

ESTUDIO EXPLORATORIO DE EFICACIA DE IVERMECTINA COMBINADA A α -PD-1 EN CÁNCER COLORRECTAL RESISTENTE A QUIMIOINMUNOTERAPIA

EXPLORATORY EFFECTIVENESS STUDY OF IVERMECTIN COMBINED WITH α -PD-1 IN CHEMOTHERAPY RESISTANT COLORRECTAL CANCER

Resumen

Las terapias inmunológicas con inhibidores de checkpoints (ICIs) han revolucionado el abordaje del cáncer colorrectal (CCR), pero su efectividad se restringe a tumores inmunorreactivos con deficiencia en la reparación de errores tipo mismatch (dMMR). La ivermectina (IVM), un agente antiparasitario, se propone como posible estrategia terapéutica debido a su impacto en la muerte celular inmunogénica (MCI) y la reversión de resistencia a medicamentos. La investigación evaluó el efecto antineoplásico de IVM combinado con α -PD-1 empleando el modelo murino CT-26, una línea de CCR KRAS-mutada y competentes para MMR.

El análisis bioinformático mediante la plataforma GEPIA2 empleando la base TCGA confirmó la expresión diferencial de blancos moleculares de IVM en tejido tumoral versus normal, siendo más alta en tumores con inestabilidad microsatelital baja (MSI-L)/microsatelital estable (MSS) que en inestabilidad microsatelital alta (MSI-H).

En experimentos in vitro, CT-26 mostró alta sensibilidad a IVM (IC50: 11 μ M, luego de exposición por 72 horas), alterando el metabolismo y aumentando la secreción de IL-6. El análisis proteómico identificó 17 proteínas sobreexpresadas y 8 inhibidas, relacionadas con evasión inmunológica y proliferación celular.

En ratones BALB/c portadores de tumores CT-26, la terapia combinada de IVM y α -PD-1 redujo significativamente el crecimiento tumoral y la progresión metastásica. La preinmunización con células CT-26 tratadas con IVM disminuyó la incidencia y la progresión tumoral. IVM podría potenciar la respuesta a ICIs en tumores "fríos". Estos hallazgos sugieren que la combinación de IVM y α -PD-1 puede mejorar la inmunorreactividad y respuesta terapéutica en CCR.

Palabras claves: Ivermectina, cáncer colorrectal, pMMR, inmunoterapia, α -PD1, terapia adyuvante.

Abstract

Immunotherapies, particularly immune checkpoint inhibitors (ICIs), have transformed the management of colorectal cancer (CRC), but their efficacy is confined to immunoreactive tumors with deficient mismatch repair machinery (dMMR). Repurposing the antiparasitic drug ivermectin (IVM) for its potential impact on immunogenic cell death (ICD) and drug resistance reversal has been proposed in cancer treatment. This study aimed to investigate the antineoplastic effect of IVM in combination with α -PD1 using the CT-26 model, a murine KRAS-mutant and MMR-proficient CRC cell line.

Bioinformatic analysis on the GEPIA2 platform using the TCGA database (READ/N=318; COAD/N=349) confirmed differential expression of IVM-associated molecular targets in tumor versus normal tissue. These targets exhibited comparable or significantly higher expression in MSI-L/MSS versus MSI-H CRC clinical cases.

In vitro, CT-26 cells displayed high sensitivity to IVM (IC50: 11 μ M after a 72h-exposure), affecting two key events linked to immunomodulation, tumor cell metabolism and lactate production, and increasing IL-6 secretion. Through proteomic analysis using label-free quantification and ORBITRAP we assessed IVM's effect on 1312 proteins, with 17 up-regulated and 8 inhibited proteins deeply involved in immune evasion, proliferation and intracellular transport, nucleic acid metabolism, and cell cycle regulation.

In vivo experiments using immunocompetent BALB/c mice bearing CT-26 tumors showed significant tumor growth reduction with combined IVM (5 mg/kg) and α -PD1 (10 mg/kg) therapy, demonstrating good tolerability. S.c. preimmunization with ex-vivo IVM-treated CT-26 cells one week before s.c. re-challenge reduced tumor incidence and progression rates. Repurposed IVM could enhance immunoreactivity and therapeutic response to ICIs in "cold" CRC tumors, expanding treatment possibilities.

Keywords: Ivermectin, Colorectal cancer, pMMR, immunotherapy, α -PD1, adjuvant therapy.

Autores

Llavona, Candela
Solernó, Luisina
González Morán, Florencia
Ledesma, Martín
Martínez, Giselle
Segatori, Valeria
Alonso, Daniel
Garona, Juan

Contacto:

Candela Llavona:
llavonacandela@gmail.com

Centro de Medicina Traslacional (Unidad 6)
Hospital de Alta Complejidad "El Cruce".
Centro de Oncología Molecular y
Traslacional, Universidad Nacional de
Quilmes.
CONICET, Argentina.

Abreviaturas:

ABCB1 - Glucoproteína-P
ATP - Adenosín Trifosfato
CCR - Cáncer colorrectal
CALR - Catreticulina
COAD - Adenocarcinoma colónico
DE - Desvío estándar
ELISA - Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
HPLC - Cromatografía líquida de alta eficacia
ICI - Inhibidores de checkpoints inmunológicos
i.p - Intraperitoneal
IVM - Ivermectina
KRAS - Kirsten rat sarcoma virus
LVC - Logaritmo de veces de cambio
MCI - Muerte celular inmunogénica
MMR - Mecanismo de reparación de errores tipo mismatch
MSI-H - Inestabilidad de microsatélites alta
MSI-L - Inestabilidad de microsatélites baja
MSS - Estabilidad de microsatélites
OASL - Oligoadenilato sintasa-like
PAK1 - Proteína quinasa 1
READ - Adenocarcinoma rectal
RPMI - Medio Roswell Park Memorial Institute
s.c - Subcutáneo
SEM - Error estándar de la media
SFB - Suero Fetal Bovino

1 Introducción

Con una incidencia de aproximadamente 1 millón de casos y una mortalidad de más de 500.000 pacientes por año, el cáncer colorrectal (CCR) representa un serio problema de salud a nivel mundial.⁽¹⁾ En Argentina, el CCR se ubica como el segundo cáncer más frecuente al concentrar el 13% del total de tumores malignos ⁽²⁾ con una estimación de 5200 nuevos casos anuales para la Provincia de Buenos Aires ⁽³⁾. Lamentablemente, un cuarto de los pacientes con CCR son diagnosticados con enfermedad metastásica (principalmente afectando hígado y pulmón), asociándose a un peor pronóstico y baja respuesta a terapia ⁽¹⁾.

Aproximadamente el 15% de los CCR muestran deficiencia en la maquinaria de reparación de errores de tipo mismatch (dMMR) lo cual resulta en una alta inestabilidad microsatelital (MSI-H)⁽⁴⁾. Debido a la pérdida de la función de la maquinaria MMR, estos tumores acumulan una alta carga mutacional con abundantes neoantígenos que atraen a los linfocitos infiltrantes de tumor ⁽⁵⁾. Aquellos pacientes que presentan este subtipo molecular de CCR, incluidos aquellos en estadio metastásico, son los que responden favorablemente a inhibidores de checkpoints inmunológico (ICI), tales como α -PD1 y α -CTLA-4⁽⁶⁻⁸⁾. Contrariamente a lo que ocurre en pacientes con dMMR, las terapias basadas en ICI no mostraron beneficios en aquellos que poseen una maquinaria MMR competente (pMMR), asociándose las bajas tasas de respuesta a tumores poco inmunorreactivos con una limitada presencia de células inmunes efectoras ^(8, 9).

