

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA**  
**Facultatea de Biologie și Geologie**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**TERAPIA ȚINTITĂ A PROCESELOR  
PROTUMORALE ASOCIATE MICROMEDIULUI  
CANCERULUI COLORECTAL CU AJUTORUL  
LIPOSOMILOR CU SIMVASTATINĂ**

**~Rezumat~**

**Conducător Științific**  
**PROF. DR. NICOLAIE DRAGOȘ**

**Doctorand**  
**LAVINIA LUCA (LUPUȚ)**

**CLUJ-NAPOCA**  
**2019**

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA**  
**Facultatea de Biologie și Geologie**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**TERAPIA ȚINTITĂ A PROCESELOR  
PROTUMORALE ASOCIATE MICROMEDIULUI  
CANCERULUI COLORECTAL CU AJUTORUL  
LIPOSOMILOR CU SIMVASTATINĂ**

**~Rezumat~**

**Conducător Științific**  
**PROF. DR. NICOLAIE DRAGOȘ**

**Doctorand**  
**LAVINIA LUCA (LUPUȚ)**

**CLUJ-NAPOCA**  
**2019**

## CUPRINS

Capitolul I. Introducere: Micromediul tumoral și terapia cancerului colorectal (CRC).....	9
1. Micromediul tumoral.....	10
1.1. Imunoeditare în cancer.....	10
1.2. Macrofagele asociate tumorii (TAMs).....	15
1.2.1. Macrofagele în inițierea tumorii.....	16
1.2.2. Fenotipurile macrofagelor.....	16
1.2.3. Originea macrofagelor asociate tumorii.....	18
1.2.4. Implicarea TAMs în angiogeneză.....	20
1.2.5. Rolurile TAMs în metastazarea tumorilor.....	21
1.2.6. Rolurile imunosupresoarea ale TAMs.....	22
1.2.7. TAMs ca ținte în terapia antitumorală.....	23
2. Terapii administrate în CRC.....	24
2.1. Chimioterapia convențională în CRC.....	25
2.1.1. Statinele ca noi candidați pentru terapia anticancer în CRC.....	28
2.2. Terapii țintite în CRC.....	30
2.2.1. Terapii de țintire pasivă.....	31
2.2.2. Terapii de țintire activă.....	32
Capitolul II. Obiective generale.....	34
Capitolul III. Macrofagele asociate tumorii favorizează proliferarea celulelor C26 de carcinom de colon murin într-o manieră dependentă de stresul oxidativ.....	35
1. Introducere.....	35
2. Materiale și metode.....	37
2.1. Linia celulară și condițiile de cultură.....	37
2.2. Co-cultura celulelor tumorale C26 și macrofage.....	37
2.3. Testul de proliferare celulară.....	37
2.4. Prepararea lizatelor celulare.....	38
2.5. Analiza western blot a exprimării și activării NF- $\kappa$ B.....	38
2.6. Analiza exprimării proteinelor angiogenice prin tehnica „array” pentru proteine.....	39
2.7. Determinarea cantitativă a malondialdehidei prin HPLC.....	40
2.8. Determinarea capacității antioxidante non-enzimatice totale.....	40
2.9. Măsurarea activității catalazei.....	40
2.10. Inhibiția funcției NADPH oxidazei.....	40
2.11. Analiza statistică.....	41
3. Rezultate.....	41
3.1. TAMs stimulează proliferarea celulelor C26 de carcinom de colon.....	41
3.2. Efectele anti-inflamatoare a TAMs asupra celulelor C26 de carcinom de colon.....	42
3.3. Efectele angiogenice ale TAMs asupra celulelor C26 de carcinom de colon.....	43
3.4. Efectele pro-oxidante ale TAMs asupra celulelor C26 de carcinom de colon.....	45
3.5. Rolul NADPH oxidazei în modularea acțiunilor protumorale ale TAMs asupra celulelor C26.....	47
4. Discuții.....	49
5. Concluzie.....	51
Capitolul IV. Dubla țintire in vivo a celulelor C26 de carcinom de colon și a proceselor protumorale de micromediul tumoral folosind simvastatina încorporată în liposomi.....	52
1. Introducere.....	52
2. Materiale și metode.....	53
2.1. Prepararea LCL-SIM.....	53
2.2. Linia celulară și modelul de tumoră murin in vivo.....	54
2.3. Evaluarea relației doză-răspuns.....	54
2.4. Evaluarea efectelor adverse la tratamentele efectuate.....	55
2.5. Efectele LCL-SIM versus SIM liberă asupra creșterii tumorale.....	55
2.6. Examinarea imunohistochimică a țesutului tumoral pentru evaluarea citotoxicității tratamentelor.....	55
2.7. Prepararea lizatelor din țesutul tumoral.....	56
2.8. Evaluarea producției intratumorale de NF- $\kappa$ B prin analiza western blot.....	56
2.9. Testarea producției de proteine angiogenice în tumori prin tehnica „array” pentru proteine.....	57

