhibe su despolimerización, esta acción produce que la célula no se pueda dividir. También afecta la organización del centrosoma en la fase S del ciclo celular, lo que ocasiona una mitosis incompleta y la muerte de la célula. Ashraf y colaboradores reportaron que la ivermectina es capaz de unirse al heterodímero de tubulina en el nematodo *Haemonchus contortus* conduciendo a un efecto muy similar al que produce el docetaxel en células humanas, en este mismo estudio se realizó un análisis molecular *in silico* y se demostró que la ivermectina puede interactuar con el heterodímero de α y β -tubulina humana. El mecanismo de la ivermectina como agente atimitótico puede explicar el fuerte sinergismo que existe con el docetaxel [102] Por otra parte, la ivermectina se une a los mismos sitios a los cuales se une el paclitaxel [102], esta interacción competitiva puede explicar el antagonismo observado con paclitaxel en la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3.

Finalmente, el tratamiento *in vivo* de la ivermectina en un modelo murino demostró que es capaz de reducir el volumen del tumor, sin afectar la condición física del ratón. Este efecto ha sido demostrado por otros grupos de investigación [60,63, 65, 67, 87], en el caso particular de cáncer de mama se ha realizado con líneas celulares con la clasificación molecular basal; la línea celular que evaluamos fue la línea celular de cáncer de mama JC, que tiene una clasificación molecular luminal, la cual representa el 70% de todos los tipos de cáncer

diagnosticados. Las dosis que utilizamos en este proyecto para los experimentos *in vitro* e *in vivo* son equivalentes a la dosis máxima reportada como segura en humanos y con los resultados obtenidos se sugiere que la ivermectina puede ser considerada como un fármaco antiparasitario reposicionado farmacológicamente para el tratamiento de cáncer de mama.

10. CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que el tratamiento, *in vitro* e *in vivo*, con ivermectina, a la concentración más alta reportada como segura en humanos tiene un efecto inhibitorio en la proliferación celular principalmente en células de cáncer de mama y ovario al inducir el arresto del ciclo celular en la fase G0-G1.

También se demostró que el efecto en la disminución de la viabilidad celular y de la capacidad clonogénica fue mayor en la población de CSC con respecto a la población parental.

Por otro lado, la ivermectina tiene un efecto sinérgico en combinación con diferentes quimioterapéuticos.

Finalmente se observó que el tratamiento con ivermectina inhibe el crecimiento tumoral en un modelo murino de cáncer de mama.

Toda la evidencia pre-clínica resultante de este proyecto, respaldada por los reportes pre-existentes, es sugerente de continuar con el estudio de ivermectina como un fármaco antitumoral en cáncer de mama en un estudio clínico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Omura S, Crump A (2004) The life and times of ivermectin - a success story. *Nat Rev Microbiol* 2 (12):984-989.
2. Omura S (2008) Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int J Antimicrob Agents* 31 (2):91-98.
3. Chabala JC, Mrozik H, Tolman RL, Eskola P, Lusi A, Peterson LH, Woods MF, Fisher MH, Campbell WC, Egerton JR, Ostlind DA (1980) Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J Med Chem* 23 (10):1134-1136.
4. Goa KL, McTavish D, Clissold SP (1991) Ivermectin. A review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in onchocerciasis. *Drugs* 42 (4):640-658.
5. Kumaraswami V, Ottesen EA, Vijayasekaran V, Devi U, Swaminathan M, Aziz MA, Sarma GR, Prabhakar R, Tripathy SP (1988) Ivermectin for the treatment of *Wuchereria bancrofti* filariasis. Efficacy and adverse reactions. *JAMA* 259 (21):3150-3153
6. Marti H, Haji HJ, Savioli L, Chwaya HM, Mgeni AF, Ameir JS, Hatz C (1996) A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children. *Am J Trop Med Hyg* 55 (5):477-481.
7. Whitworth JA, Morgan D, Maude GH, McNicholas AM, Taylor DW (1991) A field study of the effect of ivermectin on intestinal helminths in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85 (2):232-234.
8. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, Sciberras DG, Hsieh JY, Lasseter KC (2002) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol* 42 (10):1122-1133.
9. Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Duenas-Gonzalez A (2018) The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am J Cancer Res* 8 (2):317-331
10. Barreral JB, González JM, Foncillas JG, Cardoso FP (2007) Células troncales y cáncer: dilucidando el origen de la célula troncales tumoral. *Rev. Univ. Navarra.* 51:14-17.

11. Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Review*. 144: 646-674.
12. Farber, E and Cameron, GR. (1980) The sequential analysis of cancer development. *Adv. Cancer Res.* 31:125,226
13. Rosen JM, Jordan CT (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324:1670–1673.
14. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Review of Cancer*. 3:895-902.
15. Bandhavkar, Saurabh. (2015). Cancer stem cells: a metastasizing menace. *Cancer Medicine*. 5:649-55.
16. Pattabiraman DR and Weinberg RA. (2014). Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nature Review Drug Discovery*. 13:497-512.
17. Jordan CT. (2006) Searching for leukemia stem cells--not yet the end of the road? *Cancer Cell*.10:253-4.
18. An Y and Ongkeko, W.M. (2009) “ABCG2: the key to chemore- sistance in cancer stem cells?” *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 5: 1529–1542.
19. Moitra,K. H. Lou, and M. Dean, (2011) “Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development,” *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 89:491–502.
20. Janikowa, M and Skarda, J. (2012).“Differentiation pathways in carcinogenesis and in chemo- and radioresistance,” *Neoplasma*. 59:6–17.
21. Ma, S. T. K. Lee, B. J. Zheng, K. W. Chan, and X. Y. Guan. (2008). “CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway,” *Oncogene*. 27: 1749–1758.
22. Gallmeier,E, P. C. Hermann, M. T. Mueller. (2011). “Inhibition of ataxia telangiectasia- and Rad3-related function abrogates the *in vitro* and *in vivo* tumorigenicity of human colon cancer cells through depletion of the CD133+ tumor- initiating cell fraction,” *Stem Cells*. 29:418–429.
23. Hambardzumyan.D, O. J. Becher, M. K. Rosenblum, P. P, Pandolfi, K. Manova-Todorova, and E. C. Holland, (2008). “PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma *in vivo*,” *Genes and Development*. 22: 436–448.

24. Martelli, C. Evangelisti, M. Y. Follo et al., (2011). "Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells," *Current Medicinal Chemistry*. 18: 2715–2726.
25. Ginestier, M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome," *Cell Stem Cell*. 1:555–567.
26. Guzman, C. F. Swiderski, D. S. Howard .(2002). "Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:16220–16225.
27. Clarke LE, Bayerl MG, Bruggeman RD, Mauger D, Ioffreda MD, Abou-Ellella A, Helm KF. (2005). Death receptor apoptosis signaling mediated by FADD in CD30-positive lymphoproliferative disorders involving the skin. *American Journal of Surgical Pathology*. 29:452-459.
28. Todaro, M. P. Alea, A. B. Di Stefano et al. (2007). "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4," *Cell Stem Cell*. 1: 389–402.
29. Frank RT, Najbauer J, Aboody KS. (2010). Concise review: stem cells as an emerging platform for antibody therapy of cancer. *Stem Cells*. 28(11):2084-7
30. Atena, M., A. Mohammad Reza, and G. Mehran. (2014). A review on the biology of cancer stem cells. *Science Research*. 4:83–89.
31. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C (2012) Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*. 2012. 488(7412):527-30.
32. Kalluri, R. and Weinberg, R.A. (2009). The Basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. 119:1420-1428.
33. Lamouille, S. Xu, J. Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology*. 15: 178-196.
34. Wolstenholme AJ (2012) Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem* 287 (48):40232-40238.
35. De Sole, G., et al., (1989) A community trial of ivermectin in the onchocerciasis focus of Asubende, Ghana. II. Adverse reactions. *Trop Med Parasitol*. 40(3):375-82.
36. De Sole, G., et al., (1990) Lack of adverse reactions in ivermectin treatment of onchocerciasis. *Lancet*. 335(8697):1106-7.

37. Kumaraswami V, Ottesen EA, Vijayasekaran V, Devi U, Swaminathan M, Aziz MA, Sarma GR, Prabhakar R, Tripathy SP (1988) Ivermectin for the treatment of *Wuchereria bancrofti* filariasis. Efficacy and adverse reactions. *JAMA*. 1988 Jun 3;259(21):3150-3.
38. Dourmishev, A.L., L.A. Dourmishev, and R.A. Schwartz. (2005) Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *Int J Dermatol*. 44(12):981-8
39. Boussinesq, M., et al., (2006) What are the mechanisms associated with post-ivermectin serious adverse events? *Trends Parasitol*. 22(6):244-6.
40. Boussinesq, M., et al., (2003) Clinical picture, epidemiology and outcome of Loa-associated serious adverse events related to mass ivermectin treatment of onchocerciasis in Cameroon. *Filaria J. Suppl 1*: S4.
41. Twum-Danso NA (2003) Serious adverse events following treatment with ivermectin for onchocerciasis control: a review of reported cases. *Filaria J. Suppl 1*:S3.
42. Madan V, Jaskiran K, Gupta U, Gupta DK. (2001) Oral ivermectin in scabies patients: a comparison with 1% topical lindane lotion. *J Dermatol*. 28(9):481-4.
43. Sparsa A1, Bonnetblanc JM, Peyrot I, Loustaud-Ratti V, Vidal E, Bédane C (2006) Systemic adverse reactions with ivermectin treatment of scabies. *Ann Dermatol Venereol*. 2006 Oct;133(10):784-7.
44. Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A, Fukuhara H (2002) Efficacy of ivermectin for chronic strongyloidiasis: two single doses given 2 weeks apart. *J Infect Chemother*. 8(1):94-8.
45. Costa, J.L. and J.A. Diazgranados. (1994) Ivermectin for spasticity in spinal-cord injury. *Lancet*. 343(8899): 739
46. González-Canga, A. Fernández-Martínez, N. Sahagún-Prieto, A. García-Vieitez, J. Díez Liébana, M.J. Tamame-Martín, P.P. Sierra-Vega, M. (2010). Seguridad de la ivermectina: toxicidad y reacciones adversas en diversas especies de mamíferos. *Revista MVZ Córdoba*. 15:2127-2135.
47. McKellar QA, Benchaoui HA. (1996) Avermectins and milbemycins. *JouARNI of Veterinary Pharmacology and Therapy*. 19: 331-351
48. Burkhart CN. (2000). Ivermectin: an assessment of its pharmacology, microbiology and safety. *Veterinary Human Toxicology*. 42: 30-35.

49. Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, Wise LD, Cartwright ME, Hall SJ. (1997) Identification of a P-glycoprotein- deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicology Applied Pharmacology*. 146: 88-94.
50. Lankas GR, Gordon LR. (1989). Ivermectin and abamectin. New York: Springer-Verlag: 89-112.
51. Baraka, O.Z., et al (1996) Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. *Eur J Clin Pharmacol*. 50(5):407-10.
52. Ashburn, Ted; Thor, KB. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 673-683.
53. Langedijk, J. Mantel- Teeuwisse, AK. Slijkerman, SD. Schutjens, DB. (2015). Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discovery Today* 20:1027-1033.
54. Chen B, Wild D, Guha R. (2009). PubChem as a source of polypharmacology. *JouARNI of Chemical Information and Modeling*. 49: 2044–55.
55. García-Sosa A, Oja M. (2017). DrugLogit: logistic discrimination between drugs and nondrugs including disease-specificity by assigning probabilities based on molecular properties. *JouARNI of Chemical Information and Modeling*. (May 2017, ahead of print)
56. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A. (2011). DrugBank 3.0: a comprehensive resource for “omics” research on drugs. *Nucleic Acids*. 39: D1035–D1041.
57. Campillos M, Kuhn M, Gavin A-C, Jensen LJ, Bork P. (2008). Drug target identification using side-effect similarity. *Science*. 321: 263–6.
58. Iwata H, Sawada R, Mizutani S, Yamanishi Y. (2015). Systematic Drug Repositioning for a Wide Range of Diseases with Integrative Analyses of Phenotypic and Molecular Data. *JouARNI of Chemical Information and Modeling* 55: 446– 459.
59. Didier A, Loor F (1996) The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 7 (7):745-751.
60. Liu Y, Fang S, Sun Q, Liu B (2016) Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 480 (3):415-421.

61. Melotti A, Mas C, Kuciak M, Lorente-Trigos A, Borges I, Ruiz i Altaba A (2014) The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO Mol Med* 6 (10):1263-1278.
62. Hashimoto H, Messerli SM, Sudo T, Maruta H (2009) Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. *Drug Discov Ther* 3 (6):243-246
63. Dou Q, Chen HN, Wang K, Yuan K, Lei Y, Li K, Lan J, Chen Y, Huang Z, Xie N, Zhang L, Xiang R, Nice EC, Wei Y, Huang C (2016) Ivermectin Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. *Cancer Res* 76 (15):4457-4469.
64. Kwon YJ, Petrie K, Leibovitch BA, Zeng L, Mezei M, Howell L, Gil V, Christova R, Bansal N, Yang S, Sharma R, Ariztia EV, Frankum J, Brough R, Sbirkov Y, Ashworth A, Lord CJ, Zelen A, Farias E, Zhou MM, Waxman S (2015) Selective Inhibition of SIN3 Corepressor with Avermectins as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther* 14 (8):1824-1836.
65. Yin J, Park G, Lee JE, Choi EY, Park JY, Kim TH, Park N, Jin X, Jung JE, Shin D, Hong JH, Kim H, Yoo H, Lee SH, Kim YJ, Park JB, Kim JH (2015) DEAD-box ARN helicase DDX23 modulates glioma malignancy via elevating miR-21 biogenesis. *Brain* 138 (Pt 9):2553-2570.
66. Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Medina-Franco JL, Saldivar-Gonzalez F, Flores-Torrentegui Y, Juarez M, Diaz-Chavez J, Gonzalez-Fierro A, Duenas-Gonzalez A (2018) Ivermectin as an inhibitor of cancer stemlike cells. *Mol Med Rep* 17 (2):3397-3403.
67. Sharmeen S, Skrtic M, Sukhai MA, Hurren R, Gronda M, Wang X, Fonseca SB, Sun H, Wood TE, Ward R, Minden MD, Batey RA, Datti A, Wrana J, Kelley SO, Schimmer AD (2010) The antiparasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood* 116 (18):3593-3603.
68. Draganov D, Gopalakrishna-Pillai S, Chen YR, Zuckerman N, Moeller S, Wang C, Ann D, Lee PP (2015) Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Sci Rep* 5:16222.
69. Norenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plotz T, Fischer W, Schmalzing G, Schaefer M (2012) Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 167 (1):48-66.

70. Zhang P, Zhang Y, Liu K, Liu B, Xu W, Gao J, Ding L, Tao L (2019) Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. *Cell Prolif* 52 (2):e12543.
71. Song D, Liang H, Qu B, Li Y, Liu J, Zhang Y, Li L, Hu L, Zhang X, Gao A (2019) Ivermectin inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Biochem* 120 (1):622-633.
72. Gupta P, Onder T, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg R, Lander E. (2009). Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell* 138: 645–659.
73. Mitani, T. Yamanishi, Y. Miyazaki, and N. Otake. (1976). “Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 9: 655–660.
74. Fuchs, A. Heinold, G. Opelz, V. Daniel, and C. Naujokat. (2009). “Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 390:743–749.
75. Fuchs, V. Daniel, M. Sadeghi, G. Opelz, and C. Naujokat. (2010). “Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 394: 1098–1104.
76. Kim, S. N. Yu, S. Y. Lee. (2011) “Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 413:80–86.
77. R. Riccioni, M. L. Dupuis, M. BeARNbei. (2010). “The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor,” *Blood Cells, Molecules, and Diseases* .45:86–92.
78. Lu, R. Morrison, S. M. Schleicher. (2011) “Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis,” *JouARNI of Oncology*. 2011:941876
79. Bardsley, V. J. Horvth, D. T. Asuzu. (2010). “Kitlow stem cells cause resistance to kit/platelet-derived growth factor experience at the Catalan Institute of Oncology,” *Annals of Oncology* 21:187–189.

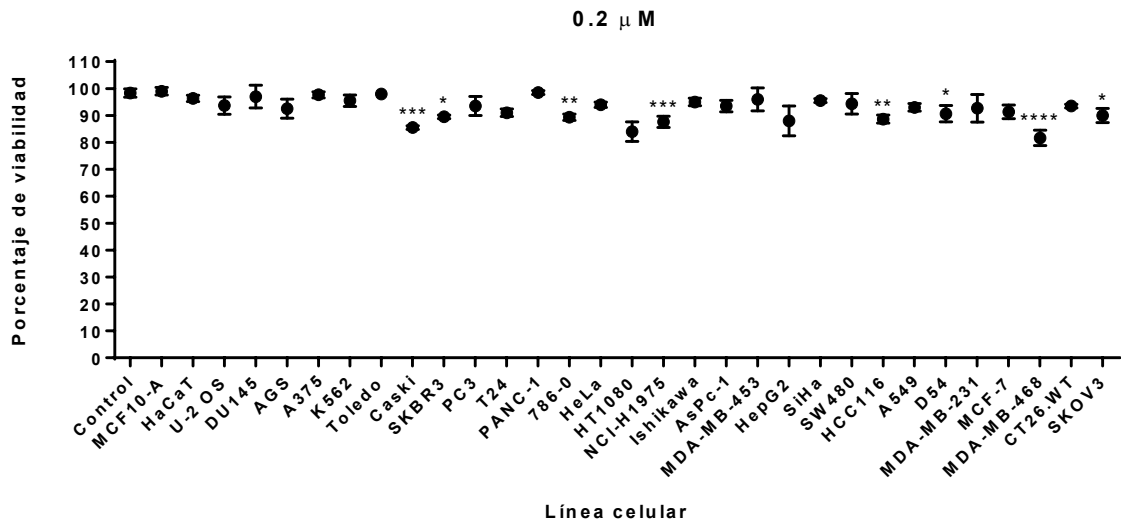
80. Naujokat C, Steinhart R. (2012) Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *JouARNI of Biomedicine and Biotechnology*. 2012:950658.
81. Medina-Franco JL (2019) New Approaches for the Discovery of Pharmacologically-Active Natural Compounds. *Biomolecules*. 23;9(3).
82. Mosin VA, Krugliak EB, Sterlina TS, Korystov IuN, Shaposhnikova VV, Kublik LN, Levitman MKh, Viktorov AV, Driniaev VA. (1999). Action of avermectins on lymphoid leukemia P-388 cells *in vitro*. *Antibiot Khimioter*. 44:16-20.
83. Mosin VA, Krugliak EB, Sterlina TS, Korystov IuN, Shaposhnikova VV, Narimanov AA, Kublik LN, Levitman MKh, Viktorov AV, Driniaev VA. (2000). Cytotoxic and cytostatic effect of avermectines on tumor cells *in vitro*. *Antibiot Khimioter*. 45:10-4.
84. Korystov YN, Ermakova NV, Kublik LN, Levitman MKh, Shaposhnikova VV, Mosin VA, Drinyaev VA, Kruglyak EB, Novik TS, Sterlina TS. (2004). Avermectins inhibit multidrug resistance of tumor cells. *European JouARNI of Pharmacology*. 493:57-64.
85. Driniaev VA, Mosin VA, Krugliak EB, Sterlina TS, Viktorov AV, Tsyganova VG, Korystova AF, Grichenko AS, Zenchenko KI, Kokoz IuM. (2001). Selective cytostatic and cytotoxic effects of avermectins. *Antibiot Khimioter*. 46(5):13-6.
86. Fang F, Pan J, Li YP, Li G, Xu LX, Su GH, Li ZH, Feng X, Wang J (2016) p21-activated kinase 1 (PAK1) expression correlates with prognosis in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 10;7(19):27422-9.
87. Nishio, M. Sugimachi, K. Goto, H. Wang, J. Suzuki A. (2015). Dysregulated YAP/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10:1073-1090.
88. Mastrangelo, E. Pezzullo, M. Dallmeier, K. (2012). Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *JouARNI of Antimicrobial Chemotherapy*. 67: 1884-94.
89. Matthews H, Deakin J, Rajab M, Idris-Usman M, Nirmalan NJ (2017) Investigating antimalarial drug interactions of emetine dihydrochloride hydrate using CalcuSyn-based interactivity calculations. *PLoS One* 12 (3):e0173303.
90. Oda M, Saitoh H, Kobayashi M, Aungst BJ (2004) Beta-cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 280 (1-2):95-102.
91. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22 (3):659-661.