Teniendo en cuenta este escenario, se propuso la búsqueda de estrategias farmacológicas novedosas asociadas a incrementar la eficacia antitumoral de ICIs en CCR avanzado a través de diversos mecanismos que incluyen el incremento de inmunoreactividad e infiltrado linfocitario antitumoral y la modulación de mecanismos de resistencia a terapia. En este contexto, el reposicionamiento de drogas surge como un paradigma terapéutico sumamente interesante. El reposicionamiento de drogas en oncología involucra el uso de drogas previamente aprobadas en otras aplicaciones médicas no oncológicas ⁽¹⁰⁾. Dados sus perfiles toxicológicos conocidos, amplio uso clínico y bajos costos de producción, su validación e implementación suelen ser mucho más rápidos y costo-efectivos en comparación con el desarrollo de novo de agentes antineoplásicos ^(11, 12).

Particularmente la ivermectina (IVM) es un antiparasitario de amplio espectro muy utilizado en humanos y en veterinaria que afecta al sistema nervioso central de los parásitos ⁽¹³⁾. En cuanto a la actividad antitumoral previamente reportada sus mecanismos de acción son múltiples, e incluyen la inhibición de la glucoproteína-P (P-gp, también conocida como MDR1/ABCB1) y reversión del fenotipo de multiresistencia a drogas, la inhibición del funcionamiento mitocondrial, e inducción de la autofagia ⁽¹⁴⁾. Se ha reportado que la IVM es capaz de disminuir la supervivencia en células tumorales de cáncer ovárico y glioblastoma bloqueando las vías de ERK/AKT/NK-kB y de AKT/mTOR ^(15, 16), así como también sinergizar con distintos agentes quimioterapéuticos ⁽¹³⁾. De manera interesante, en modelos preclínicos de cáncer mamario, IVM induce muerte celular inmunogénica (MCI) incrementando el infiltrado de células T. Su efecto inmunomodulador se vincula a la reducción de células mieloides en el microambiente tumoral logrando un incremento de células T efectoras por sobre células T regulatorias ⁽¹⁷⁾. Hasta el momento, el uso de IVM como terapia coadyuvante inmunomoduladora en CCR en combinación a ICIs nunca fue explorada.

Con todo esto en cuenta, se propuso en el presente trabajo explorar la actividad antineoplásica de IVM, particularmente en combinación inmunoterapia basada en α -PD1, empleando un modelo tumoral experimental de CCR altamente agresivo y metastásico con poca respuesta a quimioinmunoterapia.

2 Materiales y métodos

En el presente trabajo se emplearon un panel de metodologías celulares y moleculares con el fin de caracterizar los efectos antineoplásicos e inmunomoduladores de la IVM sobre CCR. Luego, empleando modelos animales se exploraron los mecanismos de acción de la droga de reposicionamiento, evaluando su efecto combinatorio con inmunoterapia basada en ICIs y su capacidad de inducir inmunidad protectora a través de MCI. Para dichos fines se usó una línea celular de CCR caracterizada por su alta agresividad.

Línea celular:

Se utilizó la línea de carcinoma colorrectal CT-26.wt (ATCC® CRL-2638, singénica para ratones BALB/c, metastásica, KRASmut y pMMR). La misma fue mantenida en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de SFB, 80 µg/ml de gentamicina y glutamina 2mM.

Ensayos in vitro:

Se evaluaron los efectos IVM (Elea-Phoenix) sobre distintos eventos celulares que se vinculan a agresividad y modulación del sistema inmune. Se estudió mediante ensayos de proliferación celular a 72 h el efecto citostático de la droga sobre células murinas de CCR, explorando un rango de concentraciones de 1-50 µM. Los cultivos celulares tumorales pertenecientes al grupo control fueron expuestos a vehículo salino (PBS). Además, se estudió el impacto de IVM sobre el metabolismo celular y la secreción de moléculas asociadas a inmunoreactividad y respuesta a ICI. Para esto se evaluó, mediante ensayos de colorimetría, la producción de lactato y la actividad reductora mitocondrial de las células luego de 16 h de exposición a IVM, y mediante citometría de flujo y el uso del kit "BD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit", se estudió la modulación de IVM sobre la producción de IL-6. Además, la producción de esta citoquina fue evaluada mediante la técnica de ELISA. Con el objetivo de explorar potenciales vías de señalización celular y mecanismos moleculares involucrados en el accionar anti-CCR de la IVM, se valoró la modulación a nivel proteoma mediante espectrometría de masa **MSMS acoplada a nano-HPLC (Orbitrap)**. Se puso especial foco en vías asociadas a inmunoevasión, proliferación y supervivencia, diseminación metastásica y mecanismos de resistencia a drogas, y se llevó a cabo mediante colaboración con CEQUIBIEM, FCEN, UBA. Para este análisis se utilizaron técnicas estadísticas univariadas con el fin de identificar aquellas proteínas que se encuentran diferencialmente expresadas (DEP) entre los grupos y técnicas multivariadas para verificar la capacidad de las DEP seleccionadas para diferenciar en los grupos correspondientes. El valor de corte se definió en 2 para proteínas sobreexpresadas y en -2 para proteínas subexpresadas. Además, se calculó el valor de la potencia del t-test, usando un 80% como valor de corte. Una proteína se consideró DEP si el valor del t-test era menor a 0.05 y la potencia del t-test mayor a 80%. Por último, los genes se mapearon contra bases de datos de funciones conocida, detectándose los términos estadísticamente significativos. Específicamente, se utilizó la base de datos de Gene Ontology (GO función molecular, GO componente celular y GO proceso biológico).

Animales.

Se adquirieron ratones BALB/c de 8 semanas de edad con un peso de aproximadamente 23 g del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina) y, después de la aleatorización, se alojaron 5 ratones por jaula en nuestro Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Se proporcionó alimento y agua ad libitum y se monitoreó diariamente el estado de salud general de los animales. Todos los protocolos con animales se han llevado a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio adoptada por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. (Publicaciones NIH No. 8023, revisada en 1978) y fueron aprobados por nuestro Comité institucional de Cuidado de Animales UNQ- CICAL (Resolución CD CyT N°075/14). Los resultados de los estudios en animales se informaron siguiendo las pautas internacionales ARRIVE. El diseño experimental se llevó a cabo mediante calculadora muestral GRANMO.

