



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Evaluación de narasina e ivermectina como inhibidores de la
viabilidad de células troncales de cáncer de mama**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Ytzel Flores Torrónategui

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Alfonso Dueñas González
[Unidad Periférica, INCAN. Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
[Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM](#)
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
[Unidad Periférica, INCAN. Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas se realizó bajo la dirección del Dr. Alfonso Dueñas González en el Laboratorio de Epigenética y Cáncer en la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología.

El comité Tutorial que asesoro el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes: Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM.

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se reconoce la colaboración como Asesoras Técnicas y Académicas a la Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez y la Dra. Alma Delia Chávez-Blanco en el desarrollo de esta Tesis.

Durante los estudios de maestría tuve una beca otorgada por CONACYT para la realización de esta tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado septiembre de 2019.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Vocal: Dr. José de la Luz Díaz Chávez.

Vocal: Dra. Marcela Lizano Soberón.

Vocal: Dra. Maria Antonieta Chávez González.

Secretario: Dra. Elizabeth Langley McCarrón.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alfonso Dueñas González por haberme abierto las puertas de su laboratorio desde la primera vez que busqué acercarme al mundo de la Investigación Científica. Con esta oportunidad se agregaron a mi vida valiosas experiencias, mucho aprendizaje académico y lo más importante: una familia que cuidó de mí por mucho tiempo y que me hizo sentir como en casa.

Gracias Doctor, Almita, Lupita, Brenda, Jan, Lucy, Caty, Enrique, Bety y Clarita por formar parte de esa familia. A todos y cada uno de ustedes agradezco su enorme paciencia y todo el apoyo brindado tanto en lo académico como en lo personal. Sin duda, todo lo que aprendí con ustedes me ha dado herramientas invaluable para mi vida personal y profesional.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas por la formación académica brindada y la oportunidad de concretar este proyecto.

Gracias a los miembros del comité tutorial y del jurado de examen, por sus observaciones, correcciones y comentarios para realizar el escrito de tesis.

Parte de este proyecto pudo lograrse con el apoyo del Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos, a quien agradezco darme un espacio en su laboratorio cuando fue necesario.

Gracias a Damaris Romero, encargada de la Unidad de Citometría de Flujo del INER, por su soporte en los experimentos de citometría.

Un agradecimiento especial a mi familia: mi mamá Rosita, Tania y Gaby. Por su amor y comprensión; sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

INDICE

1- RESUMEN	6
2- INTRODUCCIÓN	7
3- MARCO TEÓRICO	8
3.1- ¿Qué es el cáncer?	8
3.2- Epidemiología del cáncer	8
3.3- Etiología del cáncer	10
3.4- Células troncales de cáncer	11
3.5- Células troncales de cáncer de mama	14
3.5-1. Formación de mamoesferas	15
3.5-2. Factores de pluripotencialidad asociados a CTC	16
3.5-3. Principales vías de señalización implicadas en CTC.	18
3.5.4. Reposicionamiento terapéutico y búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas hacia CTC.	20
4- JUSTIFICACIÓN.	24
5- HIPOTESIS.	25
6-OBJETIVOS.....	25
6.1- Objetivo general	25
6.2- Objetivos particulares	25
7- MATERIALES Y METODOS	25
7.1- Búsqueda computacional	25
7.2- Fármacos	26
7.3- Cultivo celular	26
7.4- Ensayo de viabilidad celular	26
7.5- Ensayo de clonogenicidad	27
7.6- Cultivo de esferoides.....	27
7.7- Citometría de flujo y Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)	28
7.8-Extracción de RNA y análisis de la expresión	

de los genes OCT-4, NANOG y SOX-2 en Tiempo Real (qPCR).	29
7.9- Extracción y análisis de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT-4 mediante western blot	30
8- Análisis estadístico.	31
9. RESULTADOS	31
9.1- Ivermectina y narasina tienen similitud estructural con salinomicina.	31
9.2- La ivermectina inhibe parcialmente la viabilidad celular y la capacidad clonogénica.	32
9.3- Efectos inhibitorios de la ivermectina y paclitaxel en células MDA-MB-231 enriquecidas en CTC.	34
9.4- La ivermectina reduce la expresión de los genes y los niveles de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT 4, sobre-expresados en células troncales de cáncer de mama.	37
10- DISCUSIÓN	38
11- CONCLUSIONES.....	41
12- BIBLIOGRAFÍA	41

1. RESUMEN

Introducción. Diversos estudios han identificado una subpoblación celular con capacidad de auto-renovación y de dar origen a los linajes heterogéneos de células que comprenden un tumor, siendo responsables del crecimiento y recurrencia de éste, denominada células troncales de cáncer (CTC). Las CTC son resistentes a la quimioterapia y radioterapia convencional actual, sugiriendo que son capaces de sobrevivir y generar nuevos tumores. Un trabajo reciente demostró que salinomicina actúa como un inhibidor específico de la proliferación de CTC de mama, con 100 veces mayor efectividad que paclitaxel, el fármaco de primera elección en este tipo de cáncer. En este trabajo se evaluaron fármacos con analogía estructural a salinomicina y se observó que ivermectina y narasina presentan una alta homología estructural así como también un efecto como inhibidores de CTC de mama. Por lo que resulta interesante dilucidar el mecanismo implicado en esta respuesta biológica. **Metodología.** Previamente a este proyecto, se realizó una búsqueda de fármacos con similitud estructural a salinomicina en el DrugBank, una base de datos de medicamentos. A continuación se evaluó el efecto de los fármacos seleccionados, narasina e ivermectina, sobre la viabilidad celular en cultivos de esferoides y células separadas con el perfil antigénico CD44⁺CD24⁻ de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231, y en la misma línea parental. Se analizó la expresión de los genes *NANOG*, *SOX-2* y *OCT-4*, involucrados en auto-renovación y mantenimiento de células troncales, mediante qPCR en tiempo real así como también los niveles de las proteínas. **Resultados:** La ivermectina y narasina mostraron una similitud estructural con salinomicina, sin embargo, la ivermectina obtuvo un valor más alto de similitud estructural (0.78) en relación a salinomicina. El efecto de los dos fármacos seleccionados sobre la viabilidad celular, demostró que la ivermectina disminuye de manera selectiva la población enriquecida en CTC (CD44⁺CD24⁻ y cultivos en esferoides) en comparación con la línea parental total, así como también una reducción en los niveles de expresión de *NANOG*, *OCT-4* y *SOX-2* y de las proteínas. **Conclusión:** La ivermectina inhibe de manera selectiva las CTC de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y disminuye la expresión de los genes y proteínas involucrados en el mantenimiento de pluripotencialidad y auto-renovación.

2. INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances para tratar de entender los mecanismos moleculares y procesos involucrados en el desarrollo del cáncer, aún existe una brecha entre este conocimiento y la eficacia de los tratamientos para buscar la cura del cáncer. Parte de tal ineficiencia en el tratamiento del cáncer, está originada por la quimio-resistencia inducida o inherente que algunos tumores pueden tener hacia los agentes terapéuticos antitumorales. Existen diferentes mecanismos de quimio-resistencia, como la sobreexpresión de transportadores de membrana o mecanismos de reparación de dañoal DNA inducido por fármacos. La heterogeneidad celular de los tumores, es otra causa de la ineficiencia de los tratamientos antitumorales actuales, ya que estos pueden provocar la selección de las células tumorales resistentes, al sólo eliminar las células susceptibles del tumor. El origen de éstas células quimio-resistentes dentro de un tumor, puede ser resultado de mutaciones genéticas espontáneas o bien podría explicarse mediante la hipótesis de las células troncales del cáncer, en la que se propone que el crecimiento y mantenimiento del tumor está dado por la expansión clonal de una célula con capacidad de auto-renovación que ha adquirido el armamento molecular de una célula troncal de un tejido normal. Es decir que aparte de la capacidad de auto-renovarse, tienen tasas de proliferación más lentas y son resistentes al daño inducido por agentes químicos (Gupta *et al*, 2009).

Si estas células troncales malignas, tienen la capacidad de sobrevivir a los regímenes terapéuticos convencionales, la recurrencia local es casi inevitable y si logran diseminarse a sitios distantes podrían ser responsables de las metástasis incluso muchos años después del tratamiento del tumor primario (Gligorich *et al*. 2013).

Es por esto que el desarrollo de nuevos tratamientos que tienen como blanco eliminar a las células troncales de cáncer, es una estrategia prometedora en la lucha contra el cáncer.

3. MARCO TEÓRICO

3.1- ¿Qué es el cáncer?

Una célula normal tiene la capacidad de poder mantener la homeostasis de un organismo a través de la regulación del ciclo celular, proliferación y de señales extracelulares. Sin embargo, una célula cancerosa contiene alteraciones genéticas y epigenéticas que pueden interrumpir la homeostasis de dicho organismo, y que pueden conferirle una ventaja selectiva sobre el resto de la población celular, permitiéndole crecer y dividirse de manera descontrolada (Alberts, *et al* 2002), proliferando a expensas de las señales de las células vecinas lo que resulta en la invasión hacia otros tejidos (Hanahan & Weinberg, 2011).

3.2- Epidemiología del cáncer

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo y se estima que representó 9.6 millones de muertes en 2018 a nivel mundial (OMS, 2018). Se estima que la carga mundial de cáncer ha aumentado a 18,1 millones de casos nuevos y a 9,6 millones de muertes en 2018. Uno de cada 5 hombres y una de cada 6 mujeres en todo el mundo desarrollan cáncer durante su vida, y uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres muere de la enfermedad (J Ferlay *et al*, 2019). Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general son:

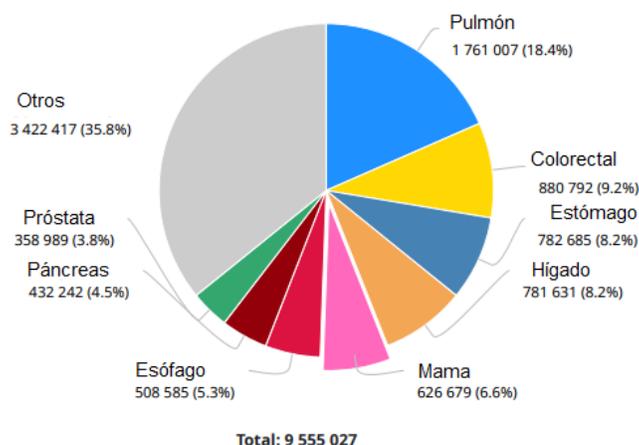


Figura 1. Número de muertes de ambos sexos por diversos tipos de cáncer, a nivel global en 2018. Tomado de GLOBOCAN 2018.

En México, hasta el 2015 el cáncer ocupó la tercera causa de mortalidad en hombres y mujeres (Tabla 1). Durante el periodo de 2011 a 2016, los cinco principales tipos de cáncer que sobresalieron como causa de mortalidad en la población de 30 a 59 años fueron: cérvico uterino y ovario, colorrectal y de estómago, de mama, de pulmón y el de órganos hematopoyéticos (INEGI, 2016).

A nivel mundial, el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia es el de mama y por mucho el más frecuente en mujeres, con un estimado de 11.6% de todos los tipos de cáncer y ocupa el quinto lugar de mortandad por esta causa (GLOBOCAN 2018).

A pesar de que para el cáncer de mama, los rangos en las tasas de mortalidad entre distintas regiones del mundo es menor que los de las tasas de incidencia, debido a que la sobrevida para éste cáncer ha sido más favorable en países desarrollados (GLOBOCAN 2018) por los avances en prevención primaria, detección y terapias, la mortalidad ha permanecido relativamente constante durante las últimas cuatro décadas. Dicho fenómeno es generalmente atribuido a la aparición de metástasis y la resistencia a la quimioterapia, así como la toxicidad que algunos fármacos pueden ocasionar (Gligorich, *et al* 2013).

**Defunciones y su distribución porcentual por causa de fallecimiento.
2015 en México**

Causas de defunción	Porcentaje respecto al total
Total	100
Enfermedades del sistema circulatorio	25.5
Enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas	17.5
Tumores (Neoplasias)	13.0
Causas externas: Agresiones, accidentes.	10.4
Enfermedades del sistema digestivo	9.6
Enfermedades del sistema respiratorio	8.5
Otras causas	15.5

Tabla 1. Principales causas de mortalidad en México (INEGI, 2017).