92. Toru H, Susumu I and Hiroaki N (2011) Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. *Oncology reports*. 25: 289-296,
93. Appalaraju Jaggupilli and Eyad Elkord (2012) Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012:708036
94. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R Jr, Badve S, Nakshatri H. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(5):R59.
96. Huguet EL, et al. (1994). Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res*. 54: 2615-2621.
96. Baltus GA, Kowalski MP, Tutter AV, Kadam S (2009) A positive regulatory role for the mSin3A-HDAC complex in pluripotency through Nanog and Sox2. *J Biol Chem* 284 (11):6998-7006.
97. Zemkova H, Tvrdonova V, Bhattacharya A, Jindrichova M (2014). Allosteric Modulation of Ligand Gated Ion Channels by Ivermectin. *Physiol. Res*. 63: S215-S224.
98. Maggiora GM. (2006) On outliers and activity cliffs - why QSAR often disappoints. *J Chem Inf Model*. 46:1535
99. Medina-Franco JL and Maggiora GM. (2014) Molecular similarity analysis *Chemoinformatics for Drug Discovery*. Bajorath J: John Wiley & Sons, Inc. pp. 343-399.
100. Durant JL, Leland BA, Henry DR and Nourse JG. (2002) Reoptimization of Mdl Keys for use in drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci*. 42:1273-1280.
101. Willett P, Barnard JM and Downs GM. (1998) Chemical similarity searching. *J Chem Inf Comput Sci*. 38:983-996.
102. Ashraf S, Robin N. Beech, Mark A. Hancock, Roger K. Prichard. (2015) Ivermectin binds to *Haemonchus contortus* tubulins and promotes stability of microtubules. *International Journal for Parasitology*. 45:647-654.
103. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs R, Mehrotra S, Nakshatri P, Turner C, Goulet R, Badve S and Nakshatri H. (2006) CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research*. 8(5): R59.

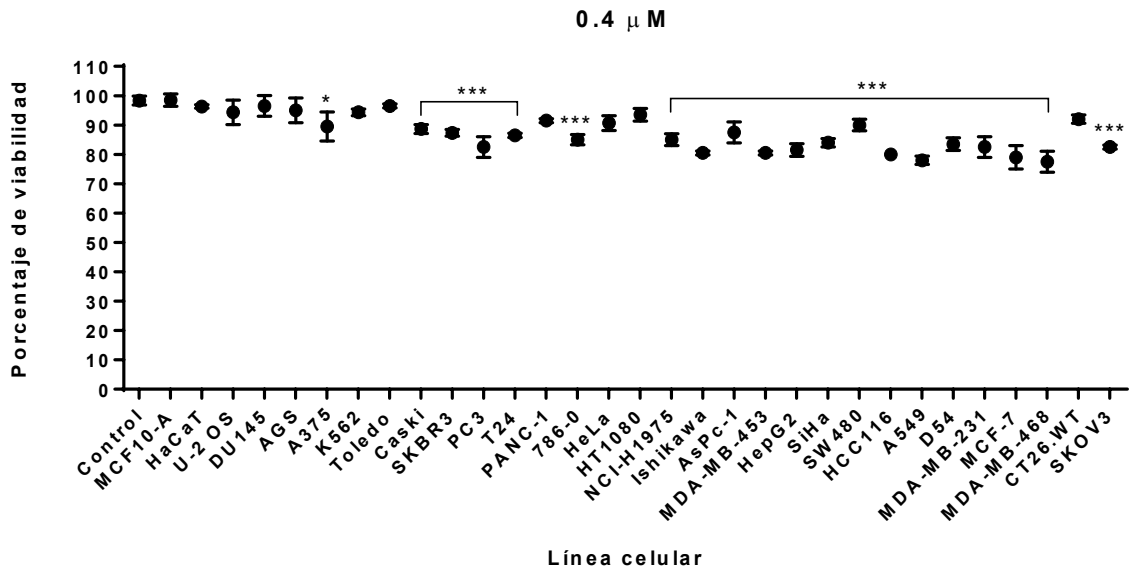
104. Jaggupilli A and Elkord E. (2012) Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*.
105. Lathia J, Mack S, Mulkearns-Hubert E, Valentim C and Rich J. (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes and Development*. 29(12):1203-17.
106. Lei Wang, Xing Huang, Xinmin Zheng, Xinghuan Wang, Shiwen Li, Lin Zhang, Zhonghua Yang, Zhiping Xia. (2013) Enrichment of Prostate Cancer Stem-Like Cells from Human Prostate Cancer Cell Lines by Culture in Serum-Free Medium and Chemoradiotherapy. *International Journal of Biological Sciences*. 9(5):472-479.
107. L Lin, Y Liu, H Li, P-K Li, J Fuchs, H Shibata, Y Iwabuchi and J Lin. (2011) Targeting colon cancer stem cells using a new curcumin analogue, GO-Y030. *British Journal of Cancer*. 105:212 – 220.+
108. Kozovska Z, Gabrisova V and Kucerova L. (2016) Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma*. 63(4):510-7.
109. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F and Kalthoff H. (2007) Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 6: 92-97.