Ensayos in vivo:

Para el modelo de progresión tumoral primaria, se inyectaron a nivel subcutáneo (s.c.) 2,5x10⁵ células CT-26 en el flanco derecho de los ratones. Se utilizaron 4 animales por grupo experimental, con una tasa de prendimiento del 100% de los animales a día 17, confirmado mediante palpación manual diaria. Los diámetros de los tumores (largo y ancho) se registraron 3 veces por semana utilizando un calibrador digital para evaluar el crecimiento del tumor. El volumen tumoral a lo largo del protocolo se calculó mediante utilizando la fórmula $\pi/6 \times \text{Largo} \times \text{Ancho}^2$. Durante el protocolo de progresión tumoral también se evaluó el peso de los animales y las tasas de crecimiento tumoral, las cuales representan las pendientes de las regresiones lineales de las curvas de crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

Por su parte, se empleó un modelo de colonización metastásica experimental a pulmón por vía hemática, tras inocular 1x10⁵ células CT-26 en medio RPMI-1640 libre de SFB en la vena lateral de la cola de ratones inmunocompetentes BALB/c. Se utilizaron 8 o 9 animales por grupo experimental. Todos los animales desafiados desarrollaron nódulos tumorales secundarios en pulmón, sean pequeñas metástasis (< 2 mm) o macronódulos (\geq 2 mm), a día 25. Adicionalmente, se confirmó mediante histopatología el establecimiento de micrometástasis pulmonares a partir de tan solo 7 días post-desafío, utilizando este dato previo como criterio de inicio de tratamiento.

Con el fin de estudiar el efecto combinatorio de IVM con inmunoterapia basada en α -PD1, una semana luego del desafío tumoral (en caso del protocolo de metástasis experimental), o a día 17 (en caso del protocolo de progresión tumoral subcutánea), se dió comienzo al tratamiento con IVM administrando a los animales 5 veces por semana, con una dosis de 5 mg/kg/día i.p. y 3 administraciones totales de α -PD1 en dosis de 10 mg/kg/día i.p. Los animales pertenecientes al grupo experimental control recibieron los respectivos vehículos salino (PBS) en volúmenes equivalentes vía i.p.

La dosificación en animales se determinó según estudios traslacionales previos (17, 18) y mediante extrapolación de dosis utilizando el método de "dosis por factor" basado en escalas alométricas, siguiendo las pautas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (19). Una dosis de IVM de 0.4 mg/kg/día se tomó como dosis de referencia (20-22) y se multiplicó por 12,3 para la conversión de humanos a ratones. La dosis equivalente en ratones se redondeó 4,9 a 5 mg/kg/día para facilitar la preparación y administración de fármaco.

Una vez finalizado el tratamiento se sacrificaron los animales de los distintos protocolos mediante dislocación superficial (día 33 o 25, respectivamente). Para el protocolo de progresión metastásica, luego de realizar la necropsia y la recuperación de los pulmones colonizados, los mismos fueron inmersos en solución Bouin, conteniendo ácido pícrico, formaldehído y ácido acético, para facilitar la cuantificación de nódulos pulmonares superficiales empleando lupa de disección, permitiendo su clasificación según diámetro y la identificación de macrometástasis (> 2mm).

Paralelamente, para evaluar si como parte de su mecanismo de acción antineoplásica la IVM induce MCI e inmunidad protectora, se llevaron a cabo dos protocolos de pre-inmunización en donde, una semana previa al desafío tumoral endovenoso (6 animales) o subcutáneo (4 animales), se inyectaron a los animales en el s.c. con 7,5 x 10⁵ células CT-26 moribundas que fueron expuestas in vitro a concentraciones citotóxicas elevadas de IVM (100 µM durante 24 h). En paralelo con la inyección s.c., la ausencia total de viabilidad de las células tratadas con IVM, también empleadas para los protocolos de pre-inmunización, fue confirmada mediante ensayo de crecimiento celular tumoral a 72 h.

Estadística. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism Software, USA). Para comparaciones entre 2 grupos se empleó el test Student t o el Mann Whitney, dependiendo de la distribución paramétrica o no-paramétrica de los valores, respectivamente. Para comparaciones entre 3 o más grupos experimentales se utilizó ANOVA o su prueba equivalente no paramétrica, test de Kruskal-Wallis. Posteriormente, se utilizó como test la prueba de Dunnett, la de Tukey, la comparación de los intervalos de confianza para la media al 95% (ANOVA) o la prueba de Dunns (Kruskal-Wallis). Los datos de ensayos in vitro o moleculares corresponden a al menos 2 o 3 experimentos independientes a menos que se indique lo contrario. Los datos se presentaron como media \pm desviación estándar (DE) o error estándar de la media (SEM), a menos que se indique lo contrario. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0,05$.

3 Resultados

En primer lugar, con el objetivo de valorar en muestras de pacientes los blancos reportados de IVM, se utilizó la plataforma GEPIA2, para evaluar la expresión de dichos blancos en tejido colónico y rectal. Se encontró que los blancos Calreticulina (CALR), Oligoadenilato sintasa-like (OASL), Glucoproteína-P (ABCB1) y Proteína quinasa 1 (PAK1) en tejido tumoral COAD/N=318 (rojo) y READ/N=349 (verde) se encuentran sobreexpresados, en comparación con tejido normal (gris) (Figura 1A). Además, se observó que estos blancos presentan una expresión comparable, y en algunos casos significativamente mayor, al contrastar los diferentes subtipos moleculares de alta inestabilidad (MSI-H) y estabilidad o baja inestabilidad microsatelital (MSS/MSI-L) (Figura 1B).