Tomando en cuenta el problema de salud que representa el cáncer de mama a nivel

mundial, es evidente la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con el objetivo de disminuir los casos de quimio-resistencia y metástasis que contribuyen a la mortandad ocasionada por ésta neoplasia.

3.3- Etiología del cáncer

Un tumor se origina a partir de una célula que inicialmente experimentó algún cambio heredable. La adquisición de alteraciones (genéticas y epigenéticas) que conllevan a la transformación de una célula normal en una célula maligna, es un proceso progresivo. Subsecuentemente, cambios adicionales pueden acumularse en las células hijas de ésta célula tumoral, permitiéndoles crecer y dividirse, evadiendo los mecanismos de control anti-tumoral. Weinberg y Hanahan propusieron seis capacidades biológicas adquiridas durante éste proceso progresivo de transformación maligna, conocidas como las marcas del cáncer e incluyen: mantenimiento de las señales de proliferación, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, inmortalidad, la activación de mecanismos de invasión y metástasis; además, sugirieron la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el sistema inmune. La adquisición y promoción de estas funciones depende en gran parte de la inestabilidad genómica de las células neoplásicas y la inflamación. Ciertos genotipos mutantes y también fenotipos heredables (Modificación de histonas, metilación del DNA) confieren ventajas selectivas que le permiten proliferar a las sub-clonas celulares y generar la diversidad genética que caracteriza a un tumor (Hanahan & Weinberg, 2011).

Considerando el conjunto de alteraciones en las células que conforman a un tumor, este podría considerarse como un órgano anormal en el que podemos encontrar células individuales especializadas que le confieren heterogeneidad celular (Reya T. *et al*, 2001). En los últimos años, se ha acumulado evidencia que señala la existencia de una nueva dimensión de heterogeneidad intra-tumoral y de una subclase de células neoplásicas dentro de los tumores, denominadas las células troncales de cáncer (CTC) (Hanahan & Weinberg, 2011).

3.4- Células troncales de cáncer

Diversos estudios han identificado una subpoblación celular con la capacidad de auto-renovación y de diferenciarse en los linajes heterogéneos de células que comprenden un tumor, siendo así responsables del crecimiento y recurrencia de éste, denominada células troncales de cáncer (CTC) (Al-Hajj *et al* 2003, Lapidot *et al* 1994, Li *et al* 2008).

La primer evidencia de la existencia de las CTC, surgió de estudios en donde se demostró que una subpoblación de blastos de leucemia con el fenotipo antigénico CD34+CD38- aislados de la médula ósea y sangre periférica de humanos con leucemia mieloide aguda (LMA) era capaz de inducir LMA en ratones inmunocomprometidos NOD/SCID, definiéndose así como células troncales de LMA (Lapidot *et al* 1994).

Las CTC son definidas por su habilidad para inducir tumores en modelos de xenotrasplantes, mediante diluciones seriales *in vivo* y su inoculación en ratones receptores (Cho y Clarke, 2008; Lobo *et al.*, 2007). Esta definición a menudo se complementa con la expresión de marcadores de superficie que también se expresan en las células troncales normales en el tejido de origen (Al-Hajj *et al*, 2003), además de la capacidad para formar esferoides en cultivos en suspensión (Gupta *et al* 2009).

Estos hallazgos han marcado la pauta para formular la hipótesis de que los tumores están organizados con una jerarquía celular similar a la de un tejido normal, encontrando en la cima de dicha jerarquía a las CTC, cuyo papel es el mantenimiento del tumor (Reya T. *et al*, 2001). Entre las propiedades que han sido demostradas tanto *in vivo* como *in vitro*, por parte de esta subpoblación y que han conducido a la comparación con su contraparte normal, se incluyen la capacidad de auto-renovación, la alta capacidad de reparación de daños al DNA, la habilidad de generar una progenie a través de división asimétrica, un potencial proliferativo ilimitado y replicación lenta o infrecuente. Sin embargo, a diferencia de una célula troncal normal, el programa de auto-renovación y diferenciación de una CTC, es irregular y anormal (Wicha *et al*, 2006).

Pese a que la teoría de las células troncales del cáncer fue propuesta hace más de 40 años, no se ha logrado definir cuál es el mecanismo exacto mediante el cual una célula

puede adquirir las cualidades arriba mencionadas, pero es importante destacar que no necesariamente se ha establecido que estas sean las responsables del inicio del cáncer o que estas provengan de una célula troncal normal. Se ha propuesto que algunas de las células de un tumor podrían sufrir cambios genéticos o epigenéticos que deriven en el fenotipo que es similar al de una célula troncal normal, pudiendo pasar estos cambios en cualquier tipo de célula: troncal, progenitora o diferenciada (Fig 2)(Soltanian y Matin, 2012).

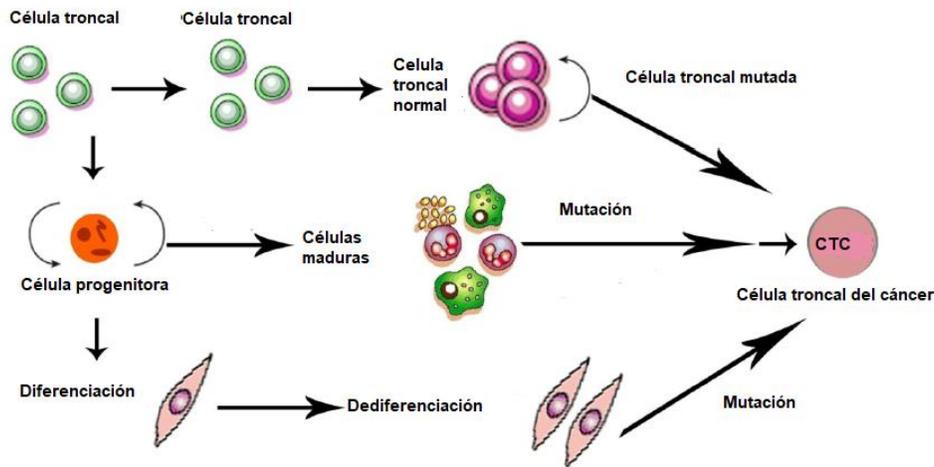


Figura 2. Modelo propuesto del origen de las células troncales de cáncer. Figura modificada de Atena M *et al*, 2004.

Actualmente, se han identificado CTC en una variedad de neoplasias humanas, como leucemia, cáncer de mama, cerebro, piel, vejiga, pulmón, próstata, colon y páncreas, sin embargo, no se ha identificado si todo cáncer contiene subpoblaciones de éste tipo y representan tan sólo una minoría dentro de las poblaciones tumorales (Tabla 2) (Eramo *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Frank NY. *et al.*, 2010).

Tabla 1. Fenotipos de marcadores de superficie de CTC en diferentes tipos de tumor.		
Tipo de tumor	Marcadores de superficie	Referencia
Leucemia Mieloide Aguda (AML)	CD34+, CD38-	Bonnet y Dick, 1997
Cáncer de mama	EPCAM(ESA)+, CD44+, CD24-, ALDH, CD29, CD133	Al-Hajj et al, 2003; Sheridan et al, 2006; Patrawala et al, 2006
Glioblastoma	CD133+, CD15+	Singh et al 2004;
Melanoma	CD20+, CD271+	Fang et al, 2005
Colon	CD133+, CD44+, CD26+, ALDH	Ricci-Vitiani et al, 2007.
Adenocarcinoma de páncreas	CD44+, CD24+, EpCAM+	O'Brien et al, 2007
Cáncer de próstata	CD44+, CD133+, CD49	Patrawala et al, 2006
Pulmón	CD133+, CD90, CD117, ALDH1	Bertolini et al, 2009

Tabla 2. Se han identificado distintos tipos de células troncales de cáncer de acuerdo a la expresión de distintos fenotipos de marcadores de superficie. Figura modificada de Atena M *et al*, 2004.

Las implicaciones que tiene la existencia de las células troncales de cáncer sobre las terapias anti-tumorales actuales, son en relación directa con la resistencia a fármacos que se ha observado en dicha subpoblación, incluyendo quimioterapia y radioterapia, lo que puede sugerir que estos tratamientos, mientras eliminan al resto de las células del tumor, podrían no eliminar a las células troncales de cáncer, las cuales sobreviven y renuevan la masa tumoral (Fig. 3) (Li *et al* 2008).

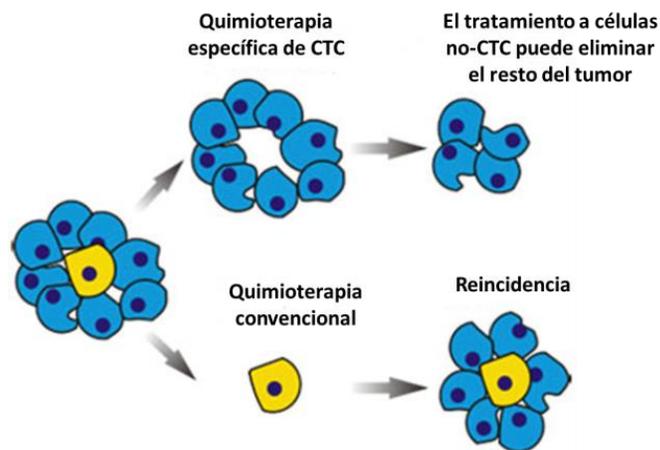


Figura 3. Las terapias convencionales podrían disminuir la masa tumoral, eliminando a la mayoría de las células, pero si las células troncales de cáncer putativas que son menos sensibles permanecen viables, estas podrían restablecer el tumor. Figura modificada de Reya *et al*, 2001.

3.5. Células troncales de cáncer de mama

En el cáncer de mama, el primer reporte de identificación y aislamiento de CTC, fue mediante el uso de dos marcadores de superficie: CD44⁺/CD24^{-/low}. Las células con este fenotipo, mostraron la capacidad de iniciar tumores en ratones NOD/SCID, así como de originar la heterogeneidad fenotípica del tumor inicial (Al-Hajj *et al* 2003).

Esta subpoblación, ha sido aislada tanto de muestras de pacientes después de la propagación *in vitro*, así como a partir de líneas celulares de cáncer de mama (Fillmore *et al*, 2008; Ponti *et al*, 2005).

Otros estudios han demostrado que las CTC de mama, tienen la capacidad de invadir y proliferar en sitios de metástasis. A su vez, se ha demostrado que el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ está asociado con propiedades invasivas debido a la expresión de genes relacionados con metástasis (Sheridan *et al*, 2006).

El fenotipo CD44⁺/CD24^{-/low} ha sido extensivamente utilizado para identificar y aislar células cancerígenas con capacidad tumorigénica. Aun así, han sido identificados otros marcadores de superficie de células troncales de cáncer de mama como se muestra en la tabla 3 (Lorico y Rappa, 2010).

Tabla 2. Marcadores asociados a CTC de mama	
Tipo de marcador	Referencia
CD44+CD24-	Al-Haji et al.; Ponti et al.; Honeth et al.
Capacidad de formación esferoides	Ponti et al.; Fournier and Martin; Rappa and Lorico
Hoechst 33342 "Población lateral"	Hirschmann-Jax et al. ; Patrawala et al.
ALDH (Aldehído deshidrogenasa)	Ginestier et al.; Charafe-Jauffret et al.
CD133	Xiao et al.;Wright et al. ; Storci et al.
Integrinas	Vassilopoulos et al. ; Vaillant et al.

Tabla 3. Marcadores más estudiados asociados a CTC de mama. Figura modificada de (Lorico y Rappa, 2010).

La naturaleza de los marcadores CD44 y CD24 ha sido estudiada por separado. CD24 es una proteína del tipo de las mucinas que se encuentra anclada a la membrana celular vía glicosilfosfatidilinositol (GPI). Puede ligarse a las lectinas que se expresan en plaquetas y el endotelio vascular, especialmente P-selectina, y se ha asociado con

el desarrollo de metástasis. CD44 es una glicoproteína de membrana que se une al ácido hialurónico, colágeno, laminina y fibronectina. Está involucrada en interacciones célula-célula, célula-matriz celular y migración celular. Algunos estudios han demostrado un aumento en la expresión de CD44 en diversos tipos de cáncer y metástasis (Lorico y Rappa, 2010).