12. Figuras suplementarias

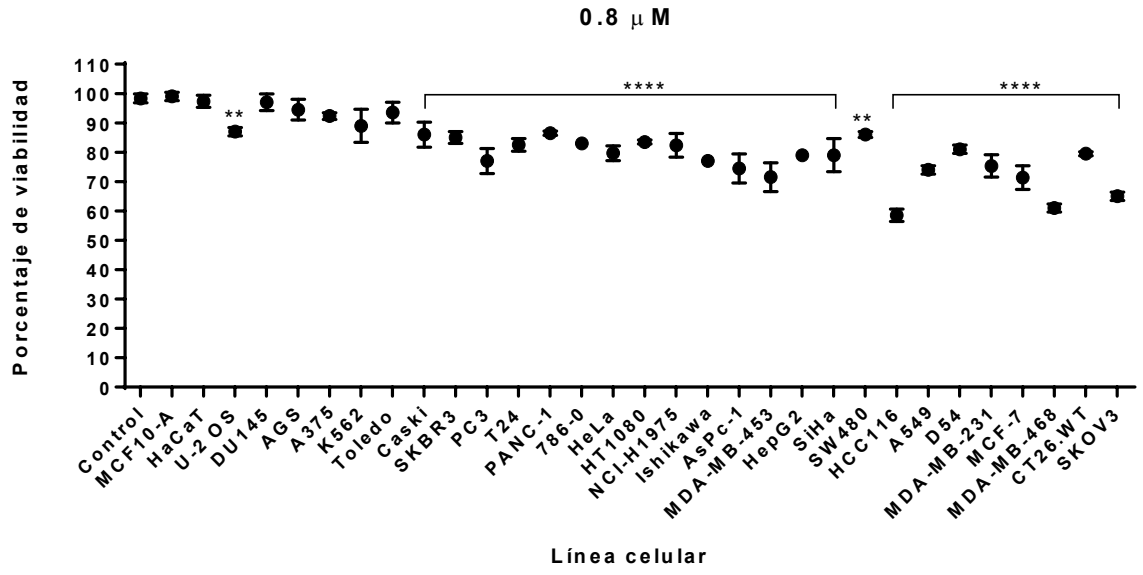
A



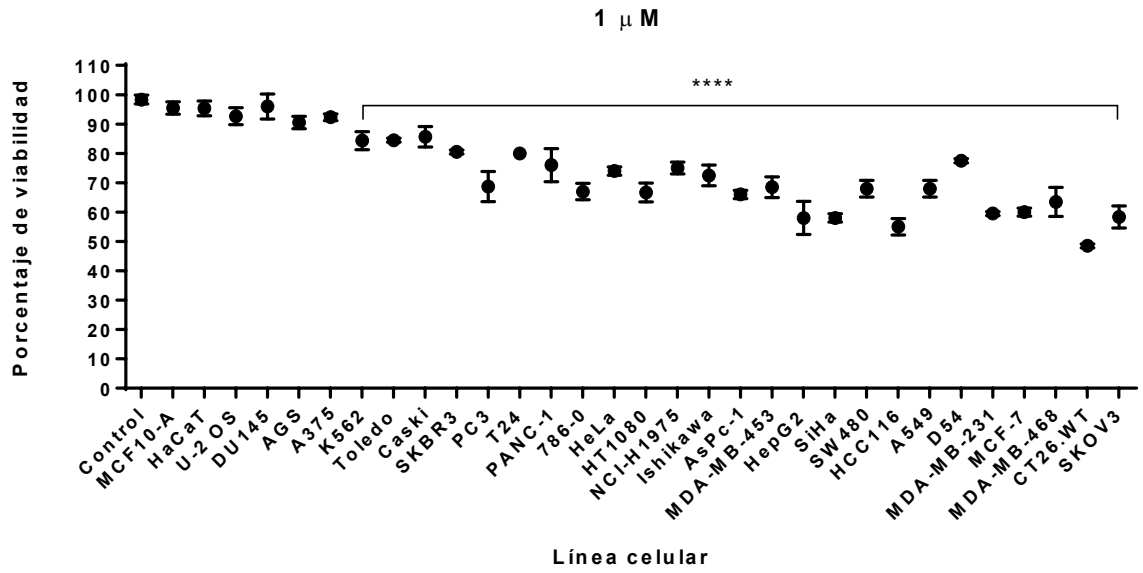
B



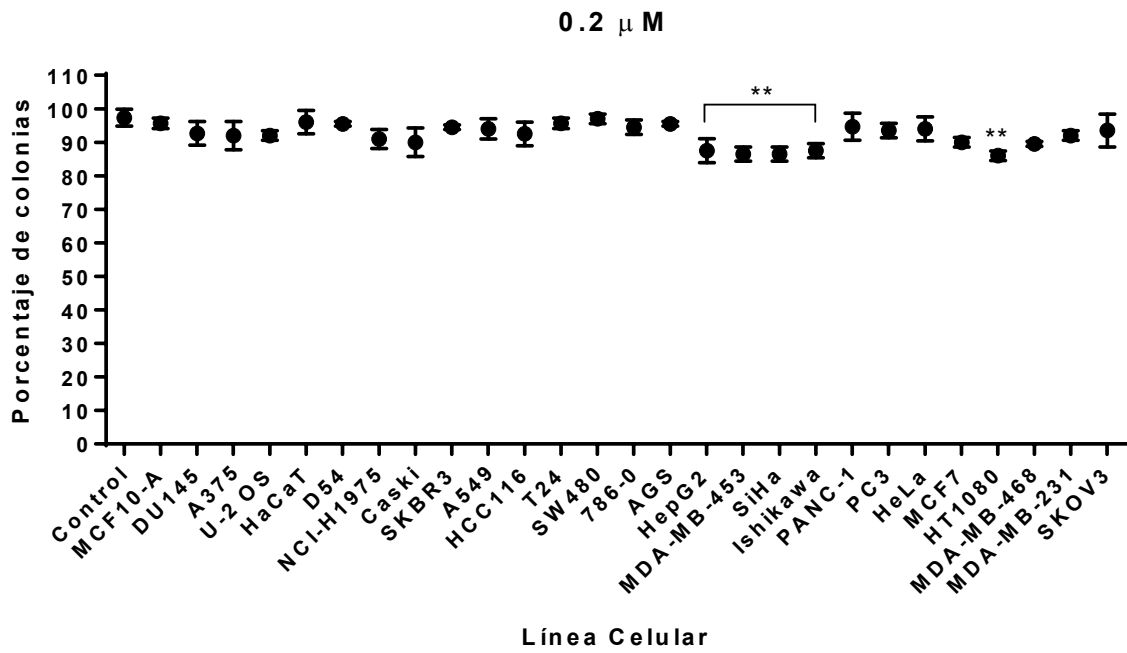
C



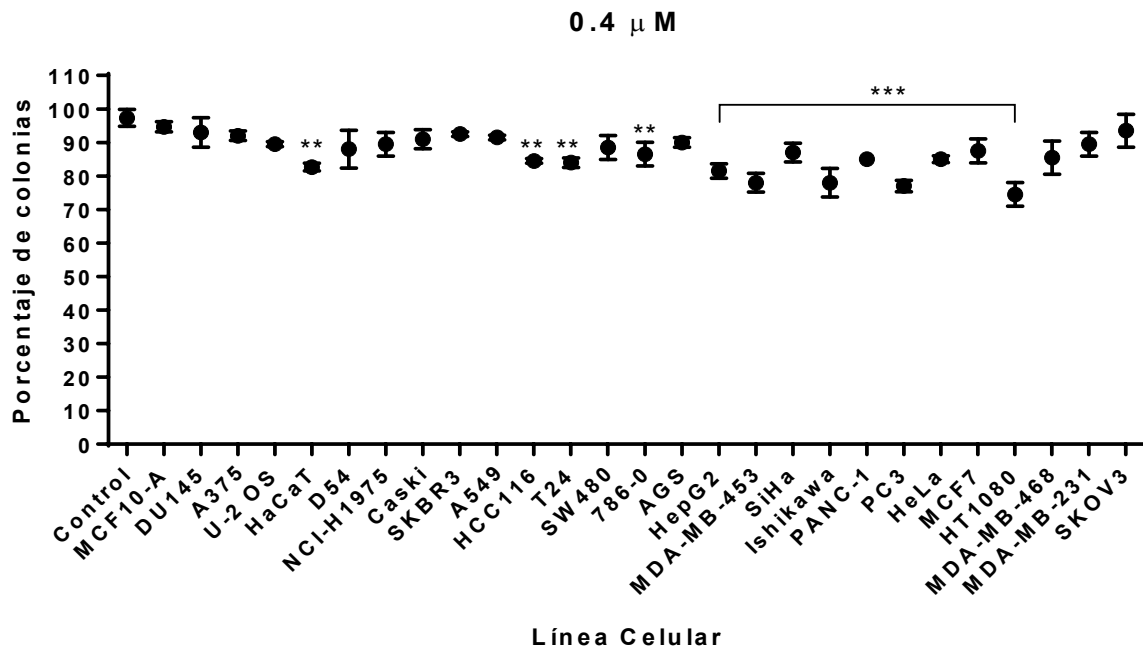
D



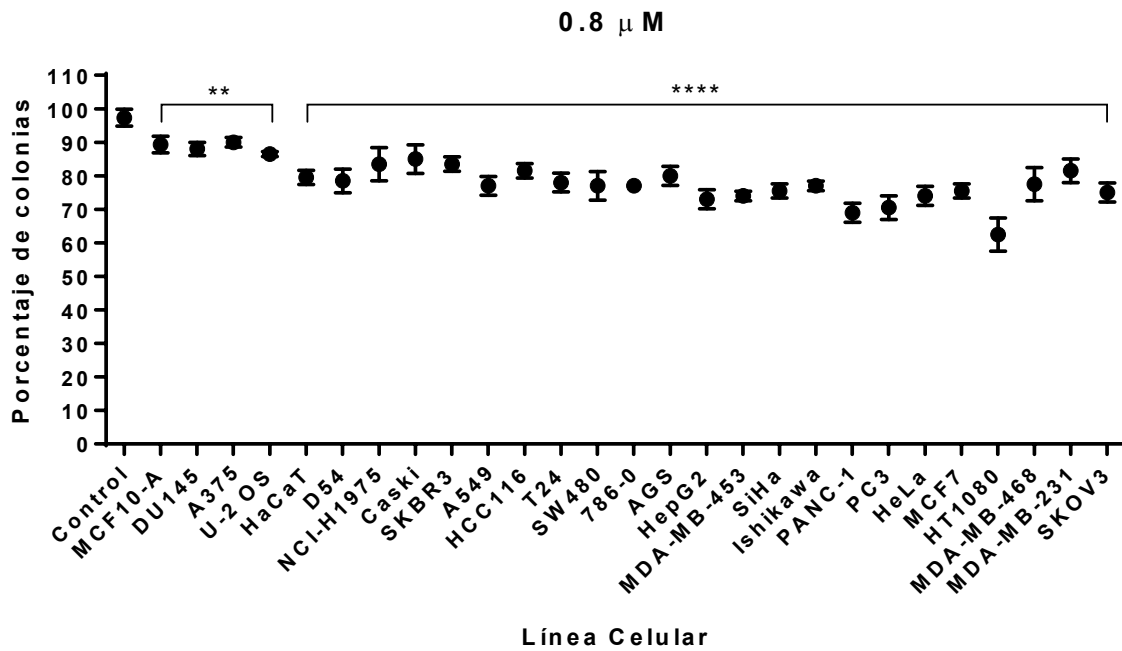
E



F



G



H

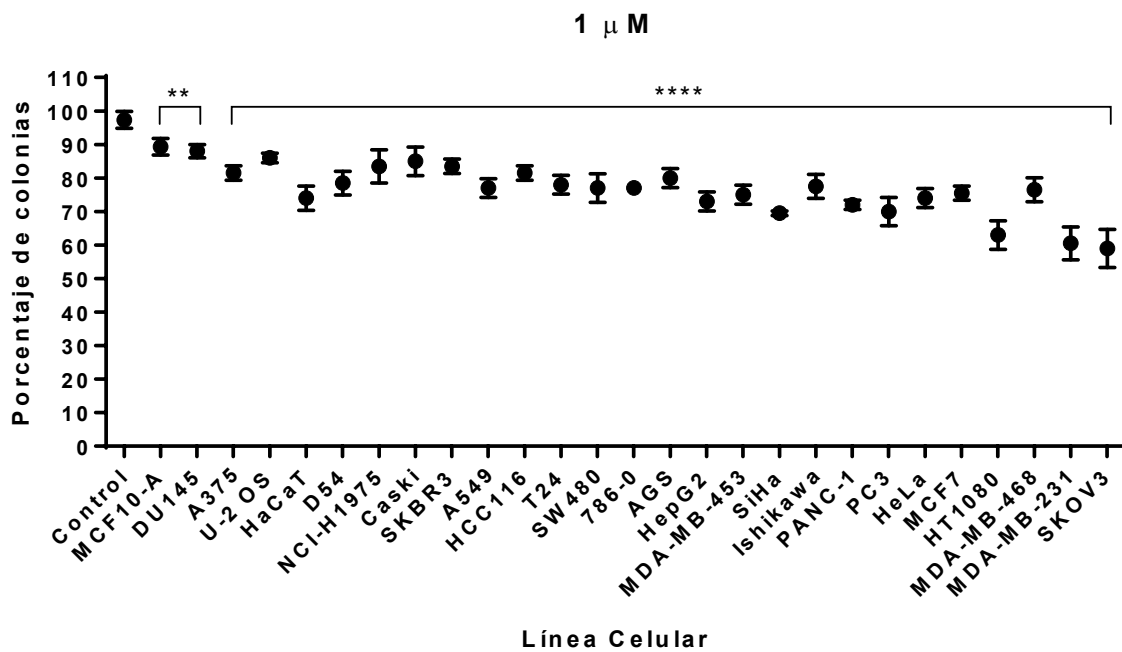


Figura suplementaria 1. Efecto de la ivermectina sobre la viabilidad celular y clonogenicidad en diversas líneas tumorigénicas. Respuesta al tratamiento con ivermectina sobre la viabilidad en diferentes líneas celulares a diferentes concentraciones (A-D). Respuesta al tratamiento con ivermectina medido como capacidad clonogénica sobre diferentes líneas celulares a diferentes concentraciones (E-H). *IVM*: ivermectina; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Tabla suplementaria 1. Líneas celulares, origen y medio de cultivo.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo
MDA-MB-231	Mama	Leibovitz's L-15 (Corning, Manassas, VA, USA)
MDA-MB-453		Leibovitz's L-15 (Corning, Manassas, VA, USA)
MDA-MB-468		Leibovitz's L-15 (Corning, Manassas, VA, USA)
MCF-7		DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
SK-BR-3		McCoy's 5a (Life technologies, Grand Island, NY, USA)
U-2 OS	Hueso	McCoy's 5a (Life technologies, Grand Island, NY, USA)
K-562	Médula ósea	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
Ca Ski	Cérvix	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
HeLa		DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
SiHa		DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
HCT116	Colon	McCoy's 5a (Life technologies, Grand Island, NY, USA)
SW480		Leibovitz's L-15 (Corning, Manassas, VA, USA)
HT-1080	Tejido conectivo	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
Ishikawua	Endometrio	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
D54	Glia	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
786-0	Riñón	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
HepG2	Hígado	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
A549	Pulmón	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
NCI-H1975		RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
Toledo	Sangre periférica	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
SKOV-3	Ovario	McCoy's 5a (Life technologies, Grand Island, NY, USA)
PANC-1	Páncreas	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
AsPC-1		RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
DU145	Próstata	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
PC-3		DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
A375	Piel	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
AGS	Estómago	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
T24	Vejiga	McCoy's 5a (Life technologies, Grand Island, NY, USA)
MCF10-A	Mama (inmortalizada)	DMEM-F12 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)
HaCaT	Piel (inmortalizada)	RPMI-1640 (Caisson Labs, Inc., North Logan, UT, USA)

Tabla suplementaria 2. Días transcurridos en cultivo para ensayos de clonogenicidad por línea celular.

Línea celular	Días en cultivo
MDA-MB-231	14
MDA-MB-453	14
MDA-MB-468	21
MCF-7	14
SK-BR-3	21
U-2 OS	18
K-562	14
Ca Ski	21
HeLa	21
SiHa	21
HCT116	14
SW480	14
HT-1080	14
Ishikawua	21
D54	21
786-0	21
HepG2	21
A549	14
NCI-H1975	14
Toledo	14
SKOV-3	14
PANC-1	21
DU145	21
PC-3	21
A375	14
AGS	14
T24	21
MCF10-A	21
HaCaT	21

APÉNDICE



Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug

Mandy Juarez¹ · Alejandro Schcolnik-Cabrera¹ · Guadalupe Dominguez-Gomez¹ · Alma Chavez-Blanco¹ · Jose Diaz-Chavez¹ · Alfonso Duenas-Gonzalez^{1,2}

Received: 14 October 2019 / Accepted: 7 February 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose Ivermectin is an antiparasitic drug that exhibits antitumor effects in preclinical studies, and as such is currently being repositioned for cancer treatment. However, divergences exist regarding its employed doses in preclinical works. Therefore, the aim of this study was to determine whether the antitumor effects of ivermectin are observable at clinically feasible drug concentrations.

Methods Twenty-eight malignant cell lines were treated with 5 μM ivermectin. Cell viability, clonogenicity, cell cycle, cell death and pharmacological interaction with common cytotoxic drugs were assessed, as well as the consequences of its use on stem cell-enriched populations. The antitumor in vivo effects of ivermectin were also evaluated.

Results The breast MDA-MB-231, MDA-MB-468, and MCF-7, and the ovarian SKOV-3, were the most sensitive cancer cell lines to ivermectin. Conversely, the prostate cancer cell line DU145 was the most resistant to its use. In the most sensitive cells, ivermectin induced cell cycle arrest at G₀–G₁ phase, with modulation of proteins associated with cell cycle control. Furthermore, ivermectin was synergistic with docetaxel, cyclophosphamide and tamoxifen. Ivermectin reduced both cell viability and colony formation capacity in the stem cell-enriched population as compared with the parental one. Finally, in tumor-bearing mice ivermectin successfully reduced both tumor size and weight.

Conclusion Our results on the antitumor effects of ivermectin support its clinical testing.

Keywords Ivermectin · Cancer · Cancer stem cells · Drug repurposing

Introduction

Avermectins are a complex of 16-membered macrocyclic lactones produced from soil fermentation of the actinomycete *Streptomyces avermitilis* [1, 2]. Eight avermectin compounds exist (A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a and B2b), and among them, the mixture of 80% B1a and 20% B1b has the highest antiparasitic activity and safety [3]. Such mix

compound is known as ivermectin [3]. Ivermectin is a broad-spectrum antiparasitic agent with human therapeutic dose rang between 0.1 and 0.4 mg/kg [4–7]. As an antiparasitic, ivermectin prevents the closure of glutamate-gated chloride ion channels, leading to plasma membrane hyperpolarization, which paralyzes pharyngeal and somatic muscles of the parasite, leading to its death [8].

Ivermectin is a drug candidate for repurposing as an anticancer drug [9]. As such, it is important to determine whether its antitumor effects in vitro can be achieved at pharmacological doses. The therapeutic doses as an antiparasitic compound in human ranges between 0.1 and 0.4 mg/kg, resulting in an AUC of 1444 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}$, which translates into 1.65 μM using the calculator found in <https://www.tocris.com/resources/molarity-calculator>, which considers the molecular weight of ivermectin of 875.1 g/mol, a volume of 1 mL, and the mass of 1.444 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}$. Nevertheless, studies showing the in vitro antitumor effects of ivermectin use this drug at concentrations up to 100 μM , which could not

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00280-020-04041-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alfonso Duenas-Gonzalez
alfonso_duenasg@yahoo.com

¹ Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico

² Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, San Fernando 22, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

be clinically reachable [9–20]. In a phase I pharmacokinetic study done in healthy volunteers, it was demonstrated that doses up to 2 mg/kg can be tolerable [21] using the same formula, we calculated that at this dose, which leads to an AUC of 4547 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}$ [21], the *in vitro* concentration to be tested test would be 5 μM of ivermectin.

In this sense, we analyzed the *in vitro* antitumor effects of ivermectin in 28 cancer cell lines using a 5 μM concentration. We found that ivermectin differentially reduced cell viability and clonogenic capacity, through the induction of cell cycle arrest. Moreover, ivermectin synergized with docetaxel, tamoxifen and cyclophosphamide. We also identified a higher antineoplastic effect on cancer stem cells than in the parental population. Finally, we demonstrated an important antitumor effect of ivermectin *in vivo*.

Materials and methods

Cell lines and drugs

All the cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). All the media were supplemented with fetal bovine serum and streptomycin/amphotericin solution (Invitrogen, MA, USA), for a final concentration of 10% and 1%, respectively. All the cell lines, as well as their tissue of origin and the culture medium used for each one, are found on Suppl. Table 1. Particularly, the complete medium of MCF10-A cells was supplemented as previously reported [22]. Cells were cultured at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The drugs and their respective vehicles that were employed for this work are found in Suppl. Table 2.

Viability assays and inhibitory concentrations (ICs) with ivermectin

Each cell line was seeded with 1 mL of its respective medium, during a pre-incubation period of 24 h. Then, cells were treated during 72 h with either 5 μM ivermectin or its vehicle (0.1% absolute ethanol). After that, cells were detached with a 0.5% trypsin–1% EDTA solution (Gibco, NY, USA and Invitrogen, MA, USA, respectively) for cell counting with the trypan blue exclusion assay. Briefly, cells were gently mixed at 1:1 ratio with trypan blue stain solution (Life Technologies®), and cell viability was evaluated with a TC10™ Automated Cell Counter (BioRad®). The cytotoxic effect was expressed as the percentage of cell viability relative to control cells. The resulting data were introduced in the SigmaPlot® software version 10.0. The percentage of growth inhibition was calculated, and IC₂₀–IC₅₀ values were obtained from survival curves.

Clonogenic assays of ivermectin-treated cells

After finishing cell viability assays, 1000 cells/condition were recovered and cultured in 2 mL of drug-free complete medium during 14–21 days, according to the specific cell line (Suppl. Table 1). Subsequently, colonies were fixed with a methanol/acetic acid (3:1 v/v) solution, and stained with 0.4% crystal violet (Sigma-Aldrich, Germany). Colonies on culture dish were counted with a stereo microscope and quantified using the ImageJ software (2.0 version).

Flow cytometry determination of apoptosis and necrosis of ivermectin-treated cells

DU145, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines were treated with 5 μM ivermectin or its vehicle during 72 h. After that, cells were trypsinized, collected and washed with PBS 1X. Then, cells were labelled with the annexin-V-FLUOS staining Kit (Roche, Germany), and quantified with a BD FACSCanto™ II flow cytometer. 50,000 events/sample were employed to simultaneously analyze apoptosis and necrosis, with the BC FACSDiva™ V6.1.3 software (Becton Dickinson, USA).

Cell cycle analysis of ivermectin-treated cells by flow cytometry

DU145, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines were treated with 5 μM ivermectin or its vehicle during 72 h. After that, cells were trypsinized, collected and washed with PBS 1X. Then, cells were stained with propidium iodide (Sigma®) during 20 min at room temperature in the dark. 50,000 events/sample were collected to evaluate cell cycle with a BD FACSCanto™ II flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Cell cycle analysis was performed with the ModFit LT V.2.0 software.

Viability curves and identification of ICs of the chemotherapeutic drugs

DU145, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines were treated with increasing doses of either cyclophosphamide (0.5–10 μM), docetaxel (1–100 pM, 1–10 nM), or tamoxifen (0.5–10 μM), and compared against the corresponding vehicle, during a 72 h period. Then, cell viability and the IC_{20–50} values were evaluated as stated before.

Pharmacological interactions

Increasing doses of ivermectin (IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀, and IC₅₀) were combined with their respective increasing doses of

either docetaxel, tamoxifen or cyclophosphamide, depending on the evaluated cell line. The resulting mixes were employed during 72 h for viability assays on the DU145, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines, as previously described. The pharmacological interaction was determined using the combination index (CI) method with the CalcuSyn software (Biosoft®) [23], to determine the presence of synergism, antagonism, or additive effects.

Selection of cancer stem-like cells by sorting markers of stemness

Cells from MCF-7, SKOV-3, and MDA-MB-468 cell lines (6×10^6 , 6×10^6 and 4×10^6 cells, respectively) were incubated at 4 °C in the dark during 40 min with fluorophore-conjugated monoclonal antibodies against human CD44-FITC (BD Biosciences, 555742) and human CD24-PE (BioLegend, Inc, 311106), or against their respective isotype controls (FITC-IgG2bκ, BD Biosciences, 555742; PE-IgG2aκ, BD Biosciences, 555574). Labeled cells were washed twice with wash buffer. The marker populations were evaluated using BD FACSDiva version 6.1.3 (BD Biosciences), with a BD FACSAria II™ (BD Biosciences) flow cytometer (Suppl. Figure 1).

Cell viability evaluation on cancer stem-like cells

Spheres from MCF-7, MDA-MB-468 and SKOV-3 cell lines were grown in low-adherence flasks (Corning, ME, USA) under stem-cell conditions, as reported by [24, 25]. After a 15-day period of growing, spheres were harvested and centrifuged (350G, 5 min). Next, cellular viability was measured as stated before. 5×10^3 cells/well were seeded in low-adherence 24-well plates (Corning, ME, USA), and treated with either 5 μM ivermectin or its vehicle during 72 h. Finally, cells were stained with trypan blue to assess cell viability, as aforementioned. The number of colonies was counted every 24 h with an inverted optical microscope.

Quantitative reverse transcription and real-time PCR

Cancer stem-like cells from the MCF-7, MDA-MB-468 and SKOV-3 cell lines were treated with either 5 μM ivermectin or its vehicle during 72 h. RNA isolation, qPCR, and primers for *Nanog*, *Oct-4* and *Sox-2* genes were done according to our previous report [9]. The employed primers for mastermind-like transcriptional coactivator 3 (*Maml3*) were: forward, 5'-GGG CGG CAT AAA CAC CAA-3', and reverse, 5'-GAC ACG CGC GAC ACA CA-3', and were employed by following [9].

Western blot analysis

DU145, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines were treated with either 5 μM ivermectin or its vehicle during 72 h. Then, total protein extraction and western blot analysis were done, by following our previous report [9]. The primary antibodies anti-PCNA (1:1500; cat. no. SC56, Santa Cruz Biotechnology), anti-Cyclin E (1:1500; cat. no. SC198, Santa Cruz Biotechnology), anti-Cyclin D (1:1500; cat. no. SC753, Santa Cruz Biotechnology), and anti-p21 (1:1500; cat. no. SC-6246, Santa Cruz Biotechnology) or anti-actin peroxidase (1:20,000; cat. no. A 3854, Sigma-Aldrich, Germany) were used. For cyclins E and D, the secondary bovine anti-rabbit antibody (1:2000; cat. no. sc-2370, Santa Cruz Biotechnology) was used, and for p21 and PCNA, the secondary bovine anti-mouse antibody (1:2000; cat. no. sc-2371, Santa Cruz Biotechnology) was employed.

In vivo animal studies

All animal experiments were approved and conducted under the guidelines of the Bioethical and Scientific committees of the National Institute of Oncology (protocol numbers CEI/1145/17 and 017/016/IBI, respectively), in Mexico City, Mexico. 5×10^5 JC murine breast cancer cells were subcutaneously injected in one flank of 6-week-old female Balb/c mice ($n = 36$). Each mouse was daily treated with cyclodextrin [26] carrier alone, or with ivermectin conjugated with cyclodextrin (45% final concentration), for a final dosage of 3 mg/kg, during 21 days. This dose is equivalent to 243 μg/kg in humans, according to the Reagan-Shaw formula [27]: human equivalent dose = animal dose (mg/kg) \times mouse K_m / human K_m , where the human and mouse K_m was 37 and 3, respectively. Tumor volumes were calculated according to the formula: volume = (Major axis \times minor axis²) \times ($\pi/6$). Tumor volumes and mice global weight were measured every 3 days until they were killed at day 21, when the tumor was also weighted.

Statistical analyses

Analyses were performed with the GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software, CA, USA). All the in vitro and in vivo experiments were conducted at least in triplicate, with three internal replicates. *p* values were calculated using the unpaired Student's *t* test followed by Welch's post hoc test for apoptosis and cell cycle assays, as well as for both spheres' viability and colony-forming capacity on the stem population, for mice weight one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test for viability and clonogenicity assay over the 30 cell lines; and two-way ANOVA followed by the Kruskal–Wallis post-hoc

test for tumor volume. Data were expressed as mean \pm SD. A p value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Ivermectin mainly inhibits cell viability and clonogenic capacity on breast and ovarian cancer cell lines

We screened 28 malignant and two healthy cell lines with the maximum safe human serum concentration of ivermectin (5 μ M). We found that the two healthy cell lines MCF10-A and HaCaT, as well as the U-2SO and DU145 malignant cell lines, were the most resistant to ivermectin treatment. On the contrary, the MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 and SKOV-3 cell lines were highly responsive, since the percentage of viability decreased by 58%, 67%, 67%, and 70%, respectively (Fig. 1a). Next, clonogenicity tests were performed to determine the ivermectin effect over the ability to form colonies (Fig. 1b). There was no significant effect

on the clonogenic capacity in MCF10-A, DU145, A375 and U-2SO cells. Conversely, HT-1080, MDA-MB-468, MDA-MB-231 and SKOV-3 cells got reduced their ability to form colonies (Fig. 1c). To select the cell lines for further assays, we made a linear correlation between viability and clonogenicity. We selected DU145 as a resistant cell line, and MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 as sensitive cell lines to ivermectin (Fig. 1d).

Ivermectin does not induce cell death by apoptosis on cancer cell lines

Next, to evaluate whether the reduction on cell viability after treatment with ivermectin was due to apoptosis or necrosis, we treated DU145, MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines, with 5 μ M ivermectin. We observed an absence of significant effect on apoptosis and necrosis in all the evaluated cell lines (Fig. 2a–d). Therefore, we suggested that 5 μ M ivermectin does not induce cell death through these pathways.