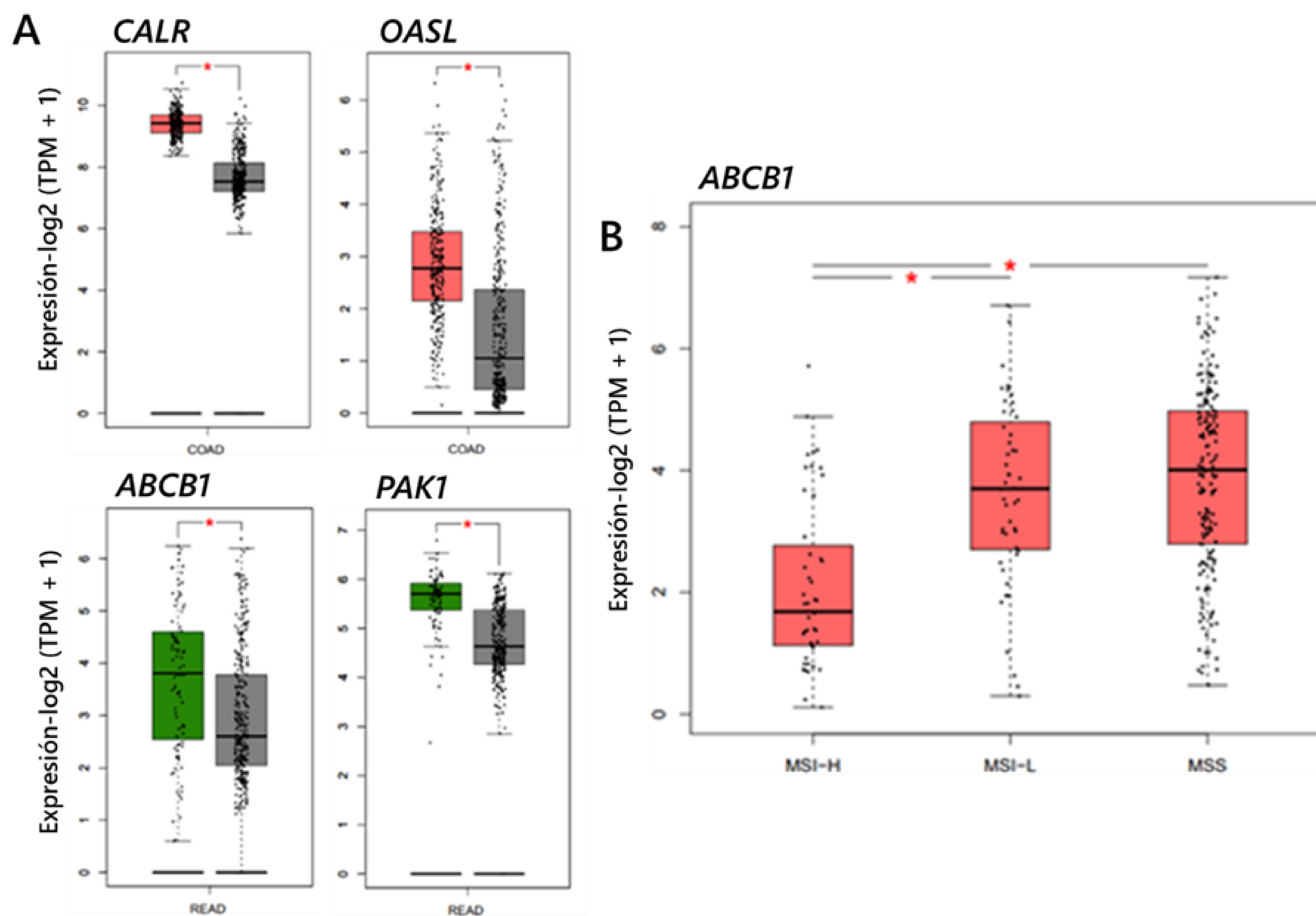


Figura 1. Expresión de blancos moleculares de Ivermectina en cáncer colónico y rectal mediante la plataforma GEPIA2. A. Expresión diferencial de los blancos Calreticulina (CALR), O ligoadenilato sintasa-like (OASL), Glucoproteína-P (ABCB1) y Proteína quinasa 1 (PAK1) en tejido tumoral COAD/N=318 (rojo) y READ/N=349 (verde) en comparación con Normal (gris). * $p < 0,05$. T-test. B. Grado de expresión de ABCB1 significativamente superior al contrastar los subtipos moleculares MSI-L o MSS versus MSI-H. * $p < 0,05$. ANOVA

In vitro, se exploró la sensibilidad de la línea a IVM y se calculó la concentración inhibitoria 50 mediante ensayos de proliferación celular a 72 h, obteniéndose un valor de 11 μM (Figura 2A). Además, utilizando concentraciones sub-óptimas de IVM (7,5 μM), se llevaron a cabo ensayos de metabolismo, obteniéndose como resultado una disminución significativa de la producción de lactato ($p < 0,0001$), y una reducción en la actividad reductora mitocondrial ($p < 0,05$), asociado a la actividad citostática de la droga (Figura 2B, C). Adicionalmente, mediante citometría de flujo se analizó la presencia de las citoquinas secretadas al medio por las células tumorales, luego de una incubación de 24 h con IVM, encontrando un aumento significativo en la interleuquina 6 (IL-6) en contraste con el grupo control ($p < 0,05$), siendo el incremento sobre la secreción de la misma confirmada mediante la técnica de ELISA ($p < 0,0001$) (Figura 2D).

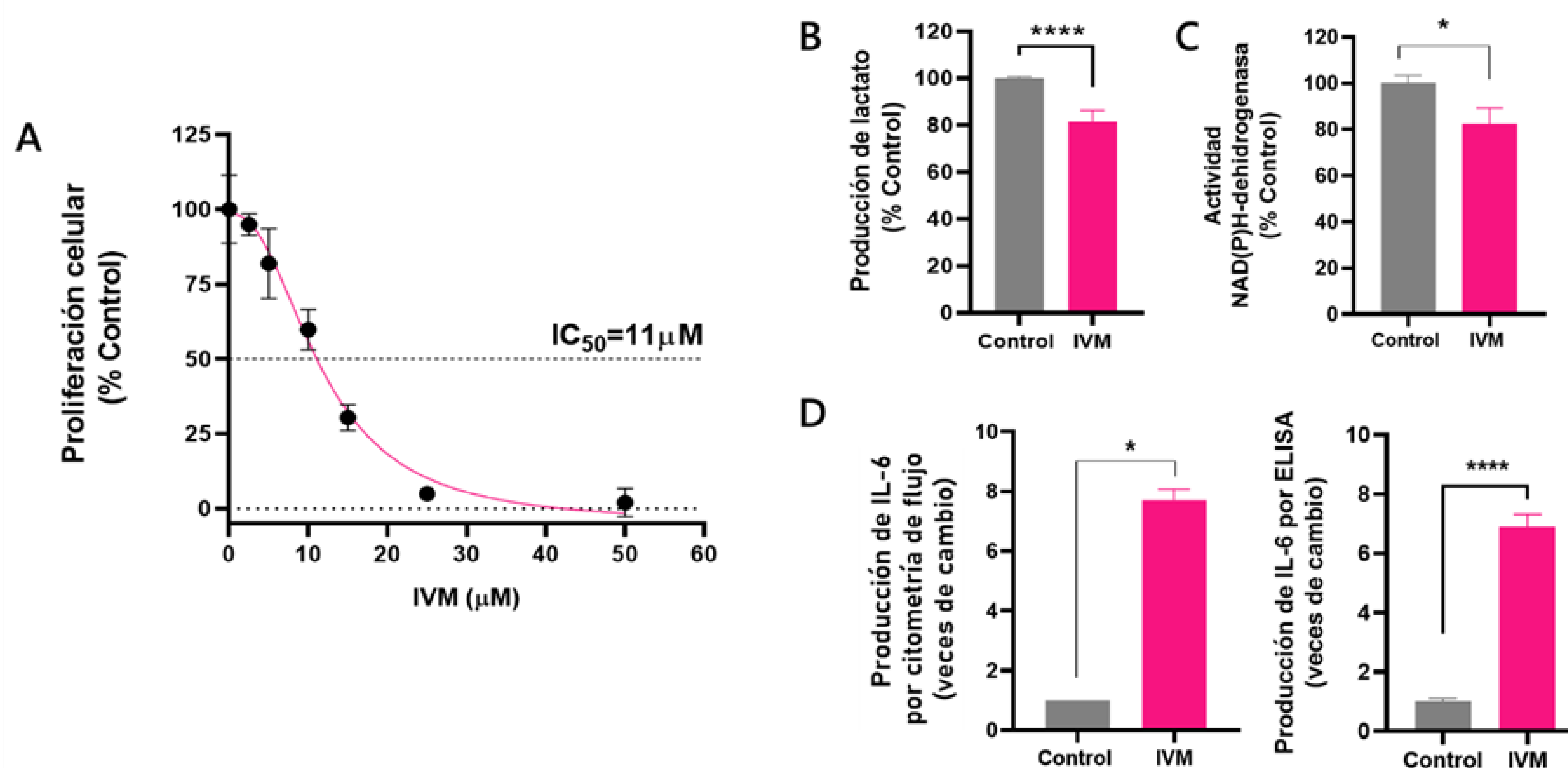


Figura 2. Impacto de Ivermectina sobre crecimiento celular, metabolismo y producción de citoquinas en células de cáncer colorrectal. A. Evaluación de la actividad citostática de ivermectina (IVM) y obtención de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) mediante ensayos de proliferación celular a 72hs. B. Efecto de IVM sobre la producción de Lactato y C. actividad reductora mitocondrial. D. Evaluación de la producción de IL-6 luego del tratamiento de células CT-26 con IVM mediante citometría de flujo y ELISA. Data presentada como promedio \pm SEM. Suma de 2 o 3 réplicas experimentales. N=5/réplica experimental independiente. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ vs. control. T-test.