Pese a que existen numerosos estudios que cuestionan la validez del fenotipo CD44+/CD24-, se ha encontrado que diferentes líneas celulares de cáncer de mama lo contienen en proporciones muy diversas y que esto se relaciona con el tipo de cáncer del que provienen, así como también con su capacidad metastásica (Tabla 4) (Sheridan *et al*, 2006).

Proporción de CTC con fenotipo CD44+/CD24- de diferentes líneas de cáncer de mama.							
Línea celular	CD44+/CD24-	CD44+/CD24+	CD44-/CD24+	CD44-/CD24-	Tipo de tumor	Origen del tejido	Clasificación
MDA-MB-231	85 ± 5	2	0	13 ± 5	Adenocarcinoma	Derrame pleural	Mesenquimal
TMD-436	72 ± 5	27 ± 5	0	7	Adenocarcinoma	Derrame pleural	Mioepitelial
Hs578T	86 ± 5	10 ± 5	0	2 ± 2	Carcinosarcoma	Tumor primario	Mesenquimal
SUM1315	97 ± 3	0	0	3 ± 3	Adenocarcinoma ductal	Nodulo metastásico	Basal
MCF-7	0	8 ± 3	87 ± 2	6 ± 2	Adenocarcinoma ductal	Derrame pleural	Luminal
SK-BR-3	0	0	84 ± 1	16 ± 1	Adenocarcinoma	Derrame pleural	Luminal/ErbB2+
MDA-MB-468	3 ± 1	90 ± 6	7 ± 3	0	Adenocarcinoma ductal	Derrame pleural	Basal

Tabla 4. Porcentaje de células CTC (CD44+/CD24-) en diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Tabla modificada de Sheridan *et al*, 2006.

Sin embargo, además de ser identificadas por sus marcadores de superficie, las CTC se caracterizan por su capacidad de formación de esferoides, que se describe a continuación.

3.5.1- Formación de mamoesferas

El cultivo de esferoides es un sistema que permite la propagación de células mamarias epiteliales en un estado indiferenciado, basado en su habilidad para proliferar en suspensión en condiciones no-adherentes. De acuerdo a este modelo, la capacidad de

formar mamoesferas se incrementa en células progenitoras/troncales de mama (Dontu *et al*, 2003). Bajo este mismo modelo, Ponti y colaboradores lograron la formación de mamoesferas derivadas de cáncer de mama humano y encontraron que las células cultivadas en estas condiciones eran enriquecidas en el fenotipo CD44+/CD24- y que además tenían la capacidad de iniciar tumores en ratones NOD/SCID. (Ponti *et al*, 2005).

El nombre de esferoides, es en referencia a la morfología que las células adquieren cuando son cultivadas en estas condiciones, pese a que no necesariamente todas las líneas celulares van a mostrar un aspecto esférico perfecto, como se muestra en la figura 4. Algunas células tendrán una agrupación más suelta, como es el caso de la línea MDA-MB-231 (Grimshaw *et al*, 2008), que es la que ha sido elegida para el presente trabajo.

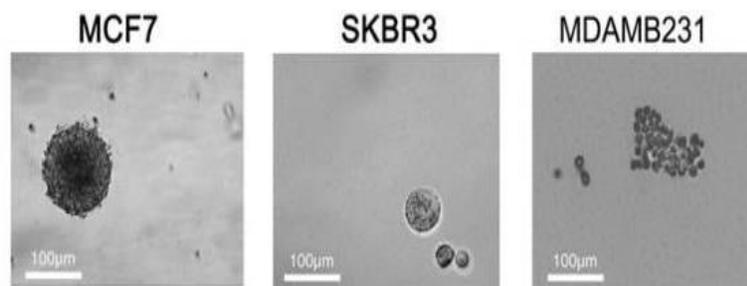


Figura 4. Morfología de mamoesferas de diferentes líneas celulares de cáncer de mama. Tomado de Grimshaw *et al*, 2008.

Además del enriquecimiento en el fenotipo CD44+/CD24-, el equipo de Ponti encontró un aumento de OCT-4 en los esferoides, que es considerado un marcadores de células troncales (Ponti *et al*, 2005), ya que forma parte de los factores de pluripotencialidad que se han asociado a CTC, que se describen a continuación.

3.5.2- Factores de pluripotencialidad asociados a CTC

La capacidad descontrolada de auto-renovación podría desempeñar una función directa en la progresión de diferentes tipos de cáncer. Hasta ahora, la evidencia indica que los mismos mecanismos moleculares que regulan la auto-renovación en células troncales normales, lo hacen en las células troncales de cáncer. Sin embargo, los

factores de transcripción que más han sido estudiados y asociados a la generación de CTC, son NANOG, OCT-4 y SOX-2.

Se ha observado la activación de NANOG en células troncales embrionarias y células tumorales (Jeter, 2015).

Un estudio demostró que el aumento en la expresión de NANOG puede mantener a las células troncales en condiciones de indiferenciación y mantener la capacidad de auto-renovación y proliferación de estas, a través de la regulación de las señales de diferenciación. A su vez, se han asociado niveles elevados de NANOG con pronósticos desfavorables en varios tipos de cáncer (Jeter, 2015).

Se ha reportado que CTC obtenidas de tumores primarios de ovario, tienen niveles elevados de NANOG y OCT3/4 y muestran resistencia a quimioterapia estándar, como paclitaxel. También se ha observado un aumento en la expresión de estos factores de transcripción después de la administración de radioterapia, por lo que podría asociarse a NANOG con la aparición de un fenotipo de quimio-resistencia y con la modulación a la sensibilidad a la radiación (Santaliz-Ruiz *et al*, 2014).

Otros factores de células troncales asociados a pluripotencialidad son OCT-4 y SOX-2, los cuales se encargan de regular la identidad de células troncales embrionarias y facilitar la re-programación de células somáticas diferenciadas de regreso a células troncales pluripotenciales. La expresión de SOX-2 ha sido reportada tanto a nivel de mRNA como de proteína en diversos tipos de cáncer. Existen datos disponibles del Atlas del Genoma del Cáncer que indican que los niveles de expresión de SOX-2 están elevados en glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer esofaríngeo, pulmón, próstata y mama, entre otros, en relación a tejidos normales (Rizzino y Wuebben, 2016). Interesantemente, también se ha observado la sobreexpresión de SOX-2 en CTC de estos tipos de tumores (Sarkar A *et al*, 2013). En tumores de cáncer de mama, SOX2 se ha relacionado con la promoción de características de CTC tanto *in vitro* mediante la formación de esferoides así como *in vivo* en modelos tumorales (Rizzino y Wuebben, 2016).

Por otro lado, en diversos estudios clínicos se han observado tumores con altos

niveles de expresión de OCT4 y lo han descrito como un factor asociado con la progresión del cáncer, altos niveles de metástasis y menor supervivencia, comparado con aquellos tumores que presentan un bajo o moderado nivel de expresión de OCT4. Lo cual ha llevado a considerarlo como un blanco en la terapia dirigida hacia CTC (Ran-Ju y Jeong-Seok, 2011).

2.5.3. Principales vías de señalización implicadas en CTC

La auto-renovación de CTC está regulada por tres principales vías de señalización, que son: Wnt / β -catenina, Notch y Hedgehog.

La vía de Wnt es fundamental en el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos. Cuando los ligandos de Wnt están ausentes, la β -catenina es fosforilada en el citoplasma para su degradación por el proteasoma, por un grupo de proteínas conocidas como el complejo de destrucción, incluyendo Axina, APC y la quinasa GSK3 β . Cuando esta vía es activada, los ligandos de Wnt inhiben el complejo de APC, porque las proteínas que forman el complejo, son secuestradas y la β -catenina no fosforilada activa, se acumula y se transloca al núcleo donde se asocia con TCF / LEF para regular la expresión de los genes diana (Fig 5a) (Zhu y Fan, 2018).

La activación anormal de dicha vía, ha sido estudiada en CTC de diversos tipos de cáncer, como de cáncer de mama, colorectal, de piel y pulmón. Se ha considerado que existe una relación entre los factores de transcripción SOX y la vía de Wnt, por ejemplo se ha encontrado que SOX-2 se sobreexpresa en carcinomas de mama agresivos donde promueve la proliferación estimulada por β -catenina (Chen et al., 2008). A su vez, También se ha demostrado que Wnt es un regulador clave de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), que consiste en un proceso importante en el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas, ya que dota a las células de capacidad migratoria. Sin embargo, la inducción de EMT aumenta el potencial metastásico de las células cancerosas. Se ha demostrado que dicha inducción a EMT puede dar origen a células con el fenotipo de CTC (Vijay et al, 2019).

La vía canónica de Notch es otra vía esencial conservada evolutivamente en el desarrollo y la homeostasis del tejido adulto. Se activa cuando el dominio extracelular del receptor transmembrana de Notch se une a los ligandos de Notch y luego induce la escisión proteolítica y la liberación del dominio intracelular (Notch ICD o NICD) de Notch mediante las proteasas ADAM y γ -secretasa. El ICD de Notch, se traslada al núcleo donde se une al factor de transcripción CSL (CBF1/Supresor de Hairless/LAG1)/RBPJ (Fig 5c) y regula la expresión de los genes involucrados en la auto-renovación de CTC como Survivin, Myc NANOG, OCT-4, y SOX-2 (Karamboulas y Ailles, 2013).

Se ha asociado esta vía con el enriquecimiento en células que contienen características del fenotipo de CTC, por ejemplo, en un estudio se realizó un análisis inmunohistoquímico de tejidos de tumores de mama y los tejidos Notch positivos se asociaron significativamente con la Aldehído Deshidrogenasa 1 A1 (ALDH1A1), la cual se utiliza como un marcador de poblaciones enriquecidas en CTC en diferentes líneas celulares. A su vez, también se ha asociado a Notch con la EMT ó la adquisición de mecanismos de resistencia a fármacos. Por ejemplo, las células de cáncer de próstata en las que se induce el fenotipo de EMT ,mostraron características de CTC, como el aumento de la expresión de Notch 1 y otros genes de pluripotencialidad como SOX-2, NANOG Y OCT-4 (Koury *et al*, 2017).

Finalmente, la vía de Hedgehog (HH), de manera normal, desempeña un rol fundamental en el desarrollo de la piel, los folículos pilosos y glándulas sebáceas, así como en el desarrollo cerebral postnatal (Karamboulas y Ailles, 2013).

En la ausencia de los ligandos Sonic (SHH), Desert (DHH) o Indian (IHH), una proteína llamada Patched (PTCH), que se encuentra de forma transmembranal en la superficie celular, inhibe a la proteína transmembrana smoothed (SMO) y las proteínas GLI suprimen la expresión de los genes diana. Sin embargo, cuando los ligandos de HH extracelulares se unen a PTCH, se elimina la influencia inhibitoria de PTCH en SMO y la activación de SMO da como resultado la translocación nuclear de las proteínas GLI y la inducción de la transcripción de los genes diana (Fig 5b) (Koury *et al*, 2017).

Durante el proceso de EMT y la adquisición del fenotipo CTC, la vía de HH también desempeña un rol importante. Se ha encontrado la sobreexpresión de Gli1 en CTC de cáncer mama y que la ablación de Gli1 resulta en la disminución de la viabilidad, motilidad, clonogenicidad y auto renovación de CTC, así como la inhibición del crecimiento de tumores en modelos de xenotrasplantes. (Koury *et al*, 2017).