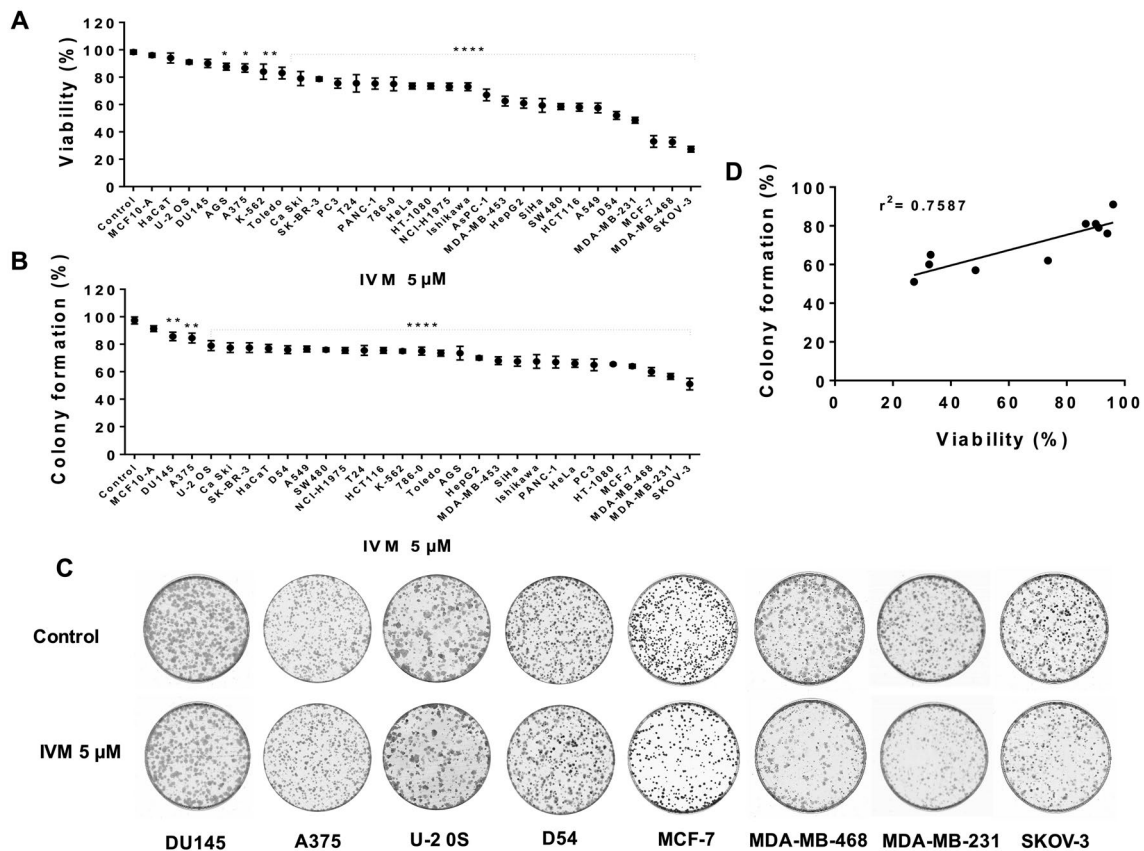


Fig. 1 Ivermectin effect on cell viability and clonogenic capacity over different tumorigenic cell lines. Viability (**a**) and clonogenic (**b**) effects on different cancer cell lines after 5 μ M ivermectin. Colony formation on the most sensitive and resistant cell lines to the treat-

ment with ivermectin (**c**). Linear correlation between viability and clonogenicity of the most resistant and sensitive cell lines to ivermectin (**d**). *IVM* Ivermectin; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

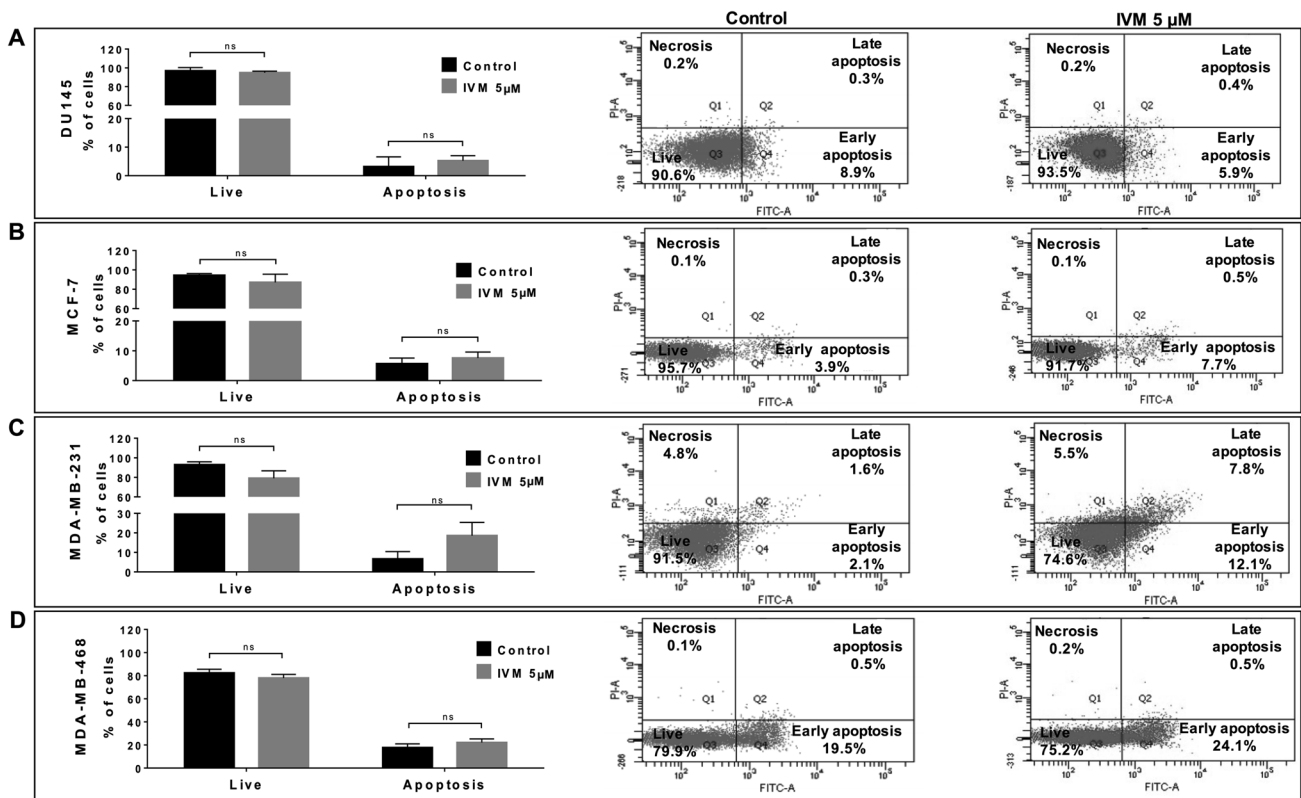


Fig. 2 Ivermectin (5 µM) does not induce apoptosis on the evaluated malignant cell lines. Apoptosis assays on the most resistant cell line DU145 (a) and on the most sensitive cell lines MDA-MB-231 (b), MCF-7 (c), and MDA-MB-468 (d). *IVM* Ivermectin, *ns* Non-significant

Ivermectin arrests cells at G_0 - G_1 phase of the cell cycle

To conclude whether the effect of ivermectin on sensitive and resistant cell lines was associated with disturbances on the cell cycle phases, we performed cell cycle assays. We observed no significant changes on the resistant line DU145 (Fig. 3a). However, the sensitive cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 were arrested in the cell cycle phase G_0 - G_1 . (Fig. 3b–d). Western blot assays showed that the treatment with ivermectin on the sensitive cell lines decreases the levels of cyclin D, cyclin E and PCNA, while p21 got increased (Fig. 3e–f). These results suggest that ivermectin blockades the transition from G_0 - G_1 to S phase.

The pharmacological combination of ivermectin and standard chemotherapeutics has synergistic effects

Since ivermectin could be therapeutically repositioned, we decided to evaluate a possible synergistic effect between ivermectin and some chemotherapy drugs currently used to treat breast and prostatic cancer. To this end, we performed dose–response curves with docetaxel, tamoxifen and

cyclophosphamide. The inhibitory concentrations (IC)_{20–50} were calculated for both ivermectin (Table 1) and the chemotherapeutic compounds (Table 2). Subsequently, the combination index (CI) was determined by combining the ICs of ivermectin plus the chemotherapeutic drug. Interestingly, the resistant cell line DU145 had the most synergistic effect, since the IC₂₀ combination of ivermectin plus docetaxel showed a strong negative CI value (Fig. 4a). Besides, we observed a synergistic effect on MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines, starting at IC₃₀ doses of the analyzed compounds (Fig. 4b–d). This suggests that ivermectin could be combined with some standard therapies as a treatment against certain types of cancer.

Ivermectin reduces cell viability and colony percentage on the cancer stem-like malignant population

We have previously reported that ivermectin preferentially targets the cancer stem-like population on the MDA-MB-231 cell line [9]. Therefore, we wanted to determine whether ivermectin has the same effect over the cancer stem-like cells derived from MCF-7, MDA-MB-468 and SKOV-3 cell lines. After isolating the cancer stem-like population

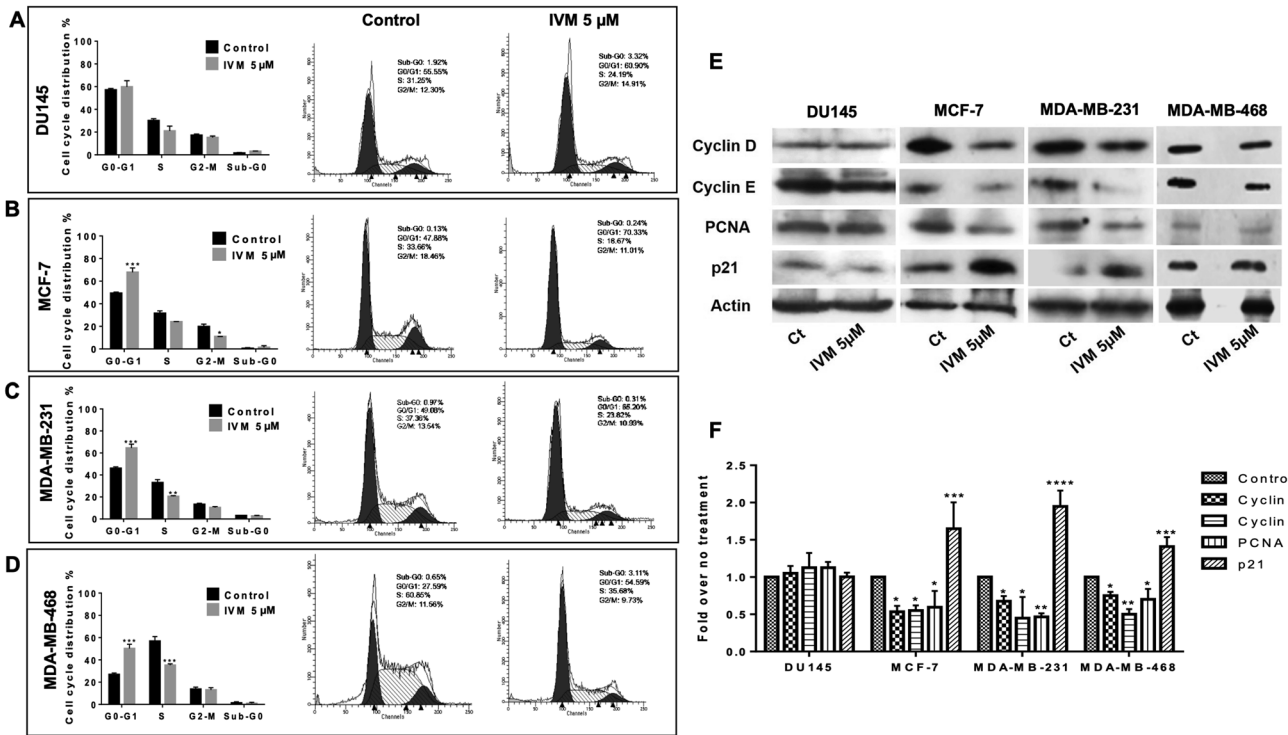


Fig. 3 Ivermectin (5 μM) arrests cell cycle at G₀-G₁ phase. Cell cycle assay on the DU145 (a), MCF-7 (b), MDA-MB-231 (c) and MDA-MB-468 (d) cell lines. Western blot assays of cyclin D, cyclin E,

PCNA, p21 and actin proteins of the aforementioned cell lines (e) and their densitometry comparison (f). *IVM* Ivermectin; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001

Table 1 Inhibitory concentrations (IC)₂₀₋₅₀ of ivermectin

Cell line	IC ₂₀ (μM)	IC ₃₀ (μM)	IC ₄₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
DU145	10.3	11.5	12.5	13.5
MCF-7	0.42	0.69	1.09	1.66
MDA-MB-231	0.47	0.85	2.03	6
MDA-MB-468	0.31	0.55	0.93	1.52

from the parental cells (total of sorted populations 7.8×10^5 , 9.4×10^5 , and 1.8×10^4 , respectively), the sorted populations were treated with 5 μM ivermectin. We observed that among all the evaluated cell lines, a decrease in cell viability and clonogenicity is more evident in the cancer stem-like cells than in their parental population (Fig. 5a–c). In addition, we performed qPCR experiments to measure *Nanog*, *Sox2*, *Oct4* and *Mamal3*, and it was found that the expression levels

of those genes was reduced (Fig. 5d–f). This suggests that ivermectin has a preferential depletion effect on the cancer stem-like cell population.

Ivermectin reduces the tumoral volume in a syngeneic mice model

After treating the murine breast cancer cell line JC with 5 μM ivermectin, the cell viability and the number of colonies decreased by 75% and 21%, respectively (Fig. 6a, b). Next, after treating JC-bearing mice with ivermectin, we observed that tumors grew slower than those in mice from the control group (Fig. 6c). At day 21 of the assay, the average volume of tumors in treated mice was 63% smaller than in the control group (Fig. 6d–f). Interestingly, while the tumor weight was 56% lower in the treated group with respect to the control (Fig. 6e), the mice weight did not show

Table 2 Inhibitory concentrations (IC)₂₀₋₅₀ of docetaxel, tamoxifen and cyclophosphamide

Cell line	Drug	IC ₂₀ (μM)	IC ₃₀ (μM)	IC ₄₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
DU145	Docetaxel	6.25	14.34	41	111.1
MCF-7	Tamoxifen	0.57	1.16	1.86	2.8
MDA-MB-231	Docetaxel	0.00096	0.00013	0.00017	0.00022
MDA-MB-468	Cyclophosphamide	0.23	0.56	1.05	1.65

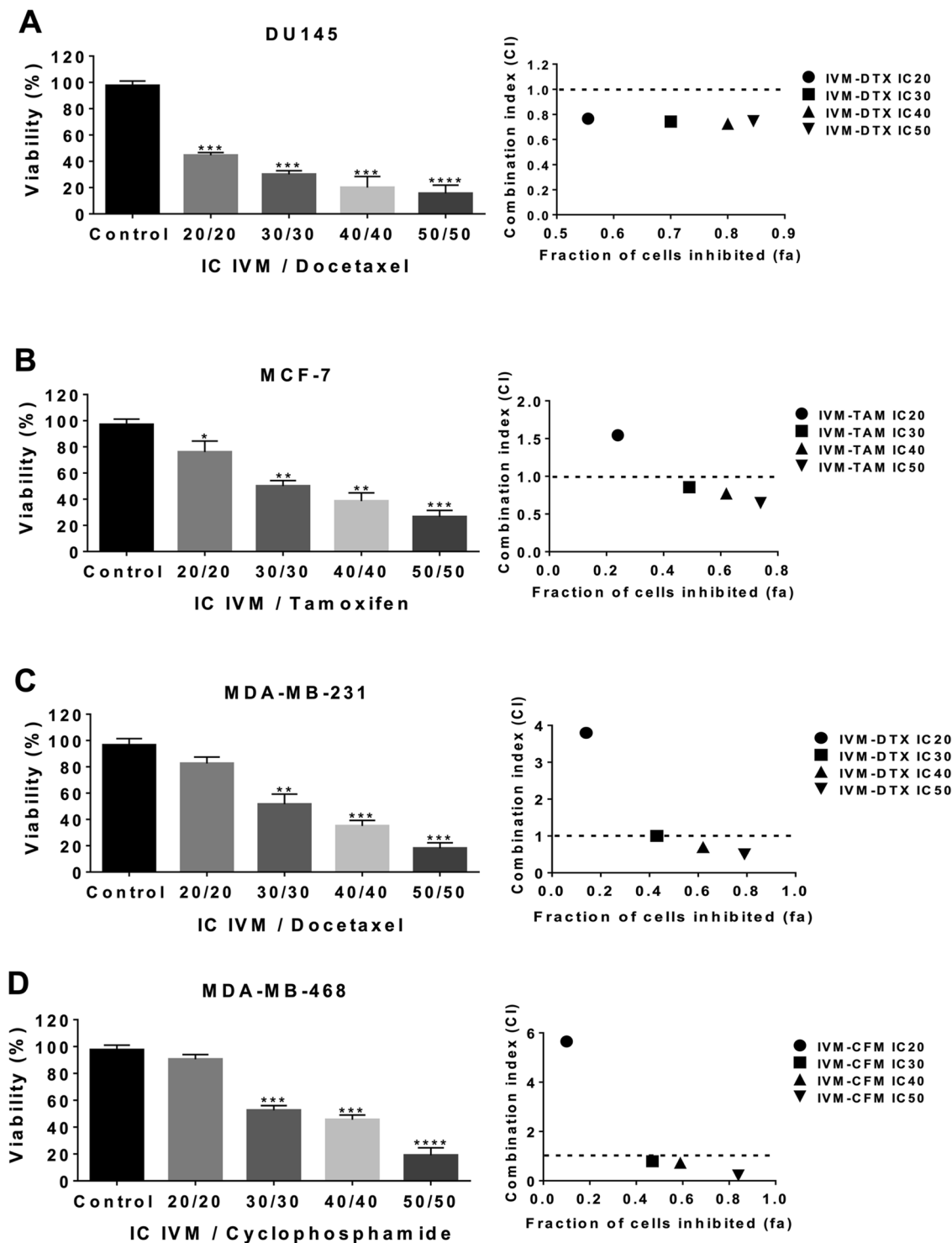


Fig. 4 The combination of ivermectin with standard chemotherapeutic compounds has synergistic effects. Effect on cellular viability and pharmacological interactions between the inhibitory concentrations (IC)₂₀₋₅₀ of ivermectin plus either docetaxel, tamoxifen or cyclo-

phosphamide, on the DU145 (a), MCF-7 (b), MDA-MB-231 (c) and MDA-MB-468 (d) cell lines. *IVM* Ivermectin, *DTX* Docetaxel, *TAM* Tamoxifen, *CFM* Cyclophosphamide; **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001

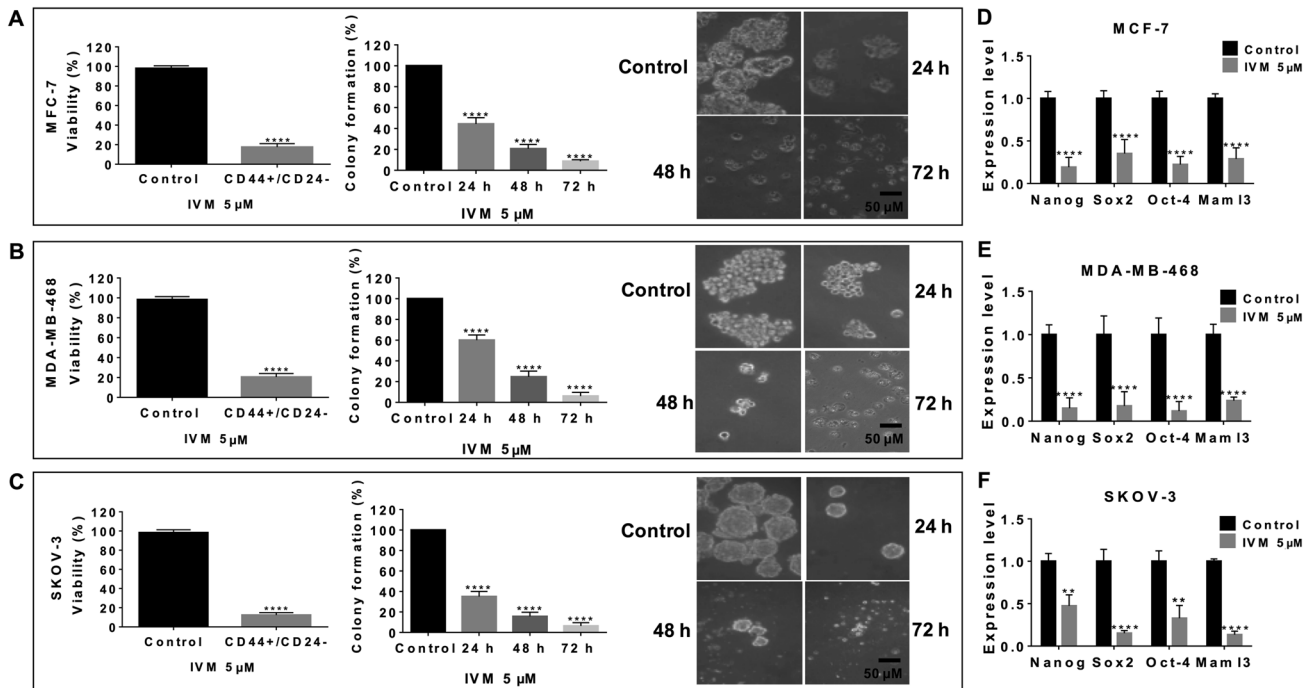


Fig. 5 Ivermectin (5 μ M) reduces the viability and the colony-forming capacity on the cancer stem-like malignant population. Effect in cell viability and colony formation ability of cancer stem-like populations from the MCF-7 (a), MDA-MB-468 (b) and SKOV-3 (c) cell lines. Representative photography of colonies of each cell line at 24,

48 and 72 h of treatment, and of colonies from control cells after 72 h, are also provided. Relative mRNA levels of stemness genes from the MCF-7 (d), MDA-MB-468 (e) and SKOV-3 (f) cell lines. *IVM* Ivermectin; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

significant differences between the groups (fig. 6g, h). Such results are consistent with our previous observations where ivermectin stops cell proliferation in vitro, suggesting that ivermectin acts the same way in vivo. A weakness of this study is that we were unable to purchase immunosuppressed mice to be injected with human cancer cells.