Para poder estudiar de manera más abarcativa la expresión proteica de células CT-26 expuestas a IVM in vitro, y su vínculo con la modulación de distintos procesos biológicos y vías moleculares de señalización, se realizó una extracción de proteínas de las células luego de su exposición a la droga, y se llevó a cabo un ensayo de proteómica masiva mediante espectrometría de masa MS-MS acoplado a HPLC (Orbitrap) (Figura 3A). Se obtuvieron un total de 25 proteínas diferencialmente expresadas (DEPs), donde 17 resultaron sobre-expresadas y 8 significativamente inhibidas ($p < 0.05$ y $LVC > 2$ o < -2) (Figura 3B,C). Estas proteínas fueron clasificadas mediante análisis Gene Ontology (GO) dentro de procesos biológicos y función molecular, donde la mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente participan en procesos como el transporte intracelular, el metabolismo de los ácidos nucleicos, la dinámica del citoesqueleto e inmunoevasión (Figura 3D-G).

Considerando su impacto pronóstico y rol biológico significativo en CCR, además de su involucramiento en procesos de movilización de sistema inmune, y modulación de la inflamación y reclutamiento linfocitario, se propone profundizar a futuro el estudio y validación de la Calreticulina, los factores de replicación MCM4 y 7, y la sintasa 2 de prostaglandina (Figura 3H).

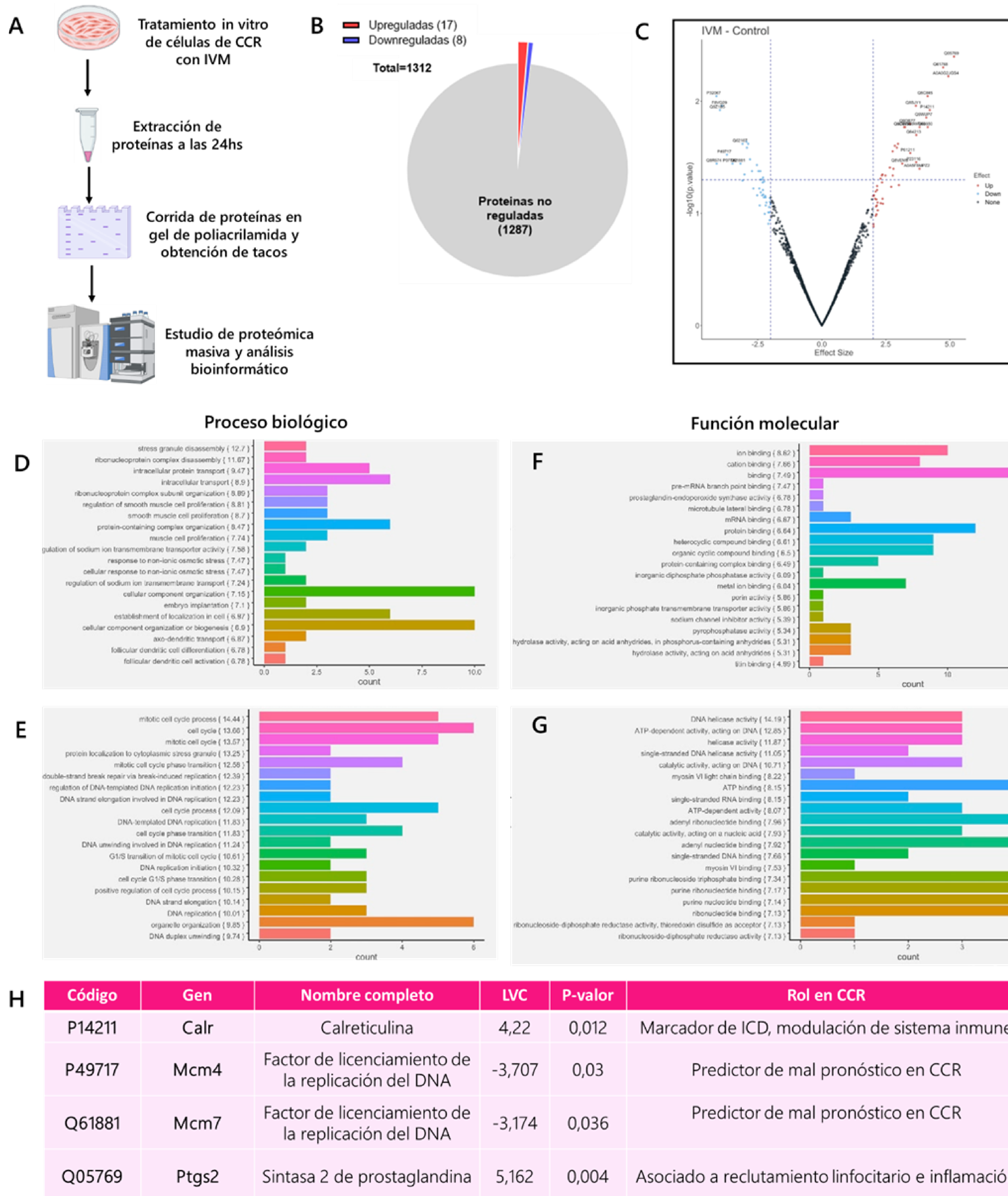


Figura 3. Expresión proteica asociada a la actividad antitumoral de Ivermectina. A. Esquema de protocolo de extracción proteica a partir de células en cultivo, y posterior análisis por ORBITRAP. B. Proteínas diferencialmente expresadas luego de la exposición a ivermectina. C. Volcano plot de proteínas reguladas, en la figura los puntos rojos indican las proteínas significativamente sobreexpresadas, y en azul las inhibidas significativamente. Los puntos negros son las proteínas sin cambios significativos. D y E. Clasificación según proceso biológico por Gene Ontology (GO) de las proteínas up-reguladas y las proteínas down-reguladas respectivamente. F y G. Clasificación según función molecular por GO, de las proteínas up y down-reguladas respectivamente. H. Proteínas destacadas de interés por su rol en CCR. Los valores de LVC indican si las mismas se encuentran sobreexpresadas (positivo), o inhibidas (negativo). Suma de 3 réplicas independientes por cada grupo experimental.