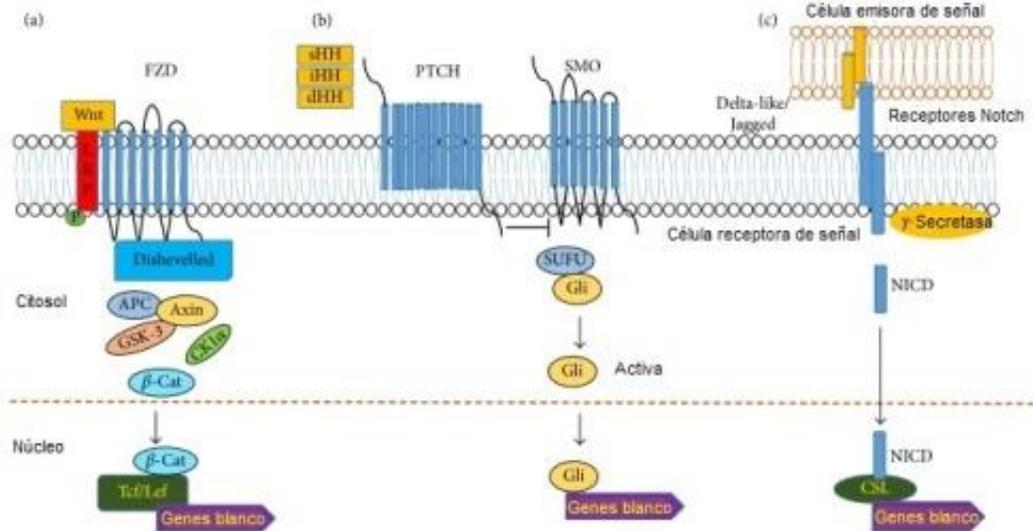


Figura 5. Vías de señalización importantes en células troncales normales y que también son activadas en en CTC, modificado de Koury *et al*, 2017.

3.5.4. Reposicionamiento terapéutico y búsqueda de estrategias terapéuticas dirigidas hacia CTC.

En un estudio donde se analizó el efecto de 16 000 compuestos, Gupta y colaboradores demostraron que la salinomicina, tiene la capacidad de reducir la proporción de células troncales de cáncer de mama con una eficacia 100 veces mayor a paclitaxel, el tratamiento de elección para este tipo de cáncer. Además, el tratamiento de salinomicina en ratones inmunodeficientes también demostró una inhibición del crecimiento de tumores mamarios *in vivo* (Gupta *et al* 2009).

La salinomicina, es un antibiótico perteneciente al grupo de ionóforos producidos por *Streptomyces albus*, cuyo mecanismo de acción actúa a nivel de las membranas biológicas (membrana mitocondrial y citoplasmática), como un ionóforo con selectividad

hacia iones alcalinos con preferencia sobre potasio K⁺. Este agente es ampliamente utilizado para el tratamiento de la coccidiosis de aves de corral y también para aumentar la eficiencia de nutrición en rumiantes (Fuchs D. *et al* 2009).

A pesar de que el mecanismo de acción por el cual la salinomicina actúa sobre las células troncales de cáncer de mama no ha sido completamente dilucidado, se ha observado que tiene la capacidad de inducir apoptosis en células de cáncer humano de diferentes orígenes, que muestran características como resistencia a apoptosis, a agentes antitumorales por sobreexpresión de Bcl-2, proteasoma 26S y glicoproteína-P (P-gp). Interessantemente, este efecto no se observó en células normales (linfocitos T). Este estudio demostró que la inducción de apoptosis por salinomicina es independiente de p53 y la activación de caspasas (Fuchs D. *et al* 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la salinomicina inhibe a la glicoproteína-P (P-gp), mediante ensayos de eflujo de doxorubicina fuera del citosol por citometría de flujo en líneas tumorales de linfoblastos de leucemia mieloide aguda (LMA) y carcinoma epitelial de ovario resistentes a vinblastina y adriamicina respectivamente. El tratamiento de éstas células con salinomicina revirtió la quimio-resistencia a dichas drogas e inhibió el eflujo de doxorubicina del citosol (Riccioni R. *et al* 2010). Lo cual podría sugerir que la inhibición de la actividad de P-gp forma parte del mecanismo de acción por el cual salinomicina inhibe a las células troncales del cáncer.

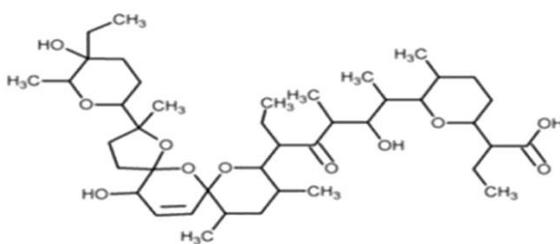


Figura 6. Estructura de la salinomicina. Tomado de Gupta *et al* 2009.

Dichos estudios han marcado la pauta para la búsqueda de nuevos tratamientos dirigidos hacia las CTC, que tengan como blancos algunas de las vías implicadas en la generación de este fenotipo, obstaculizar su regeneración y la recaída del cáncer.

Algunos de los enfoques incluyen el dirigirse hacia biomarcadores específicos de superficie, modulación de las vías de señalización que regulan la auto renovación y diferenciación de las CTC, inhibición de las bombas de flujo de drogas involucradas en la resistencia a la apoptosis, ajuste de las señales del microambiente que sostienen su crecimiento, la inducción de la apoptosis y diferenciación de las CTC (Dragu *et al* 2015).

Dada la variedad de agentes quimioterapéuticos a los cuales son resistentes las células troncales del cáncer, la importancia de encontrar terapias dirigidas hacia dicha subpoblación tumoral, radica en que es un blanco estratégico para tratar de combatir la reincidencia de tumores.

Una de las estrategias para el descubrimiento de nuevos fármacos y sobre la cual se han basado hasta ahora los estudios enfocados en encontrar terapias dirigidas hacia la población de CTC, es el reposicionamiento farmacéutico, el cual se define como el proceso de encontrar nuevos usos para los fármacos más allá de sus indicaciones terapéuticas originales (Asburn y Thor, 2004; Dueñas-González, 2008; Boguski MS. *et al* 2009).

La principal ventaja de este enfoque es que los estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad de los medicamentos son en general bien conocidos; por lo tanto, se agiliza su paso a estudios clínicos de fase II y III (Dueñas-González, 2008).

Con base en esta estrategia, se han propuesto dos mecanismos por los cuales se pueden encontrar estos fármacos. Uno es a través de la búsqueda *in silico* de inhibidores potenciales que actúen sobre “blancos específicos” en bancos de fármacos comercializados. Y la otra forma es a través de la búsqueda *in silico* de “similitud estructural” del fármaco prototipo con fármacos comercializados para otras indicaciones (Asburn y Thor, 2004).

A continuación se muestran algunos de los fármacos que se han estudiado por medio de estas estrategias y que se han aplicado en el área de las terapias anti-tumorales (Tabla 5).

Agente	Indicación principal	Efectos primarios (On-target)	Efecto anti-tumoral (On-Target)	Efecto anti-tumoral (Off-target)
		Vasodilatador		
Hidralazina	Hipertensión	Desconocido	N/A	<u>Metilación del DNA</u>
		Anti-arritmico		
Procainamida	Arritmias	Canales de Na+	N/A	<u>DNMTI</u>
		Anestésico local		
Procaína	Anestesia local	Canales de Na+	N/A	<u>Metilación del DNA</u>
		Antiepiléptico		
Ácido valproico	Epilepsia	GABAérgico	Bloqueo de canales NMDA Na+	<u>HDACs clase I y II de PPARγ</u>
		Anti-diabético		
Metformina	Diabetes mellitus	AMPK	<i>AMPK</i>	N/A
		Anti-obesidad		
Orlistat	Obesidad	Sintasa de ácidos grasos	<i>Sintasa de ácidos grasos</i>	N/A
		Anti-malárico		
Cloroquina	Malaria	Lisosomas	<i>Lisosomas</i>	<u>Autofagia</u>

Tabla 5: Resumen de los fármacos que por reposicionamiento terapéutico se les ha encontrado relación con el cáncer. Se indican sus aplicaciones no relacionados al cáncer y relacionadas con el cáncer. Las fuentes en cursiva indican que los blancos están compartidos por las condiciones patológicas (efectos On-target). Las fuentes subrayadas indican que el efecto antitumoral se explica por diferentes blancos (efectos Off-target). Tabla modificada de Dueñas-González, 2008.

Dentro de los compuestos antimicrobianos que han sido evaluados por su actividad anti-tumoral desconocida, se encuentran narasina e ivermectina. Sin embargo, los estudios existentes no se han realizado *in vivo*, por lo que no son incluidos en la tabla anterior.

En análisis reciente de aproximadamente 2800 compuestos del NIH Chemical Genomics Center Pharmaceutical Collection (NPC), se encontró que narasina tiene la capacidad de inhibir a NF- κ B, un factor de transcripción importante en diversos procesos celulares como el desarrollo embrional y neuronal, proliferación y apoptosis. La desregulación en la vía de señalización de dicho factor está asociada con cáncer (Miller SC. *et al* 2010).

La narasina es un antibiótico ionóforo con selectividad por potasio K⁺ producido por *Streptomyces aerofaciens*, utilizado también como coccidiostático en aves de corral y para el aumento de la eficiencia de alimentación en rumiantes, esto significa que se utilizan para mejorar la fermentación de los nutrientes para producción de leche. (Callaway TR. *et al* 2003).

Por otra parte, la ivermectina es un antiparasitario producido por *Streptomyces avermitilis* y está indicado para el tratamiento de la estrongiloidiasis y también para controlar la oncocercosis. En un estudio de 2010, se encontró que dicho fármaco indujo hiperpolarización de membrana y muerte celular en líneas de leucemia mieloide aguda (Sharmeen *et al* 2010).

Existe evidencia de que la ivermectina puede dirigirse a vías alternativas relevantes para la quimioterapia contra el cáncer. En muchos tipos de cáncer, incluidos los cánceres de colon, piel, pulmón, mama, ovario y próstata, hay una desregulación de la vía de señalización WNT-TCF y muchos genes de esta vía regulan la proliferación celular y metástasis. La ivermectina ha demostrado su eficacia *in vivo* contra el cáncer de colon humano dependiente de la vía WNT-TCF, pero no contra los tumores independientes de WNT-TCF, lo que sugiere un bloqueo específico de esta vía (Melotti *et al*, 2014).

En base a estos antecedentes, narasina e ivermectina pueden considerarse potencialmente para su aplicación en el tratamiento del cáncer.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que los tumores tienen una fisiología celular heterogénea y se ha demostrado que existen células quimio-resistentes responsables del crecimiento tumoral denominadas células troncales de cáncer (CTC), resulta de suma importancia encontrar terapias dirigidas hacia dicha subpoblación tumoral, con el objetivo de eliminarlas específicamente y de esta manera prevenir la recurrencia de tumores y aumentar la sobrevida de los pacientes.

Ya que la salinomicina es un fármaco antiparasitario del que se ha demostrado su capacidad de eliminar a las CTC, este trabajo tuvo como objetivo evaluar si dos compuestos; narasina e ivermectina, con similitud estructural química a dicho fármaco, actúan como inhibidores selectivos de células troncales en cáncer de mama.

5. HIPOTESIS

La narasina e ivermectina inhiben selectivamente la viabilidad de células troncales de cáncer de mama.

6. OBJETIVOS

6.1- Objetivo general

Evaluar el efecto de narasina e ivermectina sobre la viabilidad celular en células troncales de cáncer de mama.

6.2- Objetivos particulares

6.2.1- Obtener una población tumoral enriquecida en células troncales de cáncer de mama de la línea celular MDA-MB-231

6.2.2- Determinar el efecto de ivermectina y narasina sobre la viabilidad de células troncales de cáncer de mama *in vitro*.

6.2.3- Evaluar el efecto de ivermectina y narasina sobre la expresión de los genes de pluripotencialidad; *NANOG*, *SOX-2* y *OCT-4*.

6.2.4- Evaluar el efecto de ivermectina y narasina sobre los niveles de las proteínas *NANOG*, *SOX-2* y *OCT-4*.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1- Búsqueda computacional

La búsqueda computacional se realizó previamente al comienzo del presente proyecto, por lo que no forma parte de los objetivos del mismo. Para realizar una identificación

sistemática de fármacos aprobados por la FDA, con actividad similar a la salinomicina, se realizó una búsqueda de similitud asistida por computadora en DrugBank 4.0. Utilizando los principios de búsqueda de similitud con huellas dactilares bidimensionales, se utilizó la estructura química de salinomicina como base para calcular la similitud de cada uno de los 1,623 compuestos en DrugBank usando las claves del Sistema de Acceso Molecular (Durant *et al*, 2002) y el coeficiente Tanimoto (Willett *et al*, 1998), tal como se implementó en el Ambiente Operativo Molecular (MOE, Versión 2010.10). La selección de compuestos prototipo se basó en valores de similitud e inspección visual.