Discussion

Currently, affordability of safer and effective anticancer drugs is urgently needed for cancer patients. Drug repurposing can help to solve the current problem. Among many drugs in development under the repurposing approach, ivermectin is very promising because its antitumor effects are seen at concentrations achievable in patients receiving this drug, which are around 5 μ M [21]. Secondly, ivermectin has been administered to millions of patients, and therefore, its safety is not a major concern. Together, our results on the growth inhibition of the human cancer cell lines plus the previous data from around 26 cancer cell lines treated with ivermectin [10] indicate that more than 50 human cell lines are inhibited in some degree by ivermectin, which supports its potential as a wide-spectrum cancer drug. Moreover, we observed a directed correlation between in vitro sensitivity

with clonogenicity (Fig. 1). Regarding in vivo data, human xenografts of glioblastoma, leukemia and carcinomas of breast and colon origins in nude mice, as well as numerous murine cell lines in syngeneic models, have shown that a median dose of 5 mg/kg ivermectin has a strong antitumor effect [12, 13, 15, 17, 18]. Here we were unable to get immunosuppressed mice. Hence, we tested the JC murine breast cancer cells in Balb/c mice. At a dose of 3 mg/kg (human equivalent dose of 243 μ g/kg), according with the formula by [27], we observed more than 60% reduction in tumor size, without changes in mice weight.

To further analyze the cellular effects of ivermectin, we selected a resistant (prostate DU145, inhibition of 9% only) and sensitive cell lines (breast MDA-MB-231, MCF-7 and MDA-MB-468, viability inhibition ranging between 58 and 70%). As expected, no significant effect with 5 μ M ivermectin in cell cycle and apoptosis was observed in DU145, whereas in the sensitive cells, there was a statistically significant arrest in G_0 - G_1 , but cell death by apoptosis was not observed. These results partly agree with other works where ivermectin inhibits cell proliferation [12, 14, 15, 19, 28, 29]. A study showed that in colon carcinoma cells, ivermectin induced the expression of p21 and reduced cyclin D1 [13]. As we observed mainly a G_0 - G_1 arrest, we demonstrated that ivermectin increased the expression of p21, while

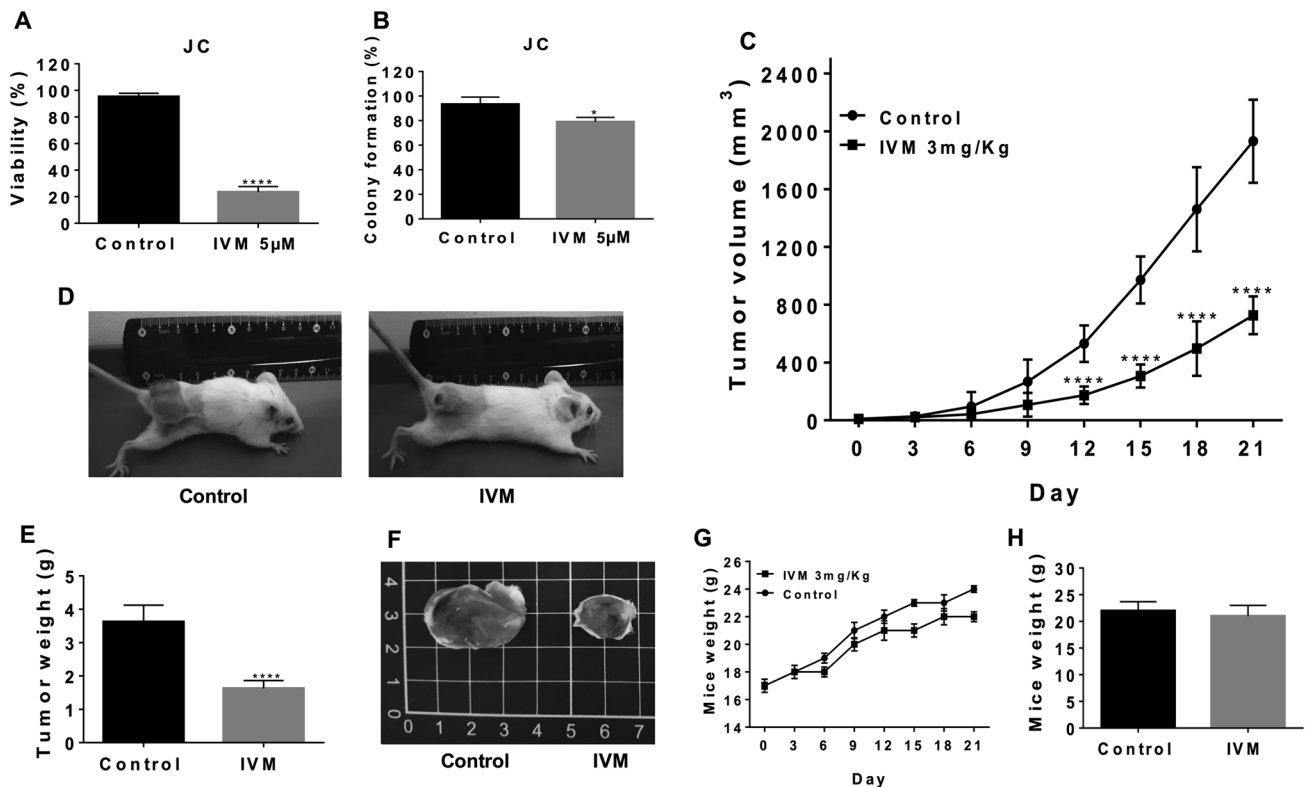


Fig. 6 Ivermectin diminishes the tumor volume in an allogeneic mice model. Effect on the percentage of cell viability (a) and on the number of colonies (b) in the JC cell line after the treatment with ivermectin. Tumor volume over time on mice (c). Representative mice photography at day 21 of treatment (d). Tumor weight (e) and rep-

resentative photography of recovered tumors (f) at the end of the 21-day assays. Mice weight over time (g). Mice weight after removing the tumor at the end of the 21-day assays (h). *IVM* Ivermectin; * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$

reduced cyclin D, cyclin E and PCNA proteins. Further characterization of ivermectin regarding the expression of cdk4 and cdk6 (G1 regulatory proteins), as well as cdk2 and cyclin A (S phase regulators), are needed for better characterization of ivermectin effects upon cell cycle. Nevertheless, our results are in agreement with the data from Song et al. [29].

Ivermectin has shown to preferentially inhibit the viability of cancer stem-like cells enriched populations (CD44⁺/CD24⁻), as compared to parental cells, in MDA-MB-231 breast cancer cells [9]. To extend these observations, here we show that ivermectin preferentially inhibits the sorted CD44⁺/CD24⁻ cells, of two breast cancer and one ovarian cancer cell lines. These effects were associated with a decreased expression of the stem cell pluripotency and self-renewal genes, *Sox2* and *Nanog* [30]. The mechanism by which ivermectin has this effect on cancer stem-like cells is still unknown. However, a study showed that ivermectin inhibits the function of SIN3 [16], which is part of a complex that positively regulates *Nanog* and *Sox2* [13]. According to these observations, ivermectin has shown to reduce the growth of tumorspheres of triple-negative breast cancer [16] and colon cancer [13] cell lines.

Ivermectin can be considered as a multi-targeted drug as it directly or indirectly modulates at least nine targets or pathways [10]. Adding chemotherapy drugs may increase the antitumor actions of ivermectin. A work has shown in myeloid leukemia cells that ivermectin synergizes with daunorubicin and cytarabine [18]. Here we demonstrate a synergy between ivermectin with docetaxel or cyclophosphamide in estrogen receptor-negative breast cancer cells, and with tamoxifen in MCF-7 cells. Of note, while DU145 is minimally inhibited by docetaxel, when used together with ivermectin, a strong synergy is observed. As ivermectin is a multitargeted drug, it is difficult to determine these interacting mechanisms leading to synergy. Inhibition of MDR by ivermectin [11, 31] may underlie the synergy with tamoxifen, which itself is a MDR inhibitor [32], as well as the inhibition of Pak1 as a described mechanism of tamoxifen resistance [33]. MDR inhibition may also participate in synergy with docetaxel and cyclophosphamide [34, 35]. Ivermectin decreases expression of stem-cell like markers and exerts relative selectively upon stem-cell like populations [9]. A potential reduction on the stem cell marker ALDH [36] by ivermectin can be responsible for its synergy with

cyclophosphamide, as this is a key enzyme for its detoxification [37].

In summary, we show that ivermectin, at clinically feasible concentrations, has inhibitory actions mainly in human breast cancer cells, which are related to cell cycle arrest. It also showed a preferential effect on cancer stem cells, and synergized with several chemotherapy drugs. Finally, we showed that ivermectin inhibits the tumor growth in a breast cancer mouse model. Although this work is not mechanistic, it adds preclinical evidence to support the clinical testing of ivermectin as an anti-cancer drug.

Acknowledgements We thank Rocío Morales-Bárceñas for her technical support with the use of the flow cytometer at the National Institute of Oncology (Mexico City, Mexico). This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT) scholarship # 288278, provided to MJ. MJ is a student belonging to the Programa de Ciencias Bioquímicas, and ASC to the Plan de Estudios Combinados en Medicina, both from the UNAM.

Funding This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All animal experiments were approved and conducted under the guidelines of the Bioethical and Scientific committees of the National Institute of Oncology (protocol numbers CEI/1145/17 and 017/016/IBI, respectively), in Mexico City, Mexico.

References

- Omura S, Crump A (2004) The life and times of ivermectin—a success story. *Nat Rev Microbiol* 2(12):984–989. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1048>
- Omura S (2008) Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int J Antimicrob Agents* 31(2):91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.08.023>
- Chabala JC, Mrozik H, Tolman RL, Eskola P, Lusi A, Peterson LH, Woods MF, Fisher MH, Campbell WC, Egerton JR, Ostlund DA (1980) Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J Med Chem* 23(10):1134–1136. <https://doi.org/10.1021/jm00184a014>
- Goa KL, McTavish D, Clissold SP (1991) Ivermectin. A review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in onchocerciasis. *Drugs* 42(4):640–658. <https://doi.org/10.2165/00003495-199142040-00007>
- Kumaraswami V, Ottesen EA, Vijayasekaran V, Devi U, Swaminathan M, Aziz MA, Sarma GR, Prabhakar R, Tripathy SP (1988) Ivermectin for the treatment of *Wuchereria bancrofti* filariasis. Efficacy and adverse reactions. *JAMA* 259(21):3150–3153
- Marti H, Haji HJ, Savioli L, Chwaya HM, Mgeni AF, Ameir JS, Hatz C (1996) A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children. *Am J Trop Med Hyg* 55(5):477–481. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.477>
- Whitworth JA, Morgan D, Maude GH, McNicholas AM, Taylor DW (1991) A field study of the effect of ivermectin on intestinal helminths in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85(2):232–234. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90037-y](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90037-y)
- Wolstenholme AJ (2012) Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem* 287(48):40232–40238. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>
- Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Medina-Franco JL, Saldivar-Gonzalez F, Flores-Torrontegui Y, Juarez M, Diaz-Chavez J, Gonzalez-Fierro A, Duenas-Gonzalez A (2018) Ivermectin as an inhibitor of cancer stem-like cells. *Mol Med Res* 17(2):3397–3403. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8231>
- Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Duenas-Gonzalez A (2018) The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am J Cancer Res* 8(2):317–331
- Didier A, Loor F (1996) The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 7(7):745–751. <https://doi.org/10.1097/00001813-199609000-00005>
- Liu Y, Fang S, Sun Q, Liu B (2016) Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 480(3):415–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.064>
- Melotti A, Mas C, Kuciak M, Lorente-Trigos A, Borges I, Ruiz i Altaba A (2014) The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO Mol Med* 6(10):1263–1278. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404084>
- Hashimoto H, Messerli SM, Sudo T, Maruta H (2009) Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. *Drug Discov Ther* 3(6):243–246
- Dou Q, Chen HN, Wang K, Yuan K, Lei Y, Li K, Lan J, Chen Y, Huang Z, Xie N, Zhang L, Xiang R, Nice EC, Wei Y, Huang C (2016) Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res* 76(15):4457–4469. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2887>
- Kwon YJ, Petrie K, Leibovitch BA, Zeng L, Mezei M, Howell L, Gil V, Christova R, Bansal N, Yang S, Sharma R, Ariztia EV, Frankum J, Brough R, Sbirkov Y, Ashworth A, Lord CJ, Zelen A, Farias E, Zhou MM, Waxman S (2015) Selective Inhibition of SIN3 corepressor with avermectins as a novel therapeutic strategy in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 14(8):1824–1836. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0980-T>
- Yin J, Park G, Lee JE, Choi EY, Park JY, Kim TH, Park N, Jin X, Jung JE, Shin D, Hong JH, Kim H, Yoo H, Lee SH, Kim YJ, Park JB, Kim JH (2015) DEAD-box RNA helicase DDX23 modulates glioma malignancy via elevating miR-21 biogenesis. *Brain* 138(Pt 9):2553–2570. <https://doi.org/10.1093/brain/awv167>
- Sharmeen S, Skrtic M, Sukhai MA, Hurren R, Gronda M, Wang X, Fonseca SB, Sun H, Wood TE, Ward R, Minden MD, Batey RA, Datti A, Wrana J, Kelley SO, Schimmer AD (2010) The antiparasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood* 116(18):3593–3603. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-262675>
- Draganov D, Gopalakrishna-Pillai S, Chen YR, Zuckerman N, Moeller S, Wang C, Ann D, Lee PP (2015) Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Sci Rep* 5:16222. <https://doi.org/10.1038/srep16222>
- Norenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plotz T, Fischer W, Schmalzing G, Schaefer M (2012) Positive allosteric

- modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 167(1):48–66. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01987.x>
21. Guzzo CA, Furtak CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Cline-schmidt CM, Sciberras DG, Hsieh JY, Lasseter KC (2002) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol* 42(10):1122–1133. <https://doi.org/10.1177/009127002401382731>
 22. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50(18):6075–6086
 23. Matthews H, Deakin J, Rajab M, IdrisUsman M, Nirmalan NJ (2017) Investigating antimalarial drug interactions of emetine dihydrochloride hydrate using CalcuSyn-based interactivity calculations. *PLoS ONE* 12(3):e0173303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173303>
 24. Wei Z, Lv S, Wang Y, Sun M, Chi G, Guo J, Song P, Fu X, Zhang S, Li Y (2016) Biological characteristics of side population cells in a self-established human ovarian cancer cell line. *Oncol Lett* 12(1):41–48. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4565>
 25. Koshkin V, Ailles LE, Liu G, Krylov SN (2017) Preservation of the 3D phenotype upon dispersal of cultured cell spheroids into monolayer cultures. *J Cell Biochem* 118(1):154–162. <https://doi.org/10.1002/jcb.25621>
 26. Oda M, Saitoh H, Kobayashi M, Aungst BJ (2004) Beta-cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 280(1–2):95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.05.003>
 27. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22(3):659–661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
 28. Zhang P, Zhang Y, Liu K, Liu B, Xu W, Gao J, Ding L, Tao L (2019) Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. *Cell Prolif* 52(2):e12543. <https://doi.org/10.1111/cpr.12543>
 29. Song D, Liang H, Qu B, Li Y, Liu J, Zhang Y, Li L, Hu L, Zhang X, Gao A (2019) Ivermectin inhibits the growth of glioma cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo. *J Cell Biochem* 120(1):622–633. <https://doi.org/10.1002/jcb.27420>
 30. Baltus GA, Kowalski MP, Tutter AV, Kadam S (2009) A positive regulatory role for the mSin3A-HDAC complex in pluripotency through Nanog and Sox2. *J Biol Chem* 284(11):6998–7006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807670200>
 31. Jiang L, Wang P, Sun YJ, Wu YJ (2019) Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF-kappaB pathway. *J Exp Clin Cancer Res* 38(1):265. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1251-7>
 32. Kirk J, Syed SK, Harris AL, Jarman M, Roufogalis BD, Stratford IJ, Carmichael J (1994) Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pure anti-oestrogens and novel tamoxifen derivatives. *Biochem Pharmacol* 48(2):277–285. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90098-1)
 33. Holm C, Rayala S, Jirstrom K, Stal O, Kumar R, Landberg G (2006) Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 98(10):671–680. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj185>
 34. Jaferian S, Soleymaninejad M, Daraee H (2018) Verapamil (VER) enhances the cytotoxic effects of docetaxel and vinblastine combined therapy against non-small cell lung cancer cell lines. *Drug Res* 68(3):146–152. <https://doi.org/10.1055/s-0043-117895>
 35. Brayboy LM, Oulhen N, Witmyer J, Robins J, Carson S, Wessel GM (2013) Multidrug-resistant transport activity protects oocytes from chemotherapeutic agents and changes during oocyte maturation. *Fertil Steril* 100(5):1428–1435. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.002>
 36. Toledo-Guzman ME, Hernandez MI, Gomez-Gallegos AA, Ortiz-Sanchez E (2019) ALDH as a stem cell marker in solid tumors. *Curr Stem Cell Res Ther* 14(5):375–388. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180810120012>
 37. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA (2009) Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* 6(11):638–647. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Review Article

The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug

Mandy Juarez¹, Alejandro Schcolnik-Cabrera¹, Alfonso Dueñas-Gonzalez²

¹División de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, México; ²Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM/Instituto Nacional de Cancerología, México

Received January 15, 2018; Accepted January 26, 2018; Epub February 1, 2018; Published February 15, 2018

Abstract: Drug repositioning is a highly studied alternative strategy to discover and develop anticancer drugs. This drug development approach identifies new indications for existing compounds. Ivermectin belongs to the group of avermectins (AVM), a series of 16-membered macrocyclic lactone compounds discovered in 1967, and FDA-approved for human use in 1987. It has been used by millions of people around the world exhibiting a wide margin of clinical safety. In this review, we summarize the *in vitro* and *in vivo* evidences demonstrating that ivermectin exerts antitumor effects in different types of cancer. Ivermectin interacts with several targets including the multidrug resistance protein (MDR), the Akt/mTOR and WNT-TCF pathways, the purinergic receptors, PAK-1 protein, certain cancer-related epigenetic deregulators such as SIN3A and SIN3B, RNA helicase, chloride channel receptors and preferentially target cancer stem-cell like population. Importantly, the *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of ivermectin are achieved at concentrations that can be clinically reachable based on the human pharmacokinetic studies done in healthy and parasited patients. Thus, existing information on ivermectin could allow its rapid move into clinical trials for cancer patients.