Para evaluar el efecto anti-CCR de IVM como monoterapia y su potencial combinación con inmunoterapia basada en ICLs, se llevaron a cabo distintos protocolos in vivo. Por un lado, se evaluó el tratamiento combinado de IVM con α -PD1 sobre la progresión tumoral, para lo cual se inyectaron células CT-26 en ratones BALB/c y se valoró la efectividad terapéutica de la administración sostenida de IVM (5 mg/kg i.p., 5 veces por semana) y α -PD1 (10 mg/kg i.p., 1 dosis semanal, durante 2 semanas)(Figura 4A). Como resultado, se observó que el tratamiento combinado de IVM con el ICI α -PD1 logró reducir en un 75% la progresión tumoral evaluada mediante tasa de crecimiento versus el control, y un 63% y 40%. versus las monoterapias de IVM y α -PD1 respectivamente (Figura 4B)(Tasa de crecimiento tumoral; Grupo control: $104,4 \pm 25,6$; IVM: $74,35 \pm 13,60$; α -PD1: $50,06 \pm 10,35$; Combinación IVM + α -PD1: $26,46 \pm 8,65$. Promedio mm³/día \pm DE, $p < 0.0001$). Adicionalmente y a nivel descriptivo, al final del protocolo (día 33) se registraron volúmenes tumorales de 1600 ± 1400 ; $1102 \pm 656,8$; $669,8 \pm 413,4$ y $404 \pm 461,9$ para control, IVM, α -PD1 e IVM + α -PD1, respectivamente.

Por otro lado, se evaluó el impacto del tratamiento combinado de IVM con α -PD1 sobre la colonización y progresión metastásica a pulmón. La combinación de fármacos logró reducir completamente la presencia de macronódulos en pulmón en comparación con el control y las monoterapias (Número de macrometástasis en pulmón, $2,33 \pm 3,04$; $0,33 \pm 0,71$; $0,87 \pm 1,45$ y 0 ± 0 , para control, IVM, α -PD1 e IVM + α -PD1 respectivamente, Promedio \pm DE, $p < 0.01$)(Figura 4C). En términos de incidencia, si bien la totalidad de los animales presentaron nódulos metastásicos, en el caso de macronódulos metastásicos con diámetro $>$ a 2 mm, se observó una incidencia de un 77% de animales portadores de lesiones en el control (7/9), 22% con IVM (2/9), 38% con α -PD1 (3/8) y 0% luego del tratamiento combinado (0/8).

Cabe destacar que el tratamiento fue bien tolerado en ambos protocolos y no se observaron signos evidentes de toxicidad, tomando como parámetro el peso de los animales. (Peso corporal en protocolo de progresión tumoral en gramos: $28,2 \pm 0,66$; $28 \pm 0,79$; $26,8 \pm 0,68$ y $26,8 \pm 0,50$, y peso corporal en protocolo de metástasis experimental en gramos: $22,5 \pm 0,13$; $22,2 \pm 0,31$; $22,7 \pm 0,24$ y $22,3 \pm 0,52$, para control, IVM, α -PD1 e IVM + α -PD1 respectivamente). No se observaron cambios en el consumo de agua o alimentos en ninguno de los grupos experimentales.

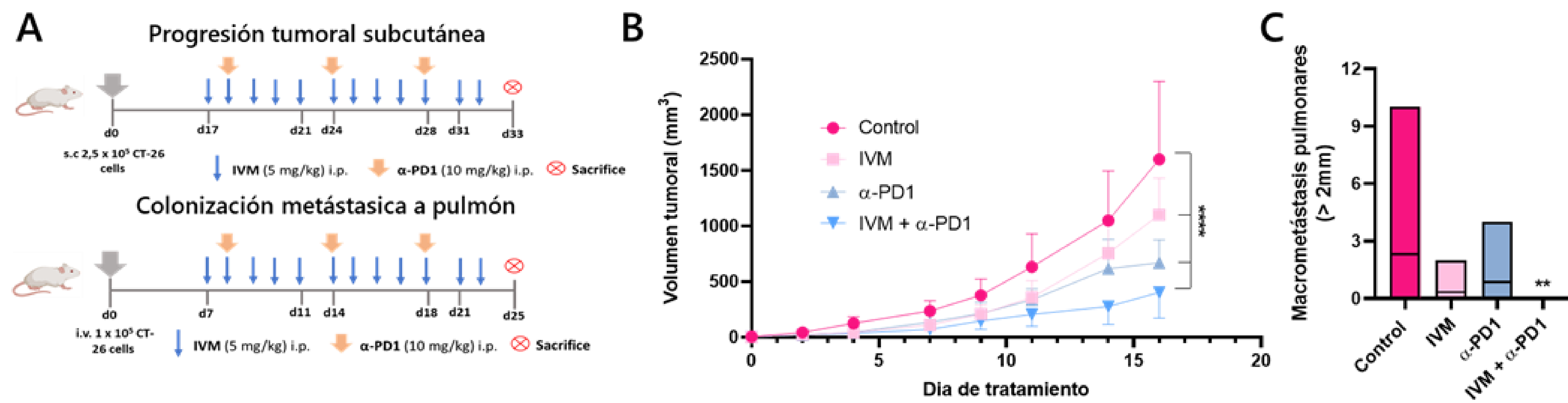


Figura 4. Impacto del tratamiento combinado de Ivermectina sumado a inmunoterapia α -PD1 sobre la progresión tumoral primaria y metastásica de células CT-26. A. Esquemas de tratamiento para los protocolos de progresión tumoral (arriba) y metástasis (abajo), utilizando dosis clínicamente relevantes de ivermectina (IVM) (5mg/kg i.p.) y α -PD1 (10mg/kg i.p.). B. Impacto del tratamiento con IVM y α -PD1 sobre la tasa de crecimiento tumoral en un modelo de progresión tumoral subcutánea (N=4 animales/grupo experimental). **** $p < 0.0001$ vs. control Ordinary one way-ANOVA + Tukey's todos los tratamientos vs. control, IVM + α -PD1 vs. IVM y IVM + α -PD1 vs. α -PD1. C. Efecto de monoterapias y combinación de IVM con α -PD1 sobre la formación de macronódulos metastásicos en pulmón. (N=8 o 9 animales/grupo experimental) ** $p < 0.01$ Kruskal Wallis test.

Paralelamente se evaluó el impacto de la pre-inmunización con células de CCR tratadas con concentraciones citotóxicas de IVM sobre el prendimiento y crecimiento tumoral primario, así como la colonización metastásica a pulmón. Para esto, se inyectaron en el flanco izquierdo de ratones BALB/c células CT-26 moribundas pre-tratadas in vitro con IVM a alta concentración (100 μ M, aproximadamente 10 veces el IC50) durante 24 h, y a la semana se realizó el desafío con células viables, siguiendo exactamente el mismo protocolo de generación de tumores como el usado en el ensayo de progresión de generación de metástasis experimentales en pulmón (Figura 5A). Los hallazgos vinculados al prendimiento y crecimiento tumoral, la incidencia de animales portadores de metástasis, y el número total de nódulos pulmonares, fue contrastado con animales control desafiados con células CT-26 para la generación de tumores o metástasis, sin haber recibido previamente pre-inmunización de células tumorales.