7.2- Fármacos

Todos los fármacos; narasina (#N1271-5MG), ivermectina (#I8898-1G) y paclitaxel (#T7402-1MG) fueron comprados de Sigma-aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Las concentraciones utilizadas en las curvas dosis-respuesta fueron de 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 ó 2 μM para narasina, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 μM para ivermectina y 0.001, 0.1, 10 ó 1,000 nM para el caso de paclitaxel. Se utilizaron DMSO y etanol grado molecular (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) como disolvente para narasina e ivermectina respectivamente.

7.3- Cultivo celular

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (triple-negativo) fue obtenida del *American Type Culture Collection* (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio DMEM-F12 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) suplementado con 1% Penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco-Life Technologies) e incubados en una atmosfera humidificada a 37°C con 5% de dióxido de carbono.

7.4- Ensayos de viabilidad celular.

Se sembraron 2,000 células por pozo en 100uL de medio, en placas de 96 pozos (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Un día después del cultivo, las células se incubaron en medio sin suero durante 24 horas y después el medio fue reemplazado

con medio fresco con los siguientes compuestos: ivermectina (0.2, 0.4, 0.8, 1, 5 ó 8 μM), narasina (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 ó 2 μM), paclitaxel (0.001, 0.1, 10 ó 1,000 nM) o vehículo (Etanol ó DMSO) por 72h. Posteriormente se analizó la viabilidad celular mediante un método colorimétrico con una sal de tetrazolio (MTS, *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente se tomó la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. El efecto de cada fármaco sobre la viabilidad celular, fue expresado como porcentaje de viabilidad en relación a los controles sin tratamiento. Todos los experimentos *in vitro* se hicieron al menos en tres replicados biológicamente independientes.

7.5- Ensayo de clonogenicidad.

Se sembraron 4.5×10^5 células en cajas de 25 cm^2 y fueron incubadas por 48h para obtener una confluencia aproximadamente del 70 %. A continuación, las células fueron tratadas con diferentes dosis de ivermectina (0.2, 0.4, 0.8, 1, 5 and 8 μM) por 72h. Los controles fueron tratados con las cantidades correspondientes de etanol. Posteriormente, fueron colectadas y se resembraron 1×10^3 células en placas de p60 por 21 días. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución de metanol y ácido acético (3:1 v/v) para fijar las células y a continuación fueron teñidas con 0.4% de cristal violeta. El número de colonias fue cuantificado mediante un microscopio estereoscópico y el programa ImageJ versión 1.50f.

7.6- Cultivo de Esferoides

Para obtener los cultivos de esferoides a partir de las células MDA-MB-231, se resuspendió el botón celular en medio de cultivo MammoCult completo preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MammoCult Medio Basal Cat #05621, Suplemento de Proliferación Cat #050622, Hidrocortisona Cat #07904 y Heparina Cat #07980, STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada) suplementado con Penicilina (100 U/ml) y estreptomina (1.0 mg/ml). Se preparó una dilución con una concentración de 2×10^3 células por mililitro y se sembraron en cajas de 24 pozos de baja adherencia (Corning Costar; Corning Incorporated). De acuerdo a las

especificaciones del fabricante (STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada), después de 15 días de incubación, los esferoides formados fueron disgregados, teñidos con azul de tripano al 0.4% para medir la viabilidad con un contador automático (TC10, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) y se sembraron 1×10^3 células en placas de 96 pozos en condiciones de no adherencia, expuestas a ivermectina (0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 μM), paclitaxel (0.1, 0.1, 1, 10 y 100 nM) o vehículo durante 72 h.

7.7- Citometría de flujo y Clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

Las células MDA-MB-231 con una confluencia de ~90% fueron lavadas con solución salina de fosfatos (PBS, Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA) e incubados durante 5 minutos con PBS-EDTA y tripsina al 0.05% para despegar las células. Posteriormente se centrifugaron con PBS y 1% de FBS a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C y se resuspendieron 1×10^6 células/100 μl en PBS con anticuerpos monoclonales contra CD44 conjugado con FITC(#555742; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) y CD24 conjugado con PE(#311106, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA) o su respectivo control de isotipo (FITC-IgG2bk, Cat #555742; PE-IgG2ak, Cat #555574; BD Biosciences). Las células fueron incubadas con los respectivos anticuerpos a 4°C durante 1 hr. El exceso de anticuerpo fue removido con lavados de PBS al 1% FBS.

El perfil CD44⁺/CD24⁻ fue analizado con un sistema BD FACScanto II (BD Biosciences). La separación de las células vivas con el fenotipo antigénico CD44⁺/CD24⁻ se realizó con un equipo BD FACSAria (BD Biosciences). El porcentaje de células con los diferentes marcadores, se evaluó utilizando BD FACSDiva versión 6.1.3 (BD Biosciences). Las células obtenidas con el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ y CD44⁺/CD24⁺, fueron resuspendidas tres veces en DMEM-F12 al 10% de FBS con penicillina (10,000 U/ml), estreptomycin (10 mg/ml) y anfotericina B (0.025 mg/ml). Se verificó la viabilidad celular mediante conteo con azul tripano y fueron inmediatamente sembradas en placas de 96 pozos de baja adherencia (Corning-Costar; Corning Inc), con un número de 2×10^3 células por pozo, en medio sin suero suplementado (Mammocult, STEMCELL-Technologies), permitiéndoles recuperarse 24 horas antes del posterior

tratamiento con los fármacos correspondientes.

7.8- Extracción de RNA y análisis de la expresión de los genes *OCT-4*, *NANOG* y *SOX-2* en Tiempo Real (qPCR).

Las células MDA-MB-231 fueron tratadas por 72 h con ivermectina (4 μ M) y se obtuvo el RNA mediante el método de Trizol (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A continuación se cuantificó el RNA con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y se comprobó la integridad mediante un gel de agarosa al 2% visualizado con un transiluminador MiniBIS Pro D-Transilluminator (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Neve Yamin, Israel) Posteriormente, se utilizó 1 μ g de RNA para la síntesis de cDNA con el kit GeneAmp RNA PCR Core kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y se realizó el PCR en tiempo real para analizar los genes antes mencionados mediante el uso del kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado utilizando un termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Las condiciones de qPCR fueron las siguientes: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C. Los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001), el umbral de amplificación (CT) fue normalizado utilizando el gen endógeno *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), se usó como calibrador las células control sin tratamiento. Los primers utilizados fueron *HPRT1* forward, 5'-GAA CCT CTC GGC TTT CCC G-3' y reverse, 3'-CAC TAA TCA CGA CGC CAG GG-5'; *NANOG* (homeobox protein nanog) forward, 5'-ACC TCG CTG ATT AGG CTC CAA-3' y reverse, 3'-AGT CTG GAC ACT GGC TAA TCC-5'; *OCT-4* (octamer binding protein) forward, 5'-CAG GCC CGA AAG AGA AAG C-3' y reverse, 3'-CCA CAC TCG GAC CAC ATC CT-5'; y *SOX-2* (Sex Determining Region Y-Box 2) forward, 5'-GCT AGT CTC CAA GCG ACG AAA-3' y reverse, 3'-AAT TCA GCA AGA AGC CTC TCC TT-5'. La temperatura de alineación fue de 60°C para todas las reacciones.

7.9- Extracción y análisis de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT-4 mediante western blot

Se sembraron 4×10^5 células MDA-MB-231 en cajas T-25 cm^2 y se trataron con ivermectina 4 μM por 72 h. Una vez transcurrido este tiempo las células fueron lavadas con PBS y se obtuvo el botón celular mediante tripsinización. A continuación se lavó el botón con PBS y se resuspendió en solución de RIPA (150 mM NaCl; 1.0% IGEPAL CA-630; 0.5% dioxicolato de sodio; 0.1% SDS; 50 mM Tris, pH 8.0) en presencia de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). La cuantificación de proteínas fue determinada con el método del ácido bicinonínico (BCA) y la integridad de las proteínas se observó con azul de coomassie. A continuación se tomó un volumen equivalente a 30 μg de proteínas por muestra y se mezclaron en un tubo con buffer desnaturalizante (Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, 150mM de β -mercaptoetanol, 150mM de Ditioteitol, 1% de azul de bromofenol y 30% de glicerol) y se pusieron en ebullición durante 7 min. Las muestras se cargaron en un gel desnaturalizante al 10% (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) y posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de polivinilidano difluorido. Para confirmar la transferencia de las proteínas a la membrana esta se tiñó con Rojo de Ponceau y se incubó en la solución de bloqueo (Tween 0.1%, TBS1X y 5% de leche baja en grasas, TTBS) por 1 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios NANOG (catalogo no. sc-134218; 1:500); SOX-2 (catalogo no. sc-17320; 1:200); OCT-4 (catalogo no. sc-9081; 1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), anti-actina peroxidado (A3854; 1:10,000; Sigma-Aldrich; Merck KGaA) en solución de bloqueo (5% leche baja en grasa in TBS + 0.1% Tween-20), toda la noche a 4°C. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes: OCT-4, anti-conejo, sc-2370; SOX-2, anti-cabra, sc-2020; NANOG, anti-ratón, sc-2371 (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology) acoplados a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente y luego se realizaron 4 lavados de 10 min con TBS. Finalmente, las proteínas fueron visualizadas mediante un sustrato quimio-luminiscente (Clarity Western Enhanced Chemiluminescence Substrate, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Las bandas fueron cuantificadas mediante un análisis

densitométrico en el programa Image J version 1.50f (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

8- Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) y las diferencias estadísticas entre grupos se establecieron por la prueba de Bonferroni utilizando el programa computacional GraphPad Prism versión 5.

9. RESULTADOS

9.1- Ivermectina y narasina tienen similitud estructural con salinomicina.

Los resultados de búsqueda de similitud estructural con salinomicina en el DrugBank, mostraron 25 compuestos de alto valor de similitud. Para definir un compuesto con un “alto valor de similitud”, las moléculas se seleccionaron como aquellas con valores de similitud con dos desviaciones estándar por encima de la similitud media de todos los compuestos de DrugBank con salinomicina.

Sin embargo, un análisis subsecuente identificó a tres compuestos con una mayor similitud: ivermectina, natamicina (un conservador de alimentos) y narasina (un antibiótico de uso veterinario). Ivermectina resultó tener el valor más alto de similitud estructural 0.78. Siguiendo el principio de similitud estructural, el cual establece que los compuestos similares muestran propiedades similares al compuesto prototipo (Medina-Franco *et al.*, 2014), en este trabajo se analizó si el antiparasitario ivermectina y el coccidiostático narasina podrían tener propiedades biológicas similares a salinomicina.

Cabe mencionar que la ivermectina es un fármaco aprobado por la FDA para uso clínico, mientras que natamicina y narasina no lo son. En un trabajo reciente (Gupta *et al.*, 2009) en donde se utilizó una colección de 16000 compuestos para encontrar drogas con actividad selectiva o preferencial sobre la población de células troncales tumorales, únicamente el 0.2% del total de la librería mostró mayor grado de selectividad sobre esa población celular, resultando la salinomicina como el compuesto más prometedor con esta actividad.

Con base en estas observaciones, en este trabajo se realizaron ensayos de viabilidad utilizando los dos compuestos obtenidos mediante el análisis de similitud estructural; ivermectina y narasina, ambos compuestos actúan como ionóforos. Las estructuras bi- y tri-dimensionales de salinomicina, ivermectina y narasina se muestran en la figura 6.