2.10. Determinarea cantitativă a malondialdehidei în tumori prin analiză HPLC.....	57
2.11. Analiza statistică. ....	57
3. Rezultate.....	58
3.1. Activitatea antitumorală a LCL-SIM: relația doză-răspuns.....	58
3.2. Efectele adverse.....	59
3.3. Efectele LCL-SIM versus SIM liberă asupra creșterii tumorale.....	59
3.4. Efectele citotoxice ale LCL-SIM asupra țesutului tumoral.....	60
3.5. Efectele tratamentului cu LCL-SIM asupra producției de NF-kB în carcinomul de colon C26 .....	61
3.6. Efectele LCL-SIM asupra angiogenezei tumorale.....	63
3.7. Efectul tratamentului cu LCL-SIM asupra stresului oxidativ tumoral.....	65
4. Discuții .....	65
5. Concluzie. ....	67
Capitolul V. Simvastatina liposomală sensibilizează carcinomul de colon C26 la efectele antitumorale ale 5-fluorouracilului liposomal in vivo.....	68
1. Introducere .....	68
2. Materiale și metode. ....	69
2.1. Prepararea LCL-FU și LCL-SIM.....	69
2.2. Linia celulară și modelul tumoral murin <i>in vivo</i> .....	69
2.3. Evaluarea activității antitumorale.....	70
2.4. Evaluarea producției unor proteine cu rol cheie în dezvoltarea tumorii prin tehnica western blot.....	70
2.5. Determinarea producției de proteine angiogenice/inflamatorii în tumori prin tehnica „array” pentru proteine.....	71
2.6. Cuantificarea malondialdehidei în tumorile de carcinom de colon C26.....	71
2.7. Măsurarea activității catalazei intratumorale.....	71
2.8. Determinarea capacității total antioxidante non-enzimatice în tumori.....	71
2.9. Analiza statistică. ....	71
3. Rezultate.....	72
3.1. Activitatea antitumorală după administrarea simultană și secvențială a 5-FU și SIM liposomale și libere.....	72
3.2. Efectele diferitelor tratamente asupra capacității anti-apoptotice a tumorilor.....	73
3.3. Efectele diferitelor tratamente asupra inflamației tumorale.....	74
3.4. Efectele diferitelor tratamente asupra angiogenezei asociate carcinomului de colon C26.....	76
3.5. Efectele terapiei combinate asupra stresului oxidativ intratumoral.....	79
4. Discuții .....	80
5. Concluzie .....	82
Capitolul VI. Concluzii generale și perspective.....	83
1. Concluzii generale.....	83
2. Perspective .....	84
3. Originalitatea tezei .....	84
Bibliografie .....	86
Lista publicațiilor incluse în teză.....	111
Lista publicațiilor neincluse în teză.....	111
Lista participărilor la conferințe.....	112
Lista cursurilor de formare.....	116
Fonduri .....	117
Mulțumiri .....	117

## LISTA ABREVIERILOR

**AUTC** – ariile de sub curbele de creștere tumorală  
**bFGF** – factorul de creștere fibroblastic bazic  
**CCL2** – chemokina CC ligand 2 ⇔ **MCP-1** – proteina chemoatractantă 1 pentru monocite  
**CHO** – colesterol  
**CRC** – cancer colorectal  
**DPPC** – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina  
**FasL** – ligand pentru receptorul letal Fas  
**G-CSF** – factorul de stimulare a coloniilor granulocitare  
**GM-CSF** – factorul de stimulare a coloniilor granulocitare și monocitare  
**IFN- $\gamma$**  – interferon- $\gamma$   
**IGF-II** – factorul II de creștere al insulinei  
**IL** – interleukină  
**IL-12p40** – IL-12 subunitatea p40  
**IL-12p70** – IL-12 subunitatea p70  
**LCL** – liposomi cu timp de circulație prelungit  
**LCL-SIM** – simvastatina încorporată în liposomi cu timp de circulație prelungit  
**LCL-5-FU** – 5-FU încorporat în liposomi cu timp de circulație prelungit  
**MDA** – malondialdehida  
**MIG** – monokina indusă de IFN- $\gamma$   
**MMP** – metaloproteinaze de matrice  
**MPEG-2000-DSPE** – N-(carbonil-metoxipoli(etilenglicol-2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamină (sare de Na)  
**PF-4** – factorul plachetar 4  
**ROS** – specii reactive de oxigen  
**SIM** – simvastatină  
**TAMs** – macrofage asociate tumorii  
**TGF- $\beta$**  – factorul de creștere și transformare tip  $\beta$   
**TIMP** – inhibitorul tisular al metaloproteinazei  
**TNF- $\alpha$**  – factorul necrozant  $\alpha$  al tumorilor  
**TPO** – trombopoietină  
**VEGF** – factorul de creștere al endoteliului vascular  
**5-FU** – 5-fluorouracil