A día 17, se observó un prendimiento tumoral del 100% del grupo control (4/4), en contraste con tan solo un 25% de incidencia (1/4) de animales portadores de tumores primarios s.c. en el grupo pre-inmunizado ($p < 0.0001$). Complementariamente, tras hacer el seguimiento de toma y crecimiento extendido, a día 33 se evidenció una inhibición del 95% en la progresión tumoral s.c. (Figura 5B) al contrastar grupo control versus pre-inmunizado, que en ese momento presentaba un 50% de incidencia (2/4) de animales portadores de tumores (Volumen tumoral. Control: 1600 ± 1400 ; Pre-inmunizado: $150 \pm 133,4$. Promedio \pm DE. $p < 0,05$) (Figura 5B). Por su parte, en contraste con la incidencia del 100% (9/9) de metástasis en el grupo control, la pre-inmunización redujo significativamente la incidencia de metástasis pulmonares a un 33% (2/6) ($p < 0.0001$). También se observó una reducción significativa en el número total de metástasis en los ratones pre-inmunizados (Nódulos totales: $35,8 \pm 19,68$; $1,83 \pm 3,6$, para control y pre-inmunizado respectivamente, Promedio \pm DE, $p < 0.01$)(Figura 5C).

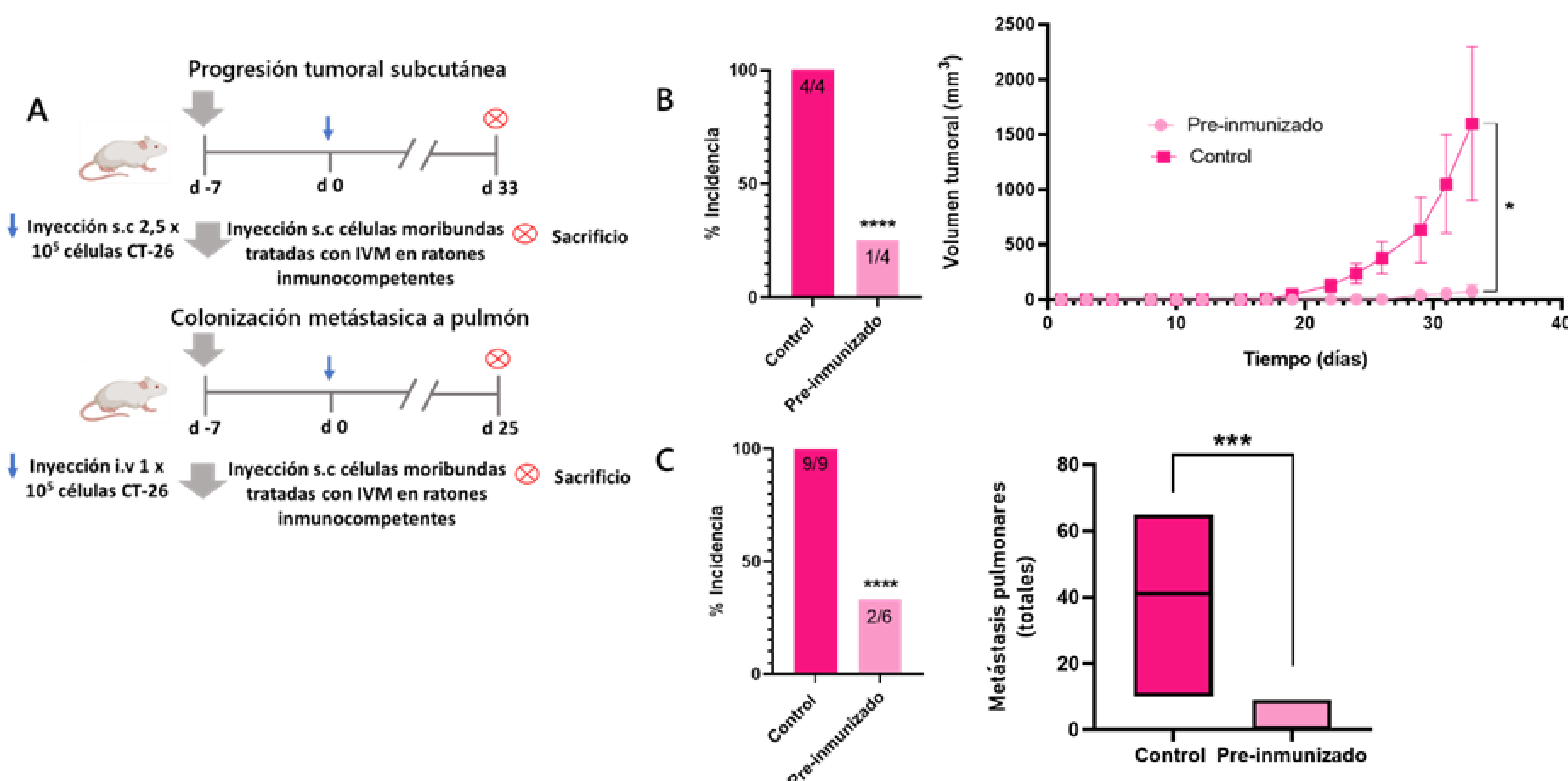


Figura 5. Efecto de la pre-inmunización con células CT-26 tratadas con concentraciones citotóxicas de Ivermectina sobre el crecimiento tumoral y colonización metastásica. A. Protocolos de pre-inmunización empleando células tumorales tratadas con alta concentración de ivermectina (IVM) para evaluar su impacto sobre progresión tumoral primaria (arriba) y desarrollo de metástasis pulmonares (abajo), utilizando dosis clínicamente relevantes de ivermectina (IVM) (5mg/kg i.p.) y α -PD1 (10mg/kg i.p.). B. Impacto en el porcentaje de incidencia a día 17 (izquierda) y la progresión tumoral (derecha) de tumores luego de la pre-inmunización con células CT-26 tratadas con IVM (100 μ M) (N=4 animales/grupo experimental). * $p < 0,05$, T-test, no pareado de una cola; **** $p < 0.0001$, test de proporciones, binomial de una cola, no paramétrico. C. Reducción en el porcentaje de incidencia a día final (izquierda) y número de metástasis pulmonares totales (derecha) de animales portadores de tumores secundarios luego de la pre-inmunización con células tumorales pretratadas con IVM. (N=6-9 animales/grupo experimental) *** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$, test de proporciones, binomial de una cola, no paramétrico.

4 Discusión

Se logró caracterizar de manera preliminar el efecto antineoplásico de IVM en un modelo de CCR con poca respuesta a quimioinmunoterapia, combinando la droga por primera vez con inmunoterapia basada en ICIs, α -PD1, obteniéndose resultados muy prometedores.

La combinación del antiparasitario con α -PD1 logró reducir significativamente la tasa de crecimiento tumoral en un modelo de progresión primaria, mejorando la eficacia de las monoterapias. Estos resultados se obtuvieron sobre un modelo tumoral pMMR típicamente “frio” y poco inmunorespondedor. Más allá de modular significativamente la progresión subcutánea de tumores altamente agresivos CT-26, IVM como monoterapia y especialmente en combinación con inmunoterapia basada en ICI, logró reducir dramáticamente la cantidad y tamaño de lesiones pulmonares secundarias inclusive en un escenario de metástasis ya establecidas. Haciendo uso de dosis clínica y farmacológicamente relevantes(15), IVM logró aumentar la sensibilidad de este tipo de tumores poco inmunoreactivos, a una terapia basada en ICIs.