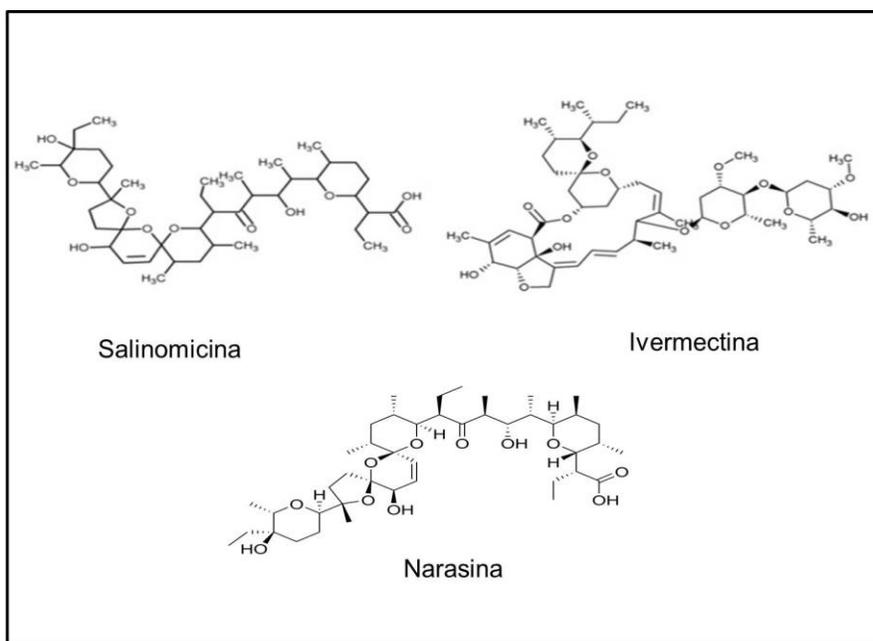


Figura 6. Estructura bidimensional y tridimensional de salinomicina, narasina e ivermectina.

9.2- La ivermectina inhibe parcialmente la viabilidad celular y la capacidad clonogénica.

Para evaluar los efectos antitumorales de ivermectina y narasina en la línea celular MDA-MB-231, se evaluó la viabilidad celular. Los resultados demostraron una disminución significativa de manera dosis dependiente con ivermectina sobre la viabilidad celular, sin embargo, con la dosis más alta (8 μ M) la disminución fue apenas del 45% (Fig 7A). Las diferencias estadísticamente significativas se obtuvieron comparando los controles contra los tratados con ivermectina (* $P < 0.0001$). Para el caso de narasina se observó una inhibición de la viabilidad celular mayor al 50% con una concentración de 2 μ M (Fig 7B).

Debido a que ivermectina es un fármaco aprobado por la FDA para su uso clínico, tomamos esto como ventaja para, a continuación, analizar su efecto sobre la capacidad clonogénica con el fin de poder dilucidar si su efecto es similar al reportado para salinomicina (Gupta *et al.*, 2009).

Los resultados muestran una disminución significativa de la capacidad de formación de colonias en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 después del tratamiento con ivermectina a partir de 0.2 μM . Sin embargo a concentraciones de 1, 5 y 8 μM el efecto se mantiene similar (Figura 7B). Cabe mencionar que estos resultados a partir de una concentración de 0.8 μM , concuerdan con lo observado en los ensayos de viabilidad celular en células MDA-MB-231.

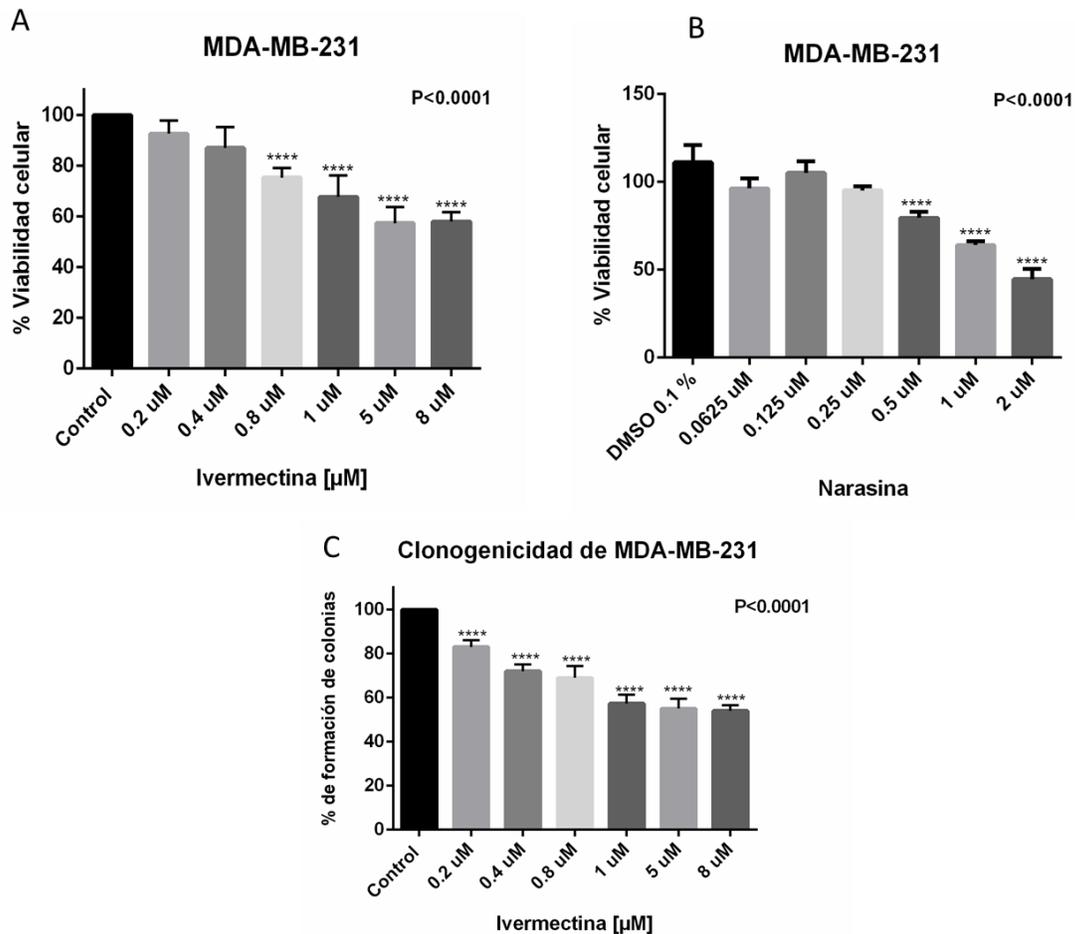


Figura 7. Efectos inhibitorios de la ivermectina y narsina sobre la viabilidad celular y formación de colonias de MDA-MB-231. (A) Análisis de los efectos del tratamiento con ivermectina sobre

la viabilidad celular de MDA-MB-231 (0.2, 0.4, 0.8, 1, 5 y 8 μ M). (B) Análisis de los efectos del tratamiento con narasina sobre la viabilidad celular de MDA-MB-231 (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 μ M). (C) Efecto de la ivermectina sobre la formación de colonias en MDA-MB-231 (0.2, 0.4, 0.8, 1, 5 y 8 μ M). Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes. ****P<0.0001 vs. control El nivel de significancia fue calculado mediante la prueba de ANOVA de 1 vía y con corrección de Bonferroni *P<0.0001 vs. control.

9.3- Efectos inhibitorios de la ivermectina y paclitaxel en células MDA-MB-231 enriquecidas en CTC.

Se ha observado que la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama posee una subpoblación de células con propiedades troncales con la capacidad de formar nuevos tumores en ratones inmunocomprometidos (NOD/SCID) que fueron xenotransplantados con la subpoblación de células CD44⁺/CD24⁻ aislada de pacientes con cáncer de mama (Tanaka *et al.*, 2009; Al-Hajj *et al.*, 2003). Se ha reportado que la proporción de células con el fenotipo CD44⁺CD24⁻ en la línea celular MDA-MB-231 es del 85±5% (Sheridan *et al.*, 2006). Por otro lado, también se ha reportado que los esferoides formados en condiciones no-adherentes a partir de diferentes líneas celulares, están enriquecidas en CTC (Piscitelli *et al.*, 2015). Interesantemente, Gupta y colaboradores observaron que el fármaco salinomicina tenía un efecto inhibitorio selectivo sobre dicha población obtenida por el fenotipo CD44⁺CD24⁻ o mediante esferoides (Gupta *et al.*, 2009), Tomando en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se analizó si el tratamiento con ivermectina y narasina inhibía preferentemente a la población de CTC con mayor selectividad que el fármaco citotóxico paclitaxel.

Nosotros encontramos que a concentraciones ≤ 2 μ M de ivermectina, no hubo diferencias significativas en la viabilidad en la línea total MDA-MB-231 en comparación con los cultivos de esferoides y las células separadas con los marcadores CD44⁺CD24⁻ (Fig 8A). Sin embargo, las células tratadas con 4 u 8 μ M de ivermectina, mostraron una disminución significativa en la viabilidad en las poblaciones enriquecidas en CTC en comparación con la línea celular total (P<0.001), en donde la inhibición de la viabilidad fue $\leq 30\%$. Por otro lado, en las dos subpoblaciones (esferoides y células CD44⁺CD24⁻) se mostró un menor efecto sobre la inhibición de la viabilidad celular con paclitaxel en comparación con ivermectina y no se observaron diferencias significativas entre

ninguno de estos grupos (Fig 8B). Por otro lado, nuestros resultados demostraron que narasina, el segundo fármaco con mayor similitud estructural a salinomycin, descrito como un derivado directo de dicho fármaco y con el mismo uso veterinario, no demostró un mayor efecto a 2uM sobre los esferoides enriquecidos en CTC que el observado en la línea total MDA-MB-231. Dado el antecedente con el que contamos de narasina, en el cuál la IC50 calculada para la línea celular HeLa es de 0.1 uM a 72 hr y a que no hay hasta el momento estudios de tolerancia en humanos, no se evaluó a este fármaco en concentraciones más altas, por lo que a continuación se decidió descartar este fármaco como inhibidor selectivo de CTC en los siguientes experimentos (Fig. 8C).

Para comprobar el efecto selectivo de la ivermectina sobre la población de CTC y las subpoblaciones enriquecidas con CD44⁺/CD24⁻ y CD44⁺/CD24⁺ derivadas de la línea celular MDA-MB-231, se cultivaron ambas poblaciones en presencia de ivermectina y paclitaxel. Los resultados demostraron que las células tratadas con 4 y 8 uM de ivermectina mostraron una reducción significativa en la viabilidad de la población CD44⁺CD24⁻. El tratamiento con 8 uM redujo la viabilidad de las células CD44⁺CD24⁻ a un 0% en comparación con las células CD44⁺CD24⁺ (Células no troncales) (Fig 9A), mientras que la reducción de la viabilidad en las células CD44⁺CD24⁺ tratadas con 8 uM de ivermectina se aproximó a un 25%. A su vez, se observó que la población CD44⁺CD24⁺ de células no troncales fue sensible a paclitaxel desde 0.01 nM y para la subpoblación CD44⁺CD24⁻ se observó un efecto a concentraciones ≥ 10 nM. Se observaron diferencias estadísticas en todas las concentraciones entre la subpoblación CD44⁺CD24⁻ y CD44⁺CD24⁺ (Fig 9B).