Keywords: Ivermectin, cancer, drug repurposing

Introduction

The antiparasitic drug ivermectin was initially approved in humans in 1987 to orally treat onchocerciasis, also known as river blindness, caused by the blackfly-transmitted parasite *Onchocerca volvulus* in poor populations around the tropics, mostly in West and Central Africa [1, 2]. In humans, its use has improved the nutrition, general health and well-being of billions of people worldwide since it was first used to treat onchocerciasis. Not only that, but in veterinary medicine, ivermectin is used to treat billions of livestock and pets around the world, helping to boost production of food and leather products, as well as to keep billions of companion animals, particularly dogs and horses, healthy. Nowadays, ivermectin by its own has produced sales greater than US\$1 billion/annum during the past two decades [3] and is annually taken by close to 250 million people [1].

Ivermectin belongs to the group of avermectins (AVM), which is a group of 16-membered mac-

rocyclic lactone compounds discovered in 1967 in the Japanese Kitasato Institute [1, 3] in fermentation broths of actinomycetes cultures with the fungus *Streptomyces avermitilis* [4-6]. AVM family members include, among others, selamectin, abamectin, monoxidectin and ivermectin (**Figure 1**), all of which differ from the antibacterial and antifungal 16-membered macrocyclic lactones by owning a bisoleandroxyloxy substituent at the C13 [3]. Ivermectin is the most commonly employed compound from the AVM group, being a more potent and safer semi-synthetic mixture of the two AVMS 22,23-dihydroavermectin-B_{1a} and dihydroavermectin-B_{1b}, at a reason of 4:1, respectively [1]. Since 1981 ivermectin has been employed for agriculture, veterinary and aquaculture purposes [1], and is recognized as nematocidal, acaricidal and insecticidal [3, 7]. The antiparasitic efficacy of ivermectin is not limited to onchocerciasis, since it is also effective for filarial infections such as those caused by *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, and *Mansonella ozzardi* [7]. It also eradicates gastrointestinal parasites, including

Repositioning ivermectin as anticancer drug

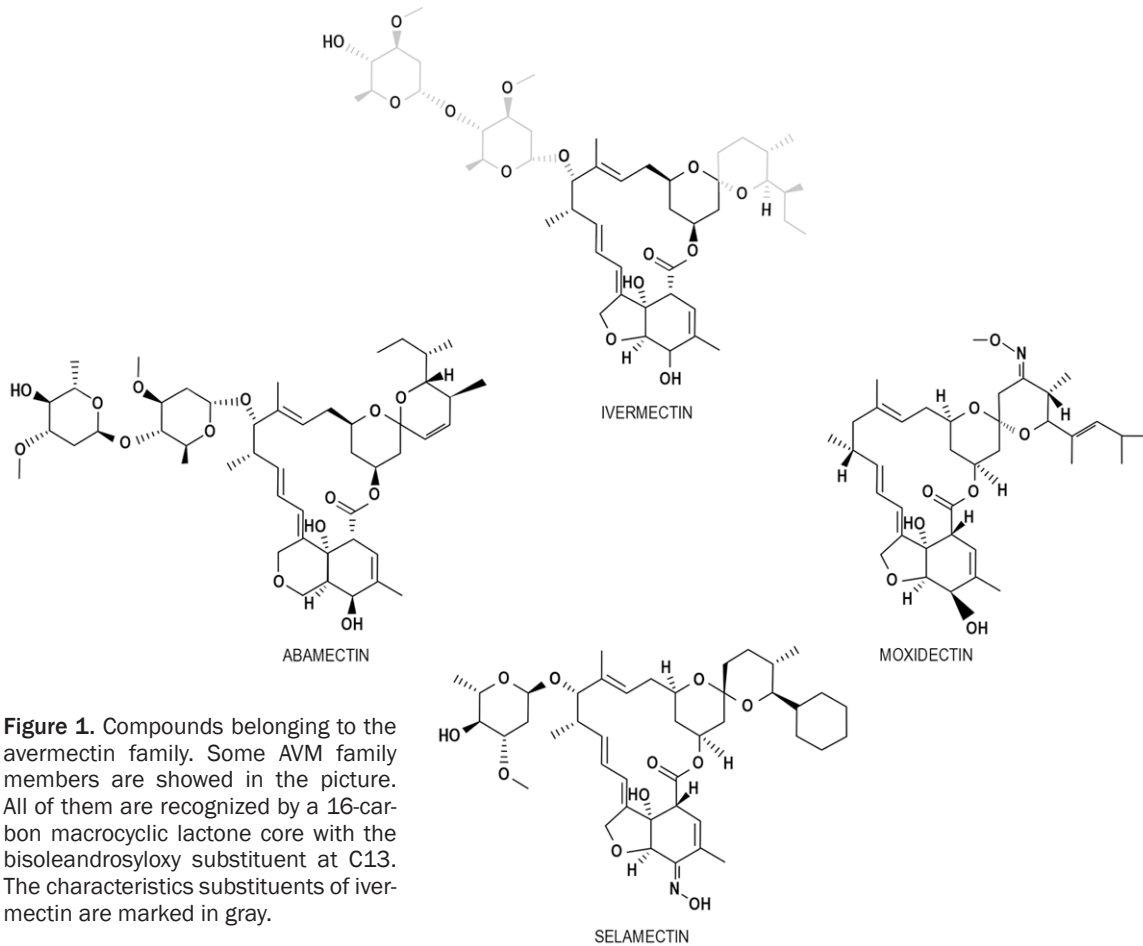


Figure 1. Compounds belonging to the avermectin family. Some AVM family members are showed in the picture. All of them are recognized by a 16-carbon macrocyclic lactone core with the bisoleandroxyloxy substituent at C13. The characteristics substituents of ivermectin are marked in gray.

Ascaris lumbricoides, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiuria*, and *Ancylostoma duodenale* [7]. Besides, it is employed to treat trypanosomiasis, malaria, leishmaniasis, scabies and head lice [1]. In parasites and helminths, ivermectin, as well as the rest of AVMs, increases the activity of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors or glutamate-gated chloride ion channels (Glu-Cl) [3, 4, 6], which blockades the signal between neuron and muscle [3].

In mammals, GABA-sensitive neurons are secured by the blood-brain barrier (BBB) within the central nervous system (CNS), protecting vertebrates against potential harmful effects of AVMs [3, 6]. In support of this statement, subpopulation of collie dogs that have defective function of the multidrug resistance (MDR) protein (commonly a 4 base-pair deletion of the *mdr-1* gene which produces a stop codon), which is an integral part of the BBB and functions as a drug-transport pump in the BBB,

have increased neurotoxicity to ivermectin [8]. On the other hand, invertebrates are dose-dependent susceptible due to the widespread allocation of Glu-Cl channels, in whom ivermectin induces the opening of GABA-regulated Cl⁻ channels that generates an influx of Cl⁻ [1, 7]. The resulting hyperpolarization impedes the phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II by PAK1 [9], promoting paralysis of somatic muscles with concomitant uncoordinated movement, starvation due to inhibition of pharyngeal pumping, and death [1, 3, 5, 7]. Certainly, the affinity of ivermectin for the parasite is 100 times greater than for the mammalian brain, but at least in onchocerciasis, ivermectin action is mostly restricted to the microfilariae stage of *Onchocerca volvulus* [7] as the macrofilariae form does not require pharyngeal pumping to survive [1]. The rate of reduction in microfilarial worms is close to 98% with only two weeks of ivermectin administration, an effect maintained within the next 12 months [1].

Current use and dosage as an antiparasitic drug

In humans, the most used dose of ivermectin for onchocerciasis, strongyloidiasis and enterobiasis ranges between 150 to 200 µg/kg [10-12], while it is used at higher doses of 400 µg/kg for lymphatic filariasis [13]. It is noteworthy the report of a clinical trial on the use of ivermectin for patients with spinal damage and muscle spasms where the drug was administered up to 1.6 mg/kg subcutaneously twice a week for 12 weeks [14].

Toxicity

This compound has a wide margin of safety in ruminants, pigs and equine, as well as in most of the dog breeds [15, 16]. The acute toxicity of ivermectin has been investigated in various species of animals. The signs of toxicity were similar after oral and intraperitoneal administration in rats and mice, and the effects consisted in ataxia, tremors, and reduced activity [17]. In early stages of development, ivermectin at doses of 0.4-0.8 mg/kg in mice, 10 mg/kg in rats, and 3-6 mg/kg in rabbits, increased the incidence of cleft palate, but it was not considered as embryotoxic since the frequency of anomalies was very low [18]. The toxic effects have been related to its interaction with the P-glycoprotein, which limits its access to the CNS. The absence of this protein determines the accumulation of ivermectin in the brain of transgenic mice that do not express it. Finally, in adult Rhesus monkeys that ingested it daily for 16 days at 1.2 mg/kg, no undesirable effects were detected [18].

There are several toxicological reports of ivermectin in different species. The lethal dose 50 (LD50) reported in mice [19] is 25 mg/kg administered orally, whose human equivalent dose (HED) is 2.02 mg/kg. The LD50 increases up to 30 mg/kg when this compound is administered intraperitoneally in mice (HED 2.43 mg/kg). For rats the average lethal dose is 50 mg/kg orally (HED 8.01 mg/kg) and 55 mg/kg intraperitoneally (HED 8.91 mg/kg). In rabbits it is 406 mg/kg in topical application, while in dogs it is 80 mg/kg administered orally (HED 43.24 mg/kg) [20]. Clearly, it seems that the higher the phylogenetic scale the lower toxicity by ivermectin. These data are in accord with the findings in a review paper on avermectins

poisoning (14 on suicidal attempt). In this retrospective review, among 18 patients exposed to abamectin and one to ivermectin, 15 were poisoned by oral ingestion. Four were asymptomatic and 8 had minor symptoms with a mean ingestion of 23 mg/kg (range in 4.2-67 mg/kg). Seven patients manifested severe symptoms, such as coma (seven), aspiration with respiratory failure (four), and hypotension (three), after a mean ingestion of 100.7 mg/kg avermectin (15.4 mg/kg for ivermectin and 114.9 mg/kg for abamectin). All 7 seven patients received intensive supportive care; 1 patient died 18 days later as a result of multiple organ failure [21].

In humans it is considered that ivermectin generates low levels of toxicity because its targets are confined within the CNS. Indeed, most patients treated with ivermectin have no side-effects other than those caused by the immune and inflammatory responses against the parasite, such as fever, pruritus, skin rashes and malaise [7, 22], and when present, they appear within 24-48 h after treatment [23]. Certainly, moderate symptoms such as arthralgia, dizziness, fever, skin edema, dyspnea and hypotension may be more related with the microfilarial load in the patient rather than with the intrinsic toxicity of ivermectin [24]. Reports on cases of encephalopathy in patients co-infected with onchocerciasis and lymphatic filariasis after 48 h of treatment with ivermectin can be found in the literature [25], but it is believed that this adverse reaction is due to the obstruction of the microcirculation of the brain by the accumulation of dead or paralyzed parasites, which leads to brain embolism [26].

In conclusion, the immense number of patients who have been treated with ivermectin shows that it is a safe and a well-tolerated drug. Beyond the side effects attributable to the immunological and inflammatory reaction elicited by dying or death parasites, there are sympathetic signs related to ivermectin intoxication, including tremors, mydriasis, sialorrhea, motor incoordination and coma [27].

Pharmacokinetics

The pharmacokinetics of ivermectin have been widely studied in various mammals, including humans; is a fat-soluble compound, with a distribution volumen of 46.9 L; it has a mean peak

Repositioning ivermectin as anticancer drug

Table 1. Pharmacokinetics of ivermectin in healthy and parasitized subjects

Condition	Doses (mg/kg)	Route	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC (µg/h/mL)
Parasitic infection	0.1-0.2	Oral	52.0	5.2	2.852
Healthy	0.35-0.6	Oral	87.0	4.2	1.444
Healthy	0.7-1.1	Oral	165.2	3.6	2.099
Healthy	1.4-2.0	Oral	247.8	4.2	4.547

plasma level of ~4 h after oral administration with a second peak at 6-12 h because of enterohepatic recycling [1], and possesses an oral clearance of 1.2 L/h [7]. With a plasma protein binding of 93% [7], this drug experiences low biotransformation within the organism [4-6]. The maximum concentration in plasma is reached 4-5 h after its oral administration; its half-life is approximately 19 h and is metabolized in the liver by the cytochrome CYP1A and CYP3A4 complexes, generating 10 metabolites, mostly demethylated and hydroxylated. Its excretion is mainly by feces and only 1% is excreted in the urine [28]. **Table 1** shows the pharmacokinetic data of ivermectin in humans infected with parasites, as well as in healthy humans treated with various doses of ivermectin [28, 29]. According with **Table 1**, the molar concentrations achieved taking into account the total exposure of the drug measured by the area under the curve (systemic exposure) in healthy individuals or patients treated for parasitic diseases are:

3.25 µM/h in parasitized patients with a dose of 0.1-0.2 mg/kg, 1.64 µM in healthy subjects with a dose of 0.35-0.6 mg/kg, 2.4 µM/h in healthy subjects with a dose of 0.7-1.1 mg/kg, and 5.2 µM/h in healthy subjects with a dose of 2 mg/kg.

Drug repurposing in cancer

Drug repurposing, drug redirecting or drug reprofiling is defined as the identification of novel usages for existing drugs. Both development risks and costs, as well as safety-related failure, are reduced with this approach because such drugs have well-known formulation development, *in vitro* and *in vivo* screening, as well as pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. Also, the first clinical phases of many drugs had been completed and can be bypassed to reduce several years of develop-

ment. Therefore, drug repurposing has the potential to reduce the whole process up to 3-12 years, and consequently, the potential recycle of compounds towards a new indication is an attractive opportunity for patients on need [30]. The relevance of drug repositioning in research is demonstrated with the fact that since the first

publication of the subject back to 2004, there are more than 500 papers about it until 2013, at least in PubMed [31]. However, the majority of repositioned agents were discovered before starting with systematic efforts on 2006 to identify drugs with potential additional use, suggesting a serendipitous detection [30, 32, 33]. Currently, other ways to identify compounds with repositioning potential are informed insights and platforms established to identify *in silico* repositioning opportunities [32, 34]. Furthermore, with the recently assembly of the Drug Repurposing Hub, an online repurposing library that systematically classifies a collection of clinically tested compounds from existing databases, now it is possible to easily search and view drugs according to their clinical status, drug indications, or mechanism of action, allowing to rapidly find agents for further evaluation [35].

Important efforts have been made for drug repositioning in cancer. Pantziarka *et al.* have recently summarized on this topic. They report at least 235 non-cancer drugs with proven anti-tumor activity either *in vitro* or *in vivo*, and among these, 67 (29%) are in the World Health Organization (WHO) list of essential medicines, and 176 (75%) are off-patent [36]. 133 (57%) had human data in cancer patients [36]. Four were listed in clinical guidelines, namely thalidomide, all-trans retinoic acid, zoledronic acid and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) [36]. Of note, at least 3 drugs have shown a survival benefit in randomized trials: cimetidine (colorectal cancer), progesterone (breast cancer) and itraconazole (lung cancer) [36]. Few examples of drug-target networks analyses show that both simvastatin and ketoconazole are anti-proliferative compounds in breast cancer [32], while gene expression profiles suggest that topiramate can be used to treat small-cell lung cancer and that sirolimus can be useful for glucocorticoid-resistant acute