Por su parte, el resultado obtenido a partir de la pre-inmunización de ratones BALB/c con células tratadas con concentraciones citotóxicas de la droga, logró bajar significativamente la incidencia de prendimiento tumoral y de progresión metastásica concluyendo que la vacunación empleando cultivos expuestos a altas concentraciones de IVM podría generar en los animales inmunidad protectora, inclusive a largo plazo. Toda esta evidencia, y según lo reportado en distintas guías de referencia nos llevaría a postular como posible mecanismo de acción de IVM a la MCI(23).

Se encontró una alta sensibilidad de la línea a IVM, confirmando su actividad citostática directa sobre células de CCR. Asimismo, y en relación a los mecanismos de acción de la droga, se verificó que la misma tiene un impacto significativo sobre fenómenos importantes en la modulación del microambiente tumoral e inmunoevasión, como lo es la producción de lactato y secreción de IL-6. Por un lado, es de conocimiento general que un aumento en la generación de lactato por parte de las células tumorales acidifica el entorno, por lo tanto, desfavorece el reclutamiento e infiltrado inmune al microambiente tumoral, consecuentemente favoreciendo el crecimiento tumoral y escape al sistema inmune. En este contexto, IVM logró reducir significativamente la producción de lactato, lo cual podría resultar en un mayor reclutamiento linfocitario al nicho tumoral. Por otro lado, se conoce que la IL-6 tiene un rol pivotal en procesos inflamatorios y mecanismos de inmunoevasión, muchas veces con efectos contrapuestos y contexto-dependientes. En este escenario, donde IVM tendría la capacidad de inducir MCI sobre células malignas y en consecuencia liberar una elevada cantidad de antígenos tumorales al microambiente, el incremento de una citoquina inmunoregulatoria tal como IL-6 podría mitigar fenómenos de inmunoevasión y favorecer el infiltrado inmune efector antitumoral, colaborando con el accionar de inmunoterapia basada en ICIs.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y el potencial de la droga junto con su combinación a inmunoterapias basadas en inhibidores de checkpoints, es necesario continuar explorando esta estrategia terapéutica, profundizando el estudio de la actividad combinatoria de IVM con α -PD1 en modelos ortotópicos, así como también su combinación con quimioterápicos de uso habitual en el tratamiento de CCR, como oxaliplatino, 5-fluorouracilo y doxorubicina.

5 Conclusión

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, puede concluirse que el agente reposicionado IVM como podría complementar e incrementar la eficacia de inmunoterapia basada en ICIs en tumores de CCR agresivos considerados “fríos” o de baja inmuno-reactividad, convirtiéndolos en tumores “calientes” o más inmunoreactivos. Este trabajo sienta las bases para continuar caracterizando los mecanismos de acción de IVM, tales como la inducción de MCI, la reversión de resistencia a drogas y la quimiosensibilización. Para eso se espera poder analizar marcadores de MCI, tales como expresión de calreticulina, pérdida de potencial de membrana en mitocondria, liberación de ATP, así como también poder evaluar la modulación del infiltrado linfocitario por parte de IVM en tumores primarios y nicho metastásico, y estudiar la potencialidad de la combinación de la droga de reposicionamiento con quimioterápicos utilizados para el tratamiento de CCR.

6 Bibliografía

1. Xi Y, Xu PJTo. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. 2021;14(10):101174.
2. Sierra MS, Forman DJCe. Burden of colorectal cancer in Central and South America. 2016;44:S74-S81.
3. Higa RJAGL. Cáncer colorrectal: epidemiología y prevención primaria. 2011;41(1):70-3.
4. Jin Z, Sinicrope FAJC. Prognostic and predictive values of mismatch repair deficiency in non-metastatic colorectal cancer. 2021;13(2):300.
5. Nature CGANJ. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. 2012;487(7407):330.
6. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. 2018;36(8):773-9.
7. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. 2017;18(9):1182-91.
8. Shek D, Akhuba L, Carlino MS, Nagrial A, Moujaber T, Read SA, et al. Immune-checkpoint inhibitors for metastatic colorectal cancer: a systematic review of clinical outcomes. 2021;13(17):4345.
9. Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec GJFii. Relationships between immune landscapes, genetic subtypes and responses to immunotherapy in colorectal cancer. 2020;11:369.
10. Zhang Z, Ji J, Liu HJCMC. Drug repurposing in oncology: Current evidence and future direction. 2021;28(11):2175-94.
11. Pantziarka P, Verbaander C, Huys I, Bouche G, Meheus L, editors. Repurposing drugs in oncology: From candidate selection to clinical adoption. Seminars in Cancer Biology; 2021: Elsevier.
12. Revon-Rivière G, Banavali S, Heississen L, Gomez García W, Abdolkarimi B, Vaithilingum M, et al. Metronomic chemotherapy for children in low-and middle-income countries: Survey of current practices and opinions of pediatric oncologists. 2019;5:1-8.
13. Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Diaz-Chavez J, Duenas-Gonzalez AJCC, et al. Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug. 2020;85:1153-63.
14. Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Dueñas-Gonzalez AJAocr. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. 2018;8(2):317.
15. Jiang L, Wang P, Sun Y-J, Wu Y-JJJoE, Research CC. Ivermectin reverses the drug resistance in cancer cells through EGFR/ERK/Akt/NF- κ B pathway. 2019;38(1):1-18.
16. Liu Y, Fang S, Sun Q, Liu BJB, communications br. Anthelmintic drug ivermectin inhibits angiogenesis, growth and survival of glioblastoma through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress. 2016;480(3):415-21.
17. Draganov D, Han Z, Rana A, Bennett N, Irvine DJ, Lee PPJNBC. Ivermectin converts cold tumors hot and synergizes with immune checkpoint blockade for treatment of breast cancer. 2021;7(1):22.
18. Melotti A, Mas C, Kuciak M, Lorente-Trigos A, Borges I, Ruiz i Altaba AJEmm. The river blindness drug I ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. 2014;6(10):1263-78.
19. Nair AB, Jacob SJJjob, pharmacy c. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. 2016;7(2):27.
20. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of escalating high doses of ivermectin in healthy adult subjects. 2002;42(10):1122-33.
21. Krolewiecki A, Lifschitz A, Moragas M, Travacio M, Valentini R, Alonso DF, et al. Antiviral effect of high-dose ivermectin in adults with COVID-19: A proof-of-concept randomized trial. 2021;37.
22. Smit MR, Ochomo EO, Aljayyousi G, Kwambai TK, Abong'o BO, Chen T, et al. Safety and mosquitocidal efficacy of high-dose ivermectin when co-administered with dihydroartemisinin-piperazine in Kenyan adults with uncomplicated malaria (IVERMAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. 2018;18(6):615-26.
23. Galluzzi L, Vitale I, Warren S, Adjemian S, Agostinis P, Martinez AB, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. 2020;8(1).