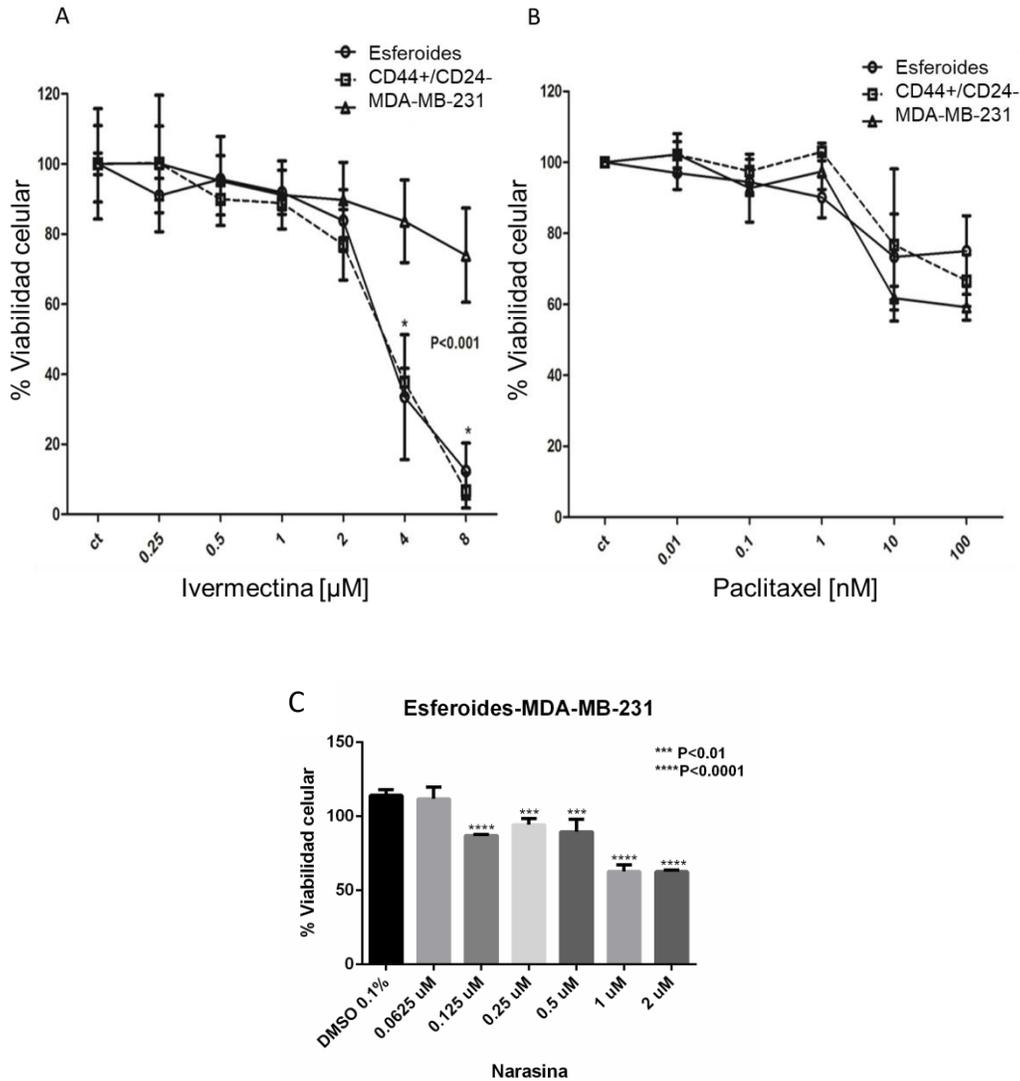


Figura 8. Efectos del tratamiento con ivermectina, narasina o paclitaxel sobre la población enriquecida en CTC de la línea celular MDA-MB-231. (A) El efecto de ivermectina (0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 8 μ M) en la viabilidad de cultivos de esferoides, las células seleccionadas con los marcadores CD44+/CD24- y la línea total MDA-MB-231. (B) Los efectos de paclitaxel (0.01, 0.1, 1, 10 y 100 nM) en la viabilidad de cultivos de esferoides, las células seleccionadas con los marcadores CD44+/CD24- y la línea total MDA-MB-231. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de paclitaxel. (C) Los efectos de narasina (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 μ M) en la viabilidad de cultivos de esferoides con un tratamiento por 72 horas. Las diferencias significativas se determinaron con una ANOVA de 1 vía, con corrección de Bonferroni. ****P<0.0001 vs Control, ***P<0.01 vs Control

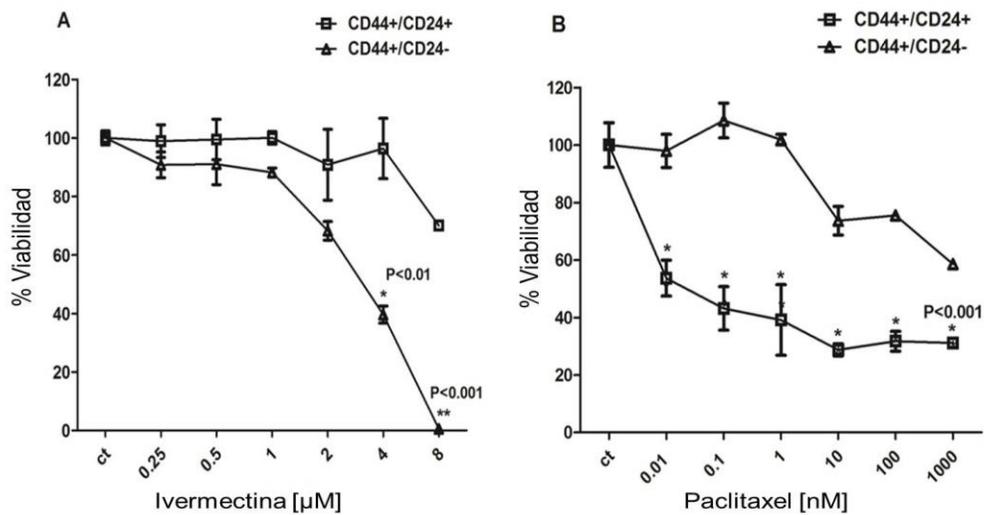


Figura 9. Los efectos del tratamiento de ivermectina sobre las células CD44+/CD24- y CD44+/CD24+. (A) Efectos del tratamiento de ivermectina (0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 8 μM) sobre la viabilidad de las células CD44+/CD24- y CD44+/CD24+. Un efecto, estadísticamente significativo, de ivermectina fue observado en las células CD44+/CD24- a 4 y 8 uM comparado contra las células CD44+/CD24+. (B) Los efectos de paclitaxel (0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1,000 nM) sobre la viabilidad de las células CD44+/CD24- y CD44+/CD24-. Un patrón opuesto fue observado con paclitaxel en todas las concentraciones probadas. *P<0.01 y **P<0.001 vs. Células CD44+/CD24+.

9.4- La ivermectina reduce la expresión de los genes y los niveles de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT-4.

Se ha demostrado que la salinomicina disminuye la expresión de genes de pluripotencialidad (Wang *et al*, 2016), por lo que como primer abordaje, se analizaron los niveles de los genes *NANOG*, *SOX-2* y *OCT-4* en las células MDA-MB-231 tratadas con ivermectina (4 uM) por 72 h. Como se muestra en la figura 10, el tratamiento con ivermectina redujo significativamente los niveles de expresión de los genes *NANOG*, *SOX-2* y *OCT-4* en las células MDA-MB-231. A continuación se analizó si ocurría el mismo efecto de ivermectina sobre los niveles de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT-4. Los resultados demostraron una disminución significativa de los niveles de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT-4 después de 72 h de tratamiento con ivermectina. (*P<0.01).

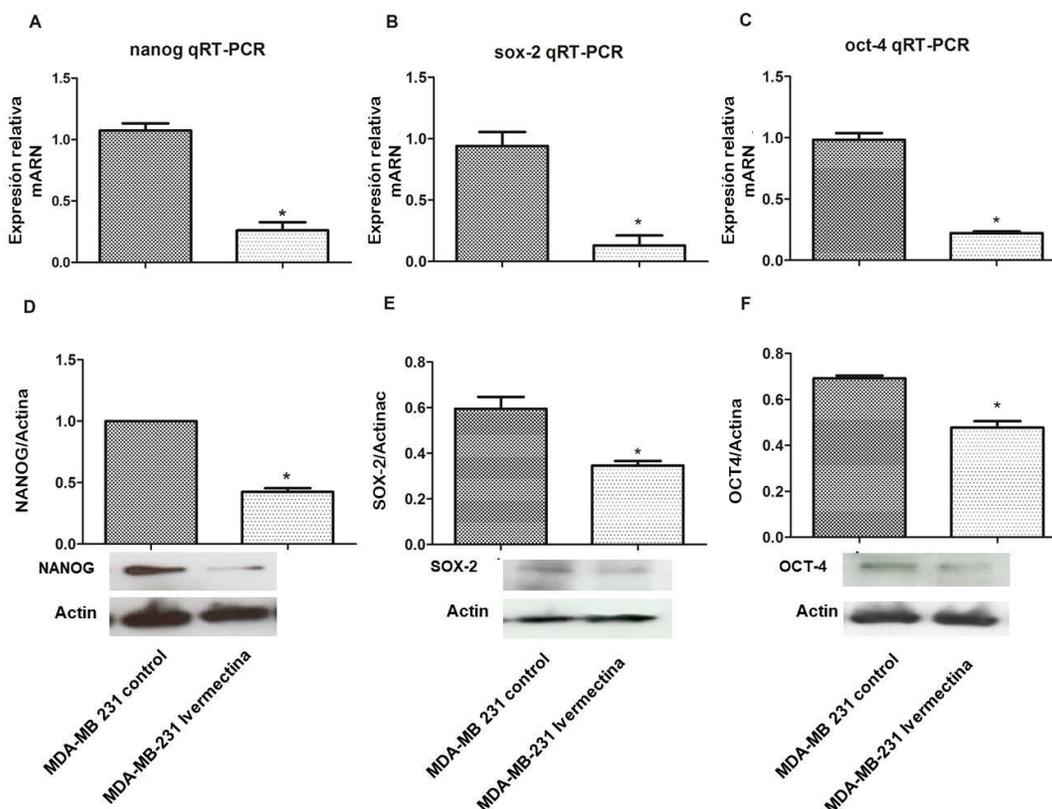


Figura 10. La ivermectina reduce la expresión de los genes y los niveles de las proteínas NANOG, SOX-2 y OCT-4. (A-C) Niveles de expresión relativa de mRNA de (A) *NANOG*, (B) *SOX-2* y (C) *OCT-4*. (D-F) Análisis de Western Blot y cuantificación de niveles de expresión de (D) *NANOG*, (E) *SOX-2* y (F) *OCT-4*. * $P < 0.01$ vs control. *OCT-4*: Octamer-binding protein; *NANOG*: homeobox protein *NANOG*; *SOX-2*: Transcription factor *SOX-2*.

10-DISCUSIÓN

Actualmente el reposicionamiento terapéutico, ha ayudado a identificar nuevas aplicaciones en cáncer para fármacos que ya se habían descrito para otro tipo de enfermedades. Un ejemplo de ello es salinomicina un agente que se utiliza como coccidiostático en el forraje de pollos y que recientemente elimina preferencialmente o de forma selectiva a la subpoblación de CTC de cáncer de mama (Gupta *et al.*, 2009). En un estudio realizado para la búsqueda de agentes con toxicidad específica hacia CTC, fueron identificados cuatro compuestos que consistentemente redujeron la proporción de CTC, incluyendo a salinomicina, etoposido, abamectina y nigericina. De

estos, salinomicina fue el más efectivo al reducir la proporción de CSC hasta 100 veces más en comparación a paclitaxel. Posteriormente, se observó que la salinomicina inhibió el crecimiento de tumores mamarios *in vivo* e indujo un incremento en la diferenciación epitelial de las células tumorales, fenómeno asociado con la pérdida de genes de pluripotencialidad (Gupta PB *et al*, 2009).

Sin embargo la salinomicina sólo es de uso veterinario, por lo que se realizó una búsqueda en la base de DrugBank para encontrar fármacos con una estructura química similar y de uso clínico aprobado ó que pudieran tener un efecto similar. Los resultados obtenidos demostraron que existen dos fármacos: narasina e ivermectina con alta similitud estructural a salinomicina. Narasina también es un fármaco de uso veterinario y es de hecho, un derivado directo de la salinomicina. Con base en estos resultados, analizamos el efecto de ambos por sus posibles efectos sobre la población de CTC. El efecto observado de narasina sobre poblaciones enriquecidas en CTC, no mostró ser distinto que el que tuvo sobre la línea total MDA-MB-231 a la máxima concentración probada. La narasina, al igual que la salinomicina, es un antibiótico ionóforo polieter que pertenece a un amplio grupo de compuestos que son utilizados como coccidiostáticos en animales de granja y como suplementos para la promoción del crecimiento en rumiantes (Huczynski, 2012). Existe evidencia de que narasina actúa como un inhibidor de la vía de señalización de NF-kB mediante la inhibición de la fosforilación de IκBα. Se ha encontrado que esta vía se encuentra activada constitutivamente en ciertos tipos de tumores, incluidos el de mama (Miller *et al*, 2010). Sin embargo, es posible que este mecanismo no sea clave en la generación de un efecto inhibitorio sobre las CTC, y podría tratarse de una excepción al principio de similitud.