Repositioning ivermectin as anticancer drug

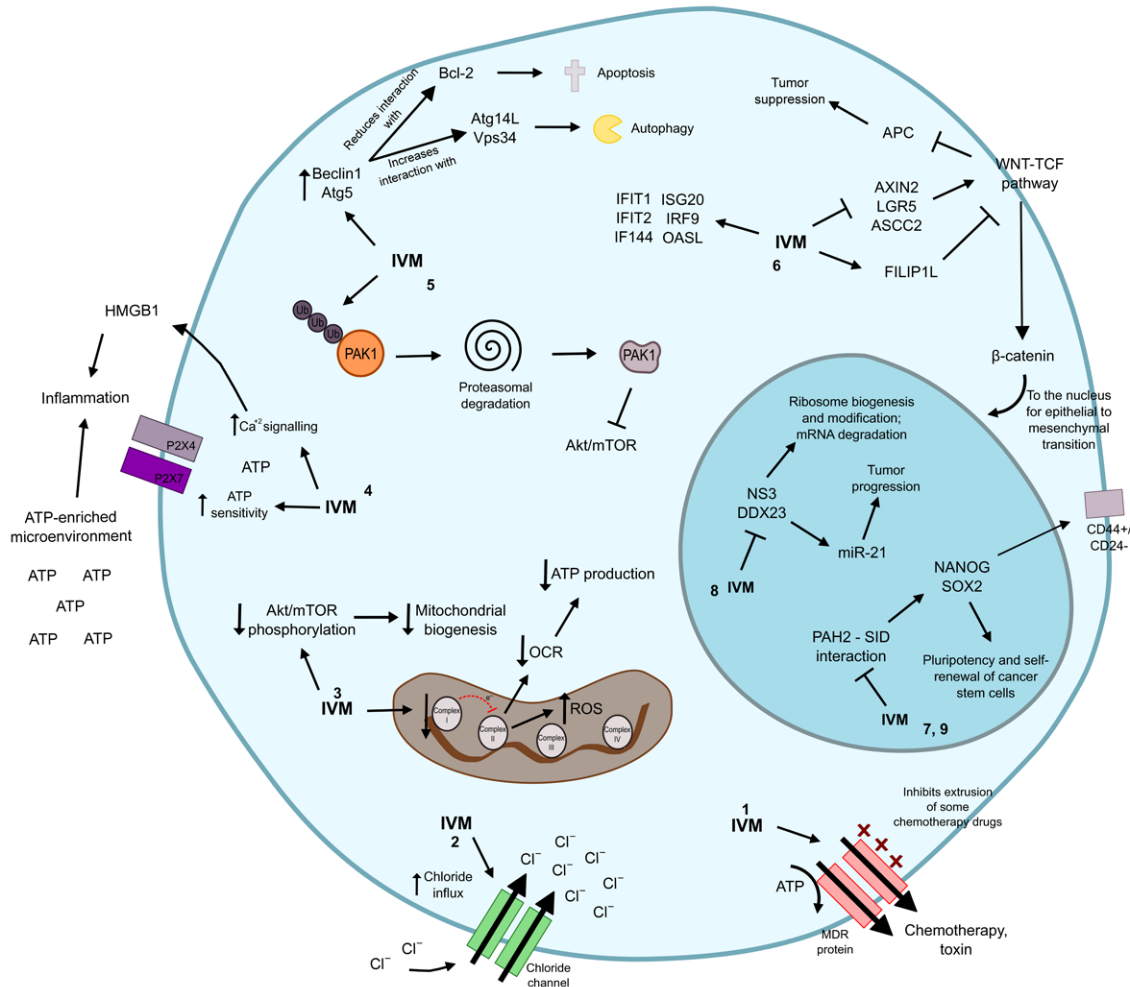


Figure 2. Antitumor mechanisms of ivermectin. 1. Ivermectin inhibits the P-glycoprotein pump, that induces a multidrug phenotype in the cancer cell. 2. Ivermectin acts as an ionophore and up-regulates chloride channels to generate apoptosis and osmotic cell death. 3. By decreasing the function of the mitochondrial complex I, ivermectin limits the electronic movement in the oxidative phosphorylation pathway that stimulates oxygen consumption rate to generate ATP for the cell. Concomitantly there is a reduction in the phosphorylation levels of Akt, impacting in the mitochondrial biogenesis process. Furthermore, alterations in the mitochondrial machinery are related with increased levels of reactive oxygen species that damage DNA. 4. Ivermectin induces ICD through the stimulation of an ATP- and HMGB1-enriched microenvironment, which promotes inflammation. This drug also increases ATP sensitivity and calcium signals in P2X membranal receptors, particularly P2X4 and P2X7, to induce ATP-dependent immune responses. 5. Ivermectin promotes the poly-ubiquitination of the kinase PAK1, which directs it to degradation in the proteasome. Defective PAK1, in turn, inhibits the Akt/mTOR pathway. At the same time, ivermectin stimulates the expression of Beclin1 and Atg5, both related with induction of autophagy and reduces the function of the negative regulator of apoptosis Bcl-2. Together, this generates autophagy and apoptosis. 6. Ivermectin represses AXIN2, LGR5 and ASCL2, all of them positive regulators of WNT-TCF while promotes the repressor of the WNT signaling FILIP1L. Concomitantly, ivermectin promotes the expression of several IFN-related genes, such as *IFIT1*, *IFIT2*, *IF144*, *ISG20*, *IRF9* and *OASL*. 7. Ivermectin modifies the epigenetic signature and the self-renewal activity in the malignant cell due to its ability to mimic the SIN3-interaction that binds to the PAH2 motif of the cancer-associated deregulators SIN3A and SIN3B. SIN3A naturally induces NANOG and SOX2, which are stimulants of stem cell pluripotency. 8. Ivermectin limits the function of the RNA helicases NS3 and DDX23, both of which are related with ribosome biogenesis and post-transcriptional modifications, as well as with mRNA degradation. DDX23 acts as a promoter of miR-21, which is a well-recognized stimulator of tumor progression. 9. Ivermectin inhibits preferentially the CSC population and up-regulates pluripotency and self-renewal genes NANOG, SOX2 and OCT4. IVM: ivermectin; ATP: adenosine triphosphate; OCR: oxygen consumption rate; ROS: reactive oxygen species.

lymphocytic leukemia [35]. On the other hand, drugs that were first formulated to treat cancer

might also be useful to treat non-malignant diseases. That is the case of inhibitors of histone

Repositioning ivermectin as anticancer drug

Table 2. Summary of the antitumor targets of ivermectin

Target	Effect	References
MDR protein	Inhibition	[39]
Chloride channel	Increase of activity	[44]
Akt/mTOR pathway	Inhibition	[47]
P2X7/P2X7 receptors	Activation	[50, 51]
PAK1 protein	Inhibition	[9, 54]
WNT-TCF pathway	Inhibition	[57, 58]
SIN3 domain	Inhibition	[59]
NS3 DDX23 helicase	Inhibition	[64]
<i>Nanog/Sox2/Oct4</i> genes	Downregulation	[67]

deacetylase enzymes that are approved for T-cell lymphoma, but are prospective targets for malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis [37].

Molecular mechanisms of the antitumor effects of ivermectin

Despite the relatively short time on which ivermectin has been investigated as a drug for cancer repositioning, a number of molecular mechanisms of action have been discovered (**Figure 2** and **Table 2**). Among these are the following:

Ivermectin as an inhibitor of the multi-drug resistance (MDR) phenotype

The first reports on the potential antitumor activity of ivermectin appeared almost 20 years ago, and these were somehow linked with the recently discovered basis for the MDR phenotype at that time. Gros P *et al.* in 1986 reported the isolation of DNA clones complementary to the cellular messenger RNA transcripts of *MDR* genes, and showed that high-level expression of a full-length complementary DNA clone in an otherwise drug-sensitive cell confers a complete MDR phenotype [38]. Later on, Didier and Loo proved by a short-term assay the P-glycoprotein function inhibition, which measures the restoration of the retention of two P-glycoprotein probes in MDR cells to their parental cells, concluding that ivermectin is also a substrate and an inhibitor of P-glycoprotein [39]. Though not named as ivermectin, avermectin IB1 showed the ability to reduce tumor growth *in vivo* by 50% at day 5 at dose of 1 mg/kg (HED 81 µg/kg) in SHK male mice bearing a solid Ehrlich carcinoma. In addition, at the same dose it inhibits the growth of the carcinoma cell line 755 (C57/BL6 male mice),

and the tumor growth inhibition value reached a maximum when avermectin B1 was injected on day 3 after tumor inoculation. Based on the fact that ivermectin inhibits multidrug resistance in tumors, avermectin IB1 was tested with vincristine in the Ehrlich carcinoma, with results indicating that the antitumor effect of vincristine is greatly increased when avermectin 1B1 is administered after vincristine [40]. No further studies have exploited the anti-MDR effect of ivermectin. Nevertheless, the search for novel strategies and/or schedule optimization of MDR inhibitors continues [41], which suggests that there is still room for investigating ivermectin roles in reversing or preventing the development of the MDR phenotype.

Ivermectin as an ionophore drug

The term 'ionophore' was first used in 1967 in reference of the ability of organic molecules to bind metal cations and to form lipid soluble complexes that facilitate their transport across cellular membranes. Thus, ionophores can diffuse back and forth between the extracellular and intracellular spaces, or may remain in the plasma membrane as their transport metal ions between intracellular and extracellular spaces [42]. Ionophore antibiotics act by generating pores in biological membranes that dramatically alter the ionic household of cells. Salinomycin is an example of an ionophore antibiotic which generates ion channel-like structures that exhibit strong selectivity for K⁺, but other monovalent cations are also conducted (e.g., Na⁺ and H⁺) [43]. Traditionally, the cell-killing activity of ionophore antibiotics is thought to originate from profoundly deregulating osmosis, as well as from direct cytotoxic effects of the altered biochemical landscape. It is known that malignant cells tend to upregulate chloride channels, which potentially could mark them as more sensitive to alterations in chloride flux, and that an unbalance in intracellular chloride concentrations affects intracellular Ca²⁺ levels, as well as pH and cell volume, which can lead to apoptosis in the affected cell [44].

In line with these statements, in a screen of a small chemical library of antibiotics and metabolic regulators to identify anti-leukemia compounds, Sharmeen *et al.* found that ivermectin

induces cell death at low micromolar concentrations (IC₅₀ of 10 µM) in HL60, KG1a, and OCI-AML2 acute myeloid leukemia cell lines, as well as in primary patient samples. Cell death was caspase-dependent and interestingly, normal hematopoietic cells were much less sensitive to ivermectin as it did not induce apoptosis at concentrations up to 20 µM. Similar effects were seen when leukemia and normal cells were tested for clonogenicity. They also showed that increased chloride influx correlated with cell death and changes in both cell size and cell hyperpolarization, as these effects were much more marked in sensitive leukemia cells as compared to normal cells. Interestingly, there was a synergistic or additive interaction in OCI-AML2 and U937, but not in normal cells, when they treated with ivermectin plus cytarabine or daunorubicin [44].

Ivermectin as an inductor of mitochondrial dysfunction and oxidative damage

On the basis that anthelmintics or antibiotics may target mitochondria in mammalian cells [45, 46], ivermectin was tested in glioblastoma cell lines to identify whether its antitumor effect occurs via inhibition of mitochondrial biogenesis or function. As expected, ivermectin inhibits in a dose-dependent manner the basal and maximum oxygen consumption rate (OCR), most likely by decreasing the enzyme activity of respiratory complex I but not II, IV or V, and consistent with that, both the membrane potential and electrochemical proton gradient decrease while a significant increase in mitochondrial superoxide and decreased ATP are observed. Furthermore, by establishing a subline of the U87 cell line deficient in mitochondrial respiration it was proved that under these conditions ivermectin was unable to induce cell death, as well as when these cells were co-treated with the antioxidants alfa-tocopherol or mannitol. These effects were tracked down by studying the Akt/mTOR pathway, which at least in part controls mitochondria biogenesis and function. Results showed that ivermectin decreases phosphorylation of Akt (S473), mTOR (S2481) and the ribosomal S6 protein (rS6) in U87, T98G and HBMEC cells, indicating that ivermectin inhibits the Akt/mTOR pathway [47]. The effect of ivermectin upon mitochondria and oxidative damage has been recently corroborated in a study on renal cancer cell lines,

where it was demonstrated that renal cancer cells do have higher mitochondrial mass and basal and maximal OCR [48]. As in the Liu *et al.* study, ivermectin in this model also decreased mitochondrial membrane potential as well as basal and maximal respiratory capacities. Of note, ivermectin significantly increased intracellular ROS and 8-OHdG levels, suggesting that the antitumoral effects of ivermectin are related to oxidative stress and DNA damage. This was confirmed by the abolition of the inhibitory effect of ivermectin in these renal cancer cell lines when co-treated with acetyl-L-carnitine (ALCAR) or N-acetyl-L-cysteine (NAC), a stimulant of mitochondrial biogenesis and an antioxidant, respectively [48].

Ivermectin as an inductor of immunogenic cell death (ICD)

Immunogenic cell death (ICD) is characterized by the presence of damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as the membranal exposure of calreticulin and the release of both ATP and high-mobility group box 1 (HMGB1) into the extracellular space, which are then recognized by immune cells to elicit antineoplastic activities [49]. Exogenous ATP regulates defense through P1, P2X and P2Y purinergic receptors [50]. However, recently P2X7 overexpression has been correlated with promotion of both tumor growth and metastases [50]. Although within the tumor microenvironment ATPases such CD39 and CD73 degrade ATP to its immunosuppressive form, adenosine, ivermectin can surpass their effect by a potent induction of both HMGB1 and ATP extrusion which, in turn, induces inflammation [50]. Certainly, it has been reported in triple-negative breast cancer cells (TNBC) that ivermectin allosterically potentiates P2X4/P2X7- and caspase-1-mediated ICD due to the stimulation of an ATP-enriched tumor microenvironment, disrupting the balance between the survival and cytotoxic roles of purinergic signaling in malignant cells, which also induces autophagy [50]. One additional work done with human monocyte-derived macrophages corroborated the ivermectin association with P2X4 and P2X7 receptors. Such research demonstrated that ivermectin increases ATP sensitivity and delays current deactivation after ATP wash-out in P2X4 receptors, which together with the augmentation of ATP-induced currents and Ca²⁺

signals in P2X7 receptors, suggests that ivermectin may stimulate ATP-dependent immune responses [51]. Altogether, literature indicates that ivermectin could promote and potentiate ICD at the tumor microenvironment.

Ivermectin as an inductor of autophagy

Autophagy, a self-degradative catabolic pathway is characterized by formation of double-membrane autophagosomes, which sequester excess or defective organelles and fuse with lysosomes for degradation of enclosed materials in the lysosome to mobilize energy and nutrients under certain cellular stimuli such as starvation, developmental transitions, hypoxia and/or oxidative stress [52, 53]. Ivermectin in ovarian and glioblastoma cancer cell lines promotes ubiquitination-mediated degradation of the oncogenic kinase PAK1 [1, 47], a key protein in cytoskeletal reorganization and nuclear signaling for tumor growing in more than 70% of all human cancers [1]. PAK1 downregulation in turn blockades the repressor of autophagy Akt/mTOR as evidenced by decreased phosphorylation of Akt, mTOR, p70S6K and 4EBP1 via direct interaction of PAK1 with Akt [54]. In fact, one work with multiple breast cancer cell lines treated with ivermectin showed its autophagy-promoter role by the formation of acidic vesicular organelles, with double-membraned autophagosomes by transmission electronic microscopy, and with the promotion of the expression levels of the autophagy-related proteins Beclin 1 and Atg5 in a dose-dependent fashion. Ivermectin, in turn, increases the interaction of Beclin 1 with positive regulators of autophagy, specifically Atg14L and Vps34, while diminishes its interaction with negative regulators such as Bcl-2 [54]. All together it is demonstrated that the ivermectin autophagic effects in this model results from inhibition of the PAK1/Akt/mTOR pathway.

Ivermectin as an inhibitor of the WNT-TCF pathway

The antiproliferative function of ivermectin has been widely documented. A study aimed to find out drug candidates for repositioning with the ability to block the WNT-TCF signaling, which inactivates the tumor suppressor APC in several sporadic human cancers and stimulates the constitutive activation and translocation into the nucleus of β -catenin during neoplastic

transformation [55, 56], revealed that ivermectin at low micromolar concentrations performs anti-WNT-TCF response in cancer cells [57]. The authors showed the efficacy of ivermectin to inhibit BrdU incorporation in colon cancer, glioblastoma and melanoma cell lines, indicating repression in cell proliferation [57]. Besides, they demonstrated upregulation of activated caspase 3 and repression of the positive WNT-TCF targets *AXIN2*, *LGR5*, and *ASCL2* in DLD1 and Ls174T colon cancer cells [57], opening the possibility to use ivermectin to block WNT-TCF-dependent cancers, such as those from breast, skin, lung and intestine [1, 57]. Moreover, after investigating the ivermectin anti-clonogenic activity by analyzing spheroid formation, they showed that pre-treatment of such cell lines with ivermectin diminishes clonal floating spheroids by up to 73%, which together with the repression of the positive cell cycle regulator cyclin D1, suggests a limiting cancer stem cell formation driven by ivermectin [57]. In fact, ivermectin role as an WNT-TCF inhibitor led to use it as a positive control of such pathway in one research that screened a library of plant and microorganism natural compounds, which confirmed ivermectin suppressor activity by transcriptomic analysis that showed an upregulation of the repressor of WNT signaling *FILIP1L* up to 10-fold by the use of this compound [58]. Such study also revealed the increase of the interferon-responsive genes *ISG20*, *IFIT1*, *OASL*, *IRF9*, *IF144*, and *IFIT2*, in colon cancer cells [58]. Interestingly, it has been suggested the employment of interferon to inhibit WNT-TCF pathway [58].

Ivermectin as an epigenetic modulator

Other recognized field of action of ivermectin in cancer involves epigenetic regulation. One work done with the breast cancer cell line MDA-MB-231 reported the functional effect of ivermectin after an *in silico* screen of 2,000 FDA-approved small molecule drugs. The authors evaluated the ability of ivermectin to mimic the SIN3-interaction domain (SID), which naturally binds to the PAH2 motif belonging to the breast cancer-related epigenetic deregulators SIN3A and SIN3B [59]. By nuclear magnetic resonance they demonstrated that ivermectin indeed blocks the PAH2-SID interaction [59]. Furthermore, since SIN3A is part of a complex that positively regulates the stem cell and self-

Repositioning ivermectin as anticancer drug

Table 3. Antitumor effects of ivermectin *in vitro*

Tumor type	Cell lines	[μ M]	Effects	Reference
Human leukemia	OCI-AML2	5,	Induces cell death through upregulation of ROS.	[44]
	HL60	10,		
	U937	15,		
	K61a	20		
Prostate cancer	DU145			
	PPC-1			
Human glioblastoma	U87	1,	Induces growth inhibition, apoptosis and anti-angiogenesis.	[47]
	T98G	5,		
		10		
Ovarian cancer	TYK-nu	0.1,	Inhibition of cell proliferation.	[9]
	KOC7C	1,		
	SKOV3	10,		
	RMUG-S	100		
	HEI-193			
Breast cancer	MDA-MB-435,	5,	Stimulates autophagy and inhibition of cell proliferation.	[54]
	MDA-MB-231	10,		
	MDA-MB-468	15,		
	MDA-MB-361	20		
	MCF-7			
	HS578T			
Murine breast cancer	4T1.2	1,	Induces apoptosis and necrosis. Induces autophagy.	[50]
	DDHer2	4,		
		8,		
Murine melanoma	C57BL/6	16	Inhibition of cell proliferation and clonogenic capacity.	
Murine colon adenocarcinoma	CT.26		Increases the amount of ROS.	
Human breast cancer	MDA-MB-231			
	MCF7			
	SKBR3			
Human melanoma	A2058			
	A375			
Human pancreatic cancer	PANC1			
	MiaPaca2			
Human prostate cancer	DU145			
Human head and neck cancer	A253			
Human leukemia	MV411			
Human colon cancer	CC14	0.1,	Inhibits cell proliferation and induces apoptosis.	[57]
	CC36	1,		
	Ls174T	5,		
	HT29	10		
Human glioblastoma	DLD1			
	U251			
Human melanoma	SKMe12			
Murine breast cancer	4T1	0.01,	Inhibition of invasiveness and restoration of tamoxifen sensitivity.	[59]
	MMTV-Myc	0.1,		

Repositioning ivermectin as anticancer drug

Human breast cancer	MDA-MB-231 D3H2LN	1	Inhibition of cell growth and metastases.	
Human breast cancer	MDA-MB-231	0.2, 0.4, 0.8, 1, 5, 8	Preferentially inhibits cell viability and clonogenicity of the stem cell population.	[67]

renewal markers *NANOG* and *SOX2*, the authors analyzed the role of ivermectin to inhibit such genes and proved that in D3H2LN cells at doses of 0.5 μM it reduces *NANOG* and *SOX2* gene expression by 80%, with a decrease between 90-100% in clonogenic tumorsphere growth [59].

Ivermectin as a helicase inhibitor

RNA helicases represent a large family of proteins implicated in many biological processes, including ribosome biogenesis, splicing, translation and mRNA degradation [60]. Members of the DEAD-box family of RNA helicases play important roles in various aspects of RNA processing, including transcription, spliceosome biogenesis, ribosome biogenesis, splicing, nucleocytoplasmic transport, translation and decay [61, 62]. These family members share a conserved core that includes the amino acid sequence D-E-A-D (aspartate-glutamate-alanine-aspartate). They use energy received from ATP hydrolysis to unwind double-stranded RNA, generally act as components of multi-protein complexes, and have diverse functions that depend on their interacting partners. Several DEAD-box RNA helicases are aberrantly expressed in various types of cancer, where they may play important roles in cancer development and/or progression [61, 62]. In 2012, Mastrangelo *et al.* uncovered that ivermectin was an effective inhibitor of the NS3 helicase activity from the Kunjin virus (an Australian variant of the yellow fever virus) by an *in silico* test, and confirmed it by *in vitro* helicase enzymatic assays [63]. On the other hand, a recent study in glioma cell lines has found that the RNA helicase DDX23 regulates the oncogenic miR-21 biogenesis at post-transcriptional level [64], and it is over-expressed in glioma tissues as compared to normal brain, which is associated with poor survival of glioma patients. After the authors assayed a number of drugs known to

inhibit viral helicases, they found that ivermectin inhibits the DDX23-mediated potentiation of pri-miR-21 processing that, in turn, decreases the levels of both precursor and mature miR-21, a well-recognized poor prognostic upregulated marker in cancer [65]. The treatment with ivermectin in glioma cell lines both *in vitro* and *in vivo* was able to induce antitumoral effects, which suggests that the antihelicase role of ivermectin can be considered as another mechanism of its anticancer effect.

Ivermectin as a stem-cell cancer inhibitor

In 2009, Gupta *et al.* performed a high-throughput screening to discover selective inhibitors of cancer stem cells (CSCs), and found that salinomycin reduces the proportion of CSCs by >100-fold relative to paclitaxel. Besides, they showed that salinomycin inhibits mammary tumor growth *in vivo*, and that it induces increased epithelial differentiation of tumor cells accompanied by the loss of expression of breast CSC genes [66]. As salinomycin is an antiparasitic drug for veterinary use only, our group searched similar compounds for human use that could also act as selective inhibitors of CSCs. Our results showed that ivermectin has high similarity with salinomycin (similarity of 0.78), and therefore we hypothesized that the antiparasitic drug ivermectin could also have similar biological properties as salinomycin [67]. The results of this study showed that ivermectin has growth inhibitory effects upon MDA-MB-231 cells in the range of 0.2-8 μM , and as predicted, ivermectin preferentially inhibits the viability of CSCs-enriched populations (CD44⁺/CD24⁻) and cells growing in spheroids, as compared to bulk cell population. The opposite pattern was observed with paclitaxel where the non-CSCs (CD44⁺/CD24⁺) were sensitive to paclitaxel at nanomolar concentrations, while the inhibition of the stem cell subpopulation was only observed at higher drug

Repositioning ivermectin as anticancer drug

Table 4. Antitumor effects of ivermectin in vivo

Tumor type	Tumor cell line	Days of treat.	Dose mg/kg	Mice	Effects of Ivermectin	Ref.
Murine leukemia	MDAY-D2	10	3, 5, 6 i.p.	NOD/SCID mice	Reduces tumor volume up to 70% in all models	[44]
Human leukemia	K562 OCI-AML2		3 oral			
Human glioblastoma	U87 T98G	21	40 i.p.	SCID mice	Reduces tumor volume up to 50%	[47]
Breast cancer	MDA-MB-231-GFP	10	2.4 i.p.	NOD/SCID mice	Reduces tumor volume up to 60%	[54]
Human glioma	U87MG	42	3, 10 i.t.	Balb/c nude mice	Reduces tumor volume up to 50% at 3 mg/kg. At 10 mg/kg tumors were not detectable	[64]
Human colon cancer	LDL1 CC14 HT29	21	10 i.p.	NMRI nude mice	Reduces tumor volume up to 85% (LDL1 cell line). No effect is observed in the tumor TCF-independent cell line (CC14)	[57]

i.t.: intratumoral. i.p.: intraperitoneal.

concentrations. According with this, ivermectin reduces the expression of maintenance of the pluripotency and self-renewal markers Nanog, Oct4 and Sox2 at both mRNA and protein levels [67]. A summary of the molecular mechanisms of the antitumor effects of ivermectin are shown in **Table 2** and **Figure 2**.

Antitumor effects of ivermectin, in vitro and in vivo

There are a number of *in vitro* and *in vivo* pre-clinical studies where ivermectin demonstrates its efficacy against a wide range of malignant conditions, including solid and hematological malignancies. In breast cancer, ivermectin has been studied in MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-361, MCF-7, HS578T and SKBR3 cell lines where it demonstrates its ability to inhibit cell proliferation, induction of apoptosis, autophagy and reversion of tamoxifen resistance among other effects [51, 55, 60, 67]. These effects are also reported in cancer cell lines from ovarian, prostate, head and neck, colon, and pancreas, as well as in melanoma [9, 45, 51]. Similar results are also observed in a number of murine cancer cell

lines including breast, melanoma and colon [51, 60]. Two studies in glioblastoma cell lines show that ivermectin not only induces growth arrest and apoptosis, but induces anti-angiogenic effects [48, 58], whereas two more studies extend these observation upon myeloblastic acute leukemia cell lines [41, 51]. Of interest, the median concentration used for the *in vitro* treatment from all studies referred in **Table 3** was 5 μ M (0.01-100 μ M) which is clinically achievable according with the pharmacokinetic data in humans shown in **Table 1**. Regarding the *in vivo* evaluation of ivermectin (**Table 4**), this has been done in immune deficient mice using human acute myeloblastic leukemia, glioblastoma, breast and colon carcinoma, as well as in the murine lymphosarcoma cell line MDAY-D2. These studies show more than a 50% reduction in tumor volumes after ivermectin treatment, which varied from 10 to 42 days of treatment by either oral, intraperitoneal or intratumoral routes (more commonly intraperitoneal). The median dose employed was 5 mg/kg (2.4-40 mg/kg), which is equivalent to 0.40 mg/kg in humans, a dose below to the highest dose safely used in human subjects evaluated so far (2 mg/kg) (**Table 1**). Thus, the

Repositioning ivermectin as anticancer drug

in vitro and *in vivo* results with ivermectin strongly suggest that its antitumor effects in cancer patients can be achieved at feasible doses.

Conclusions

The recognition that drug repositioning is a clever opportunity to accelerate the development of cancer drugs is increasing. So far, at least 235 clinically-approved, non-cancer drugs have proven antitumor activity either *in vitro*, *in vivo*, or even clinically. Among these, ivermectin, an antiparasitic compound of wide use in veterinary and human medicine, is clearly a strong candidate for repositioning, based on the fact that i) it is very safe, causing almost no side-effects other than those caused by the immune and inflammatory responses against the parasite in infected patients, and ii) it has proven antitumor activity in preclinical studies. On the other hand, it is now evident that the use of very selective “unitargeted” drugs is commonly associated to early development of resistance by cancer cells, hence the use of “dirty” or “multitargeted” drugs is important to explore. In this sense, ivermectin has this potential as it modulates several targets such as the multidrug resistance protein (MDR), the Akt/mTOR and WNT-TCF pathways, the purinergic receptors, the PAK-1 protein, certain cancer-related epigenetic deregulators such as SIN3A and SIN3B, RNA helicase activity, while stimulates chloride channel receptors leading to cell hyperpolarization, and down-regulates stemness genes to preferentially target cancer stem-cell like population, at least in breast cancer. Importantly, the *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of ivermectin are achieved at concentrations that can be clinically reachable based on the human pharmacokinetic studies done in healthy and parasited patients. Thus, existing information on ivermectin could allow its rapid move into clinical trials for cancer patients.

Acknowledgements

Mandy Juarez is a student belonging to the Programa de Ciencias Bioquímicas, UNAM. Alejandro Schcolnik-Cabrera is a student belonging to the Plan de Estudios Combinados en Medicina (PECEM), UNAM.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Alfonso Dueñas-Gonzalez, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM/Instituto Nacional de Cancerología, México. E-mail: alfonso_duenas@yahoo.com

References

- [1] Crump A. Ivermectin: enigmatic multifaceted ‘wonder’ drug continues to surprise and exceed expectations. *J Antibiot (Tokyo)* 2017; 70: 495-505.
- [2] Gloeckner C, Garner AL, Mersha F, Oksov Y, Tricoche N, Eubanks LM, Lustigman S, Kaufmann GF, Janda KD. Repositioning of an existing drug for the neglected tropical disease Onchocerciasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 3424-9.
- [3] Bai SH and Ogbourne S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. *Chemosphere* 2016; 154: 204-214.
- [4] Zhang Y, Luo M, Xu W, Yang M, Wang B, Gao J, Li Y, Tao L. Avermectin confers its cytotoxic effects by inducing DNA damage and mitochondria-associated apoptosis. *J Agric Food Chem* 2016; 64: 6895-902.
- [5] Alberich M, Ménez C, Sutra JF, Lespine A. Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes *in vitro* and *in vivo* in mice. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 428-35.
- [6] Zhang Y, Wu J, Xu W, Gao J, Cao H, Yang M, Wang B, Hao Y, Tao L. Cytotoxic effects of Avermectin on human HepG2 cells *in vitro* bioassays. *Environ Pollut* 2017; 220: 1127-1137.
- [7] Ottesen EA and Campbell WC. Ivermectin in human medicine. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34: 195-203.
- [8] Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727-33.
- [9] Hashimoto H, Messerli SM, Sudo T, Maruta H. Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. *Drug Discov Ther* 2009; 3: 243-6.
- [10] Goa KL, McTavish D, Clissold SP. Ivermectin. A review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in onchocerciasis. *Drugs* 1991; 42: 640-58.
- [11] Marti H, Haji HJ, Savioli L, Chwaya HM, Mgeni AF, Ameir JS, Hatz C. A comparative trial of a single-dose ivermectin versus three days of albendazole for treatment of *Strongyloides stercoralis* and other soil-transmitted helminth infections in children. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 477-81.
- [12] Keiser J and Utzinger J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infec-

Repositioning ivermectin as anticancer drug

- tions: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2008; 299: 1937-48.
- [13] Ottesen AR, C.P. Lymphatic filariasis infection and diseases: control strategies. *Parasitology Today* 1995; 11: 129-31.
- [14] Costa JL, Diazgranados JA. Ivermectin for spasticity in spinal-cord injury. *Lancet* 1994; 343: 739.
- [15] McKellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbemycins. *J Vet Pharmacol Ther* 1996; 19: 331-51.
- [16] Burkhart CN. Ivermectin: an assessment of its pharmacology, microbiology and safety. *Vet Hum Toxicol* 2000; 42: 30-5.
- [17] Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, Wise LD, Cartwright ME, Hall SJ, Beare CM. Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 88-94.
- [18] Lankas GR, Minsker DH, Robertson RT. Robertson, effects of ivermectin on reproduction and neonatal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 1989; 27: 523-9.
- [19] Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22: 659-61.
- [20] Wang J. Pharmacology/Toxicology NDA review and evaluation. 2011 20/12/2017]; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drug-satfda_docs/nda/2012/202736Orig1s000-PharmR.pdf.
- [21] Chung K, Yang CC, Wu ML, Deng JF, Tsai WJ. Agricultural avermectins: an uncommon but potentially fatal cause of pesticide poisoning. *Ann Emerg Med* 1999; 34: 51-7.
- [22] Dourmishev AL, Dourmishev LA, Schwartz RA. Ivermectin: pharmacology and application in dermatology. *Int J Dermatol* 2005; 44: 981-8.
- [23] De Sole G, Awadzi K, Remme J, Dadzie KY, Ba O, Giese J, Karam M, Keita FM, Opoku NO. A community trial of ivermectin in the onchocerciasis focus of Asubende, Ghana. II. Adverse reactions. *Trop Med Parasitol* 1989; 40: 375-82.
- [24] De Sole G, Awadzi K, Remme J, Dadzie KY, Ba O, Giese J, Karam M, Keita FM, Opoku NO. Lack of adverse reactions in ivermectin treatment of onchocerciasis. *Lancet* 1990; 335: 1106-7.
- [25] Boussinesq M, Gardon J, Gardon-Wendel N, Chippaux JP. Clinical picture, epidemiology and outcome of Loa-associated serious adverse events related to mass ivermectin treatment of onchocerciasis in Cameroon. *Filaria J* 2003; 2 Suppl 1: S4.
- [26] Boussinesq M, Kamgno J, Pion SD, Gardon J. What are the mechanisms associated with post-ivermectin serious adverse events? *Trends Parasitol* 2006; 22: 244-6.
- [27] Qu J, Li M, Zhao F, Liu C, Zhang Z, Xu S, Li S. Autophagy is upregulated in brain tissues of pigeons exposed to avermectin. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015; 113: 159-68.
- [28] Baraka OZ, Mahmoud BM, Marschke CK, Geary TG, Homeida MM, Williams JF. Ivermectin distribution in the plasma and tissues of patients infected with *Onchocerca volvulus*. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 50: 407-10.
- [29] Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, Sciberras DG, Hsieh JY, Lasseter KC. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. *J Clin Pharmacol* 2002; 42: 1122-33.
- [30] Novac N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol Sci* 2013; 34: 267-72.
- [31] Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, Schutjens MH. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov Today* 2015; 20: 1027-34.
- [32] Lee H, Kang S, Kim W. Drug repositioning for cancer therapy based on large-scale drug-induced transcriptional signatures. *PLoS One* 2016; 11: e0150460.
- [33] Li YY and Jones SJ. Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Med* 2012; 4: 27.
- [34] Ashburn TT and Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 673-83.
- [35] Corsello SM, Bittker JA, Liu Z, Gould J, McCarren P, Hirschman JE, Johnston SE, Vrcic A, Wong B, Khan M, Asiedu J, Narayan R, Mader CC, Subramanian A, Golub TR. The drug repurposing hub: a next-generation drug library and information resource. *Nat Med* 2017; 23: 405-408.
- [36] Pantziarka PS, Meheus L, Sukhatme VP, Bouche G. Repurposing non-cancer drugs in oncology-How many drugs are out there? *bioRxiv* 2017; 197434.
- [37] Andrews KT, Fisher G and Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 95-111.
- [38] Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; 323: 728-31.
- [39] Didier A and Loor F. The abamectin derivative ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 1996; 7: 745-51.
- [40] Drinyaev VA, Mosin VA, Kruglyak EB, Novik TS, Sterlina TS, Ermakova NV, Kublik LN, Levitman MKh, Shaposhnikova VV, Korystov YN. Antitumor effect of avermectins. *Eur J Pharmacol* 2004; 501: 19-23.

Repositioning ivermectin as anticancer drug

- [41] Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q, Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 84559-84571.
- [42] Pressman BC. Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* 1976; 45: 501-30.
- [43] Mitani M, Yamanishi T and Miyazaki Y. Salinomycin: a new monovalent cation ionophore. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66: 1231-6.
- [44] Sharmeen S, Skrtic M, Sukhai MA, Hurren R, Gronda M, Wang X, Fonseca SB, Sun H, Wood TE, Ward R, Minden MD, Batey RA, Datti A, Wrana J, Kelley SO, Schimmer AD. The anti-parasitic agent ivermectin induces chloride-dependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood* 2010; 116: 3593-603.
- [45] Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget* 2015; 6: 4569-84.
- [46] Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, Molina A, Shirihai OS, Collins JJ. Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells. *Sci Transl Med* 2013; 5: 192ra85.
- [47] Liu Y, Fang S, Sun Q, Liu B. Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 480: 415-421.
- [48] Zhu M, Li Y and Zhou Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 492: 373-378.
- [49] Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 97-111.
- [50] Draganov D, Gopalakrishna-Pillai S, Chen YR, Zuckerman N, Moeller S, Wang C, Ann D, Lee PP. Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Sci Rep* 2015; 5: 16222.
- [51] Norenberg W, Sobottka H, Hempel C, Plötz T, Fischer W, Schmalzing G, Schaefer M. Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 48-66.
- [52] Levine B and Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.
- [53] Kaur J and Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16: 461-72.
- [54] Dou Q, Chen HN, Wang K, Yuan K, Lei Y, Li K, Lan J, Chen Y, Huang Z, Xie N, Zhang L, Xiang R, Nice EC, Wei Y, Huang C. Ivermectin induces cytosolic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res* 2016; 76: 4457-69.
- [55] Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-51.
- [56] Zhan T, Rindtorff N and Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 2017; 36: 1461-1473.
- [57] Melotti A, Mas C, Kuciak M, Lorente-Trigos A, Borges I, Ruiz i Altaba A. The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 1263-78.
- [58] Seth C, Mas C, Conod A, Mueller J, Siems K, Kuciak M, Borges I, Ruiz I Altaba A. Long-Lasting WNT-TCF response blocking and epigenetic modifying activities of withanolide f in human cancer cells. *PLoS One* 2016; 11: e0168170.
- [59] Kwon YJ, Petrie K, Leibovitch BA, Zeng L, Mezei M, Howell L, Gil V, Christova R, Bansal N, Yang S, Sharma R, Ariztia EV, Frankum J, Brough R, Sbirkov Y, Ashworth A, Lord CJ, Zelen A, Farias E, Zhou MM, Waxman S. Selective inhibition of SIN3 corepressor with avermectins as a novel therapeutic strategy in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 1824-36.
- [60] Bourgeois CF, Mortreux F and Auboeuf D. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17: 426-38.
- [61] Abdelhaleem M. Over-expression of RNA helicases in cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 3951-3.
- [62] Fuller-Pace FV. DEAD box RNA helicase functions in cancer. *RNA Biol* 2013; 10: 121-32.
- [63] Mastrangelo E, Pezzullo M, De Burghgraeve T, Kaptein S, Pastorino B, Dallmeier K, de Lamballerie X, Neyts J, Hanson AM, Frick DN, Bolognesi M, Milani M. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1884-94.
- [64] Yin J, Park G, Lee JE, Choi EY, Park JY, Kim TH, Park N, Jin X, Jung JE, Shin D, Hong JH, Kim H, Yoo H, Lee SH, Kim YJ, Park JB, Kim JH. DEAD-box RNA helicase DDX23 modulates glioma malignancy via elevating miR-21 biogenesis. *Brain* 2015; 138: 2553-70.
- [65] Kwak HJ, Kim YJ, Chun KR, Woo YM, Park SJ, Jeong JA, Jo SH, Kim TH, Min HS, Chae JS, Choi EJ, Kim G, Shin SH, Gwak HS, Kim SK, Hong EK, Lee GK, Choi KH, Kim JH, Yoo H, Park JB, Lee SH. Downregulation of Spry2 by miR-21

Repositioning ivermectin as anticancer drug

- triggers malignancy in human gliomas. *Oncogene* 2011; 30: 2433-42.
- [66] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009; 138: 645-659.
- [67] Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Medina-Franco JL, Saldivar-Gonzalez F, Flores-Torrontegui Y, Juarez M, Díaz-Chávez J, Gonzalez-Fierro A, Dueñas-González A. Ivermectin as an inhibitor of cancer stem-like cells. *Mol Med Rep* 2018; 17: 3397-3403.