Por otra parte, el antiparasitario ivermectina mostro efectos biológicos similares a los reportados para salinomicina (Gupta PB *et al*, 2009; An H, 2015; Krotneva *et al*, 2015). Esto claramente representa una ventaja en términos del reposicionamiento terapéutico, ya que existe una extensiva experiencia en el uso clínico de ivermectina como un antiparasitario, así como estudios de farmacocinética y farmacodinamia (Krotneva *et al*, 2015), por lo tanto, los ensayos clínicos en pacientes con cáncer podrían ser a corto plazo. Con base en estas observaciones el resto del estudio se centró en analizar el

mecanismo de acción de este fármaco implicado en la inhibición del crecimiento celular de CTC.

La ivermectina es un derivado de las avermectinas, las cuales son un grupo de compuestos de 16 miembros derivados de lactonas macrocíclicas, que provienen de los policétidos y ligados a un disacárido del desoxiazúcar metilado I-oleandrosa (Yoon, 2004). El uso de la ivermectina en humanos fue aprobado por la FDA en 1987 (<http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/drug/250/stromectol-ivermectin>), es el derivado de las avermectinas de mayor interés como un fármaco antiparasitario y consiste en una mezcla de 80% 22,23-dihidro-ivermectina B1a y 20% del homólogo B1b (Barragry, 1987). La ivermectina es un ionóforo y esta propiedad ha sido evaluada como un posible mecanismo de acción en células cancerígenas. Ha sido demostrado que induce hiperpolarización de membrana dependiente de iones cloruro y apoptosis en células de leucemia (Sharmeen *et al*, 2010), así como disfunción en la mitocondria y estrés oxidativo en glioblastoma (Liu *et al*, 2016). También se han asociado sus efectos antitumorales con su habilidad para inactivar la vía PAK1/AKT, conduciendo a la supresión del crecimiento de tumores de mama mediante autofagia citostática (Wang, 2016), y con la modulación de la sensibilidad de P2X4/P2X7/Pannexin-1 al ATP extracelular (Draganov *et al*, 2015).

A pesar de que los posibles efectos antitumorales de este compuesto se reportaron en 1999 (Mosin *et al*, 2000), no se han hecho estudios enfocados en su habilidad para eliminar selectivamente a las CTC. Sin embargo, existe evidencia relevante respecto a la relación entre ivermectina y CTC. Melotti y colaboradores han demostrado que la ivermectina inhibe la vía de WNT-TCF, la cual comúnmente es considerada alterada en CTC (Dragu *et al*, 2015), y que esto tiene un efecto inhibitorio sobre la auto-renovación en células de cáncer de colon cultivadas en esferoides (Melotti *et al*, 2014). Recientemente, también se encontró que la ivermectina disminuye la expresión de los genes de pluripotencialidad NANOG y SOX-2, adicionalmente a la reducción de la actividad de la ALDH, los cuáles también son marcadores de las CTC de mama (Kwon *et al*, 2015).

Dadas las implicaciones de la existencia de una población celular responsable de la reincidencia de los tumores, resulta importante buscar terapias adyuvantes que puedan eliminar tanto a las CTC como a las células no-CTC de un tumor, y con ello proponer una estrategia terapéutica más completa. Los resultados que hemos obtenido con ivermectina en donde se muestra una inhibición preferencial sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231 enriquecidas en CTC, en conjunto con los datos de la literatura sobre los efectos de la misma sobre las vías y marcadores relacionados con CTC, respaldan nuestros hallazgos, Por lo que resultaría interesante analizar si el efecto de ivermectina es el mismo en células CTC derivadas de otros tipos de cáncer, así como también analizar su efecto en combinación con otros agentes quimioterapéuticos.

El desarrollo de terapias antitumorales más eficientes, ha involucrado también como blanco terapéutico a las vías de señalización implicadas en la regulación de la proliferación y diferenciación de las CTC, como lo son las vías de Notch, Hh y Wnt (Takebe N. *et al*, 2011). Sin embargo, cabe mencionar que esta estrategia con los fármacos que tienen como blanco a estas vías, también podrían ser inefectivos o tóxicos debido a la comunicación cruzada que existe en la señalización de estas vías.

11-CONCLUSIONES

En conclusión, demostramos que la ivermectina es otro ionóforo que preferencialmente actúa sobre la subpoblación de CTC de la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama. Su seguridad demostrada tras el tratamiento de millones de pacientes con oncocercosis y otras enfermedades parasitarias la colocan como un potente candidato para estudios posteriores con el objetivo de proponer a ivermectina como un fármaco de reposicionamiento en la terapia contra el cáncer.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gupta PB., *et al*. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138: 645-659.

2. Gligorich, *et al.* (2013) Development of a screen to identify selective small molecules active against patient-derived metastatic and chemoresistant breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 15:R58.
3. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
4. Hanahan D., Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-74.
5. Organización Mundial de la Salud (2018). Datos y cifras sobre el cáncer. Tomado de: <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/>.
6. Ferlay *et al* (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 144(8):1941-1953
7. GLOBOCAN 2018. Cancer today. Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018. Tomado de: <https://gco.iarc.fr/today/home>
8. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales. Tomado de http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
9. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2017). Estadísticas a propósito del día de muertos (2 de noviembre). Datos nacionales. Tomado de: http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf
10. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* (414): 105–111.
11. Al-Hajj, *et al.* (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 100(7):3983-8.
12. Lapidot T., *et al.* (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantations into SCID mice. *Nature* 367(6464):645-8.
13. Li, *et al.* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 672-679.
14. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet*

Dev. 2008;18:48–53

15. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF (2007). The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* (23):675-99.
16. Wicha MS, Liu S, Dontu G (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 66(4):1883-90.
17. Soltanian S, Matin MM (2011). Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol.* 32(3):425-40.
18. Atena, M., Reza, A.M. and Mehran, G. (2014). A Review on the Biology of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Discovery*, 4, 83-89.
19. Eramo A, et al. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 15(3):504-14.
20. Frank NY., et al. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J. Clin. Invest.* 20(1):41-50.
21. Fillmore CM, Kuperwasser C (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 10(2):R25.
22. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. (2005) Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 65(13):5506-11.
23. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P and Turner CH. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8:R59.
24. Lorico, A., & Rappa, G. (2011). Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. *Journal of oncology*, 2011, 135039.
25. Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J., & Wicha, M. S. (2003). *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development*, 17(10), 1253–1270.
26. Grimshaw, M. J., Cooper, L., Papazisis, K., Coleman, J. A., Bohnenkamp, H. R.,

- Chiapero-Stanke, L., ... Burchell, J. M. (2008). Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast cancer research: BCR*, 10(3), R52.
27. Jeter, C. R., Yang, T., Wang, J., Chao, H. P., & Tang, D. G. (2015). Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem cells*, 33(8), 2381–2390.
28. Iv Santaliz-Ruiz, L. E., Xie, X., Old, M., Teknos, T. N., & Pan, Q. (2014). Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *International journal of cancer*, 135(12), 2741–2748.
29. Wuebben, E. L., & Rizzino, A. (2017). The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*, 8(27), 44917–44943.
30. Sarkar, A., & Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell*, 12(1), 15–30.
31. Kim, R. J., & Nam, J. S. (2011). OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. *Laboratory animal research*, 27(2), 147–152.
32. Zhu, P., & Fan, Z. (2018). Cancer stem cells and tumorigenesis. *Biophysics reports*, 4(4), 178–188.
33. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y. (2008) The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*, 283:17969–17978.
34. Vijay GV, Zhao N, Den Hollander P, et al. (2019). GSK3 β regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 21(1):37.
35. Christina Karamboulas, Laurie Ailles (2013). Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1830 (2): 2481-2495.
36. Koury J, Zhong L, Hao J. (2017). Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells Int*, 2017:2925869.
37. Fuchs D., et al. (2009). Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 743-749.

38. Riccioni R., *et al.* (2010). The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor. *Blood Cells Mol Dis* 45: 86-92.
39. Dragu, D. L., Necula, L. G., Bleotu, C., Diaconu, C. C., & Chivu-Economescu, M. (2015). Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World journal of stem cells*, 7(9), 1185–1201.
40. Ashburn, Ted & Thor, Karl. (2004). Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews. Drug discovery*. 3. 673-83.
41. Boguski MS., *et al.* (2009). Drug Discovery. Repurposing with a difference. *Science*. 324(5933):1394-5.
42. Dueñas-González, A., García-López, P., Herrera, L. A., Medina-Franco, J. L., González-Fierro, A., & Candelaria, M. (2008). The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Molecular cancer*, 7, 82.
43. Miller, S. C., Huang, R., Sakamuru, S., Shukla, S. J., Attene-Ramos, M. S., Shinn, P., ... Xia, M. (2010). Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochemical pharmacology*, 79(9), 1272–1280.
44. Callaway TR., *et al.* (2003). Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr Issues Intest Microbiol* 4(2):43-51.
45. Sharmeen S., *et al.* (2010). The antiparasitic agent ivermectin induces chloridedependent membrane hyperpolarization and cell death in leukemia cells. *Blood* 116(18):3593-603.
46. 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 molecular medicine*, 6(10), 1263–1278.
47. 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.
48. Willett P, Barnard JM and Downs GM (1998). Chemical similarity searching. *J Chem Inf Comput Sci* 38: 983-996.

49. Molecular Operating Environment (MOE), version 2010.10, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Quebec, Canada. Disponible en: <http://www.chemcomp.com>
50. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402-8.
51. Medina-Franco JL and Maggiora GM (2014). Molecular Similarity Analysis. In Chemoinformatics for Drug Discovery, Bajorath, J., Ed.; John Wiley & Sons, Inc; Chapter 15, pp 343-399.
52. Al-Hajj, *et al.* (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS* 100(7):3983-8.
53. Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N and Kuroki S, *et al* (2009). The Hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Research*, 29 (62):147-2157.
54. Piscitelli E, Cocola C, Thaden FR, Pelucchi P, Gray B and Bertalot G, *et al* (2015). Culture and characterization of mammary cancer stem cells in mammospheres. *Methods Mol Biol* 1235:243-62.
55. Wang Y, *et al* (2011). Effects of salinomycin on cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Med Chem* 7:106-111.
56. Adam Huczyński (2012). Polyether ionophores—promising bioactive molecules for cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22 (23):7002-7010.
57. Miller, S. C., Huang, R., Sakamuru, S., Shukla, S. J., Attene-Ramos, M. S., Shinn, P., ... Xia, M. (2010). Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochemical pharmacology*, 79(9), 1272–1280.
58. An H, Kim JY, Oh E, Lee N, Cho Y, Seo JH (2015) Salinomycin Promotes Anoikis and Decreases the CD44+/CD24- Stem-Like Population via Inhibition of STAT3 Activation in MDA-MB-231 Cells. *PLoS ONE* 10(11): e0141919.
59. Krotneva SP, Coffeng LE, Noma M, Zouré HGM, Bakoné L, Amazigo UV, *et al.* (2015) African Program for Onchocerciasis Control 1995–2010: Impact of Annual

Ivermectin Mass Treatment on Off-Target Infectious Diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0004051.

60. FDA approved drugs.
<http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/drug/250/stromectol-ivermectin>.
61. Yoon YJ, Kim ES, Hwang YX and Choi CY (2004). Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:626-34.
62. Barragry TB (1987). A review of the pharmacology and clinical uses of ivermectin. *Can Vet J* 28:512-7.
63. Liu Y, Fang S, Sun, Q and 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: 415-421.
64. Wang K and Huang C (2016). Ivermectin induces cytostatic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer. *Cancer Res* 1;76: 4457-69.
65. Draganov, D., Gopalakrishna-Pillai, S., Chen, Y. R., Zuckerman, N., Moeller, S., Wang, C., ... Lee, P. P. (2015). Modulation of P2X4/P2X7/Pannexin-1 sensitivity to extracellular ATP via Ivermectin induces a non-apoptotic and inflammatory form of cancer cell death. *Scientific reports*, 5, 16222.
66. Mosin VA, Krugliak EB, Sterlina TS, Korystov IuN, Shaposhnikova VV and Narimanov AA, et al (2000). Cytotoxic and cytostatic effect of avermectines on tumor cells in vitro. *Antibiot Khimioter* 45:10-4.
67. Kwon, Y. J., Petrie, K., Leibovitch, B. A., Zeng, L., Mezei, M., Howell, L., ... Waxman, S. (2015). Selective Inhibition of SIN3 Corepressor with Avermectins as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 14(8), 1824–1836.
68. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ and Ivy PS (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 97-106.