**KEYWORDS:** cancer colorectal, macrofage asociate tumorii, liposomi cu timp de circulație prelungit, simvastatină, 5-fluorouracil.



## **Capitolul I. Introducere: Micromediul tumoral și terapia cancerului colorectal (CRC)**

Cancerul colorectal (CRC) este al treilea cel mai diagnosticat tip de cancer în rândul bărbaților, respectiv al doilea cel mai frecvent tip de cancer în rândul femeilor, numărându-se aproximativ 1.8 milioane de cazuri în 2018 (Bray și colab., 2018).

Cu toate că terapiile anticanceroase țintesc în principal celulele degenerate genetic, celulele din micromediul tumoral influențează și ele proliferarea, angiogeneza și metastazarea celulelor tumorale. Astfel, înțelegerea mecanismelor pe care se bazează relația dintre celulele sistemului imunitar din tumoră și celulele tumorale, este esențială în vederea dezvoltării unor noi terapii pentru CRC. Pe lângă implicarea în dezvoltarea tumorilor, celulele sistemului imunitar infiltrate în tumoră, în special macrofagele asociate tumorii (TAMs), mai participă și în dezvoltarea rezistenței la terapie. Astfel, investigarea mecanismelor prin care TAMs favorizează proliferarea celulelor de carcinom de colon C26, este unul dintre subiectele acestei teze.

Terapiile convenționale ale CRC țintesc celulele tumorale care sunt genetic instabile, iar în urma acumulării de mutații, porțiunea țintită de pe celulele tumorale de către medicament poate să sufere modificări. În consecință, țintirea proceselor protumorale mediate de micromediul tumoral, constituie o alternativă pentru a depăși această limitare a chimioterapiei convenționale. În plus, instalarea chimiorezistenței celulelor canceroase de colon și limitarea numărului de medicamente antitumorale aprobate, scot în evidență necesitatea dezvoltării unor noi agenți terapeutici care să acționeze ca sensibilizatori ai celulelor canceroase la acțiunea agenților chimioterapeutici convenționali, amplificând efectele lor antitumorale.

În prezenta lucrare, a fost testată eficacitatea monoterapiei cu simvastatină (SIM) agent terapeutic inovator în CRC, încorporată în liposomi cu timp de circulație prelungit (LCL-SIM), asupra unui model de carcinom murin de colon C26. De asemenea, în cel de-al treilea studiu, a fost evaluat potențialul LCL-SIM ca sensibilizator și agent antitumoral sinergic într-o terapie combinată cu 5-fluorouracil (5-FU) încapsulat în LCL (LCL-5-FU) asupra unui model de carcinom de colon C26 *in vivo*.

### **1. Micromediul tumoral**

Micromediul tumoral descrie celulele non-maligne (celule stromale) prezente în tumoră, alături de factori de creștere, molecule de semnalizare, enzime proteolitice, care interacționează cu celulele tumorale, favorizând creșterea tumorii, invazia, metastazarea, asigurând celulelor

tumorale protecție împotriva sistemului imunitar și contribuind la chimiorezistență (Swartz și colab., 2012). Aceste roluri importante ale micromediului tumoral în dezvoltarea tumorilor, au accentuat necesitatea țintirii terapeutice a componentelor micromediului tumoral, și nu numai țintirea celulelor tumorale.

În micromediul tumoral se află diferite tipuri de celule alături de celulele tumorale, precum, celule ale sistemului imunitar, fibroblaste, pericite, adipocite, celule endoteliale și limfatice (Balkwill F. R. și colab., 2012). Celulele stromale contribuie la semnalizarea implicată în proliferare, la efectele anti-apoptotice și pro-angiogenice, la evitarea supresorilor de creștere celulară și a sistemului imunitar, promovarea imortalității celulare, invazia, metastazarea și reprogramarea metabolismului energetic (Hanahan și Coussens 2012).

Printre celulele sistemului imunitar infiltrate în tumoră, TAMs sunt cele mai abundente și joacă un rol-cheie în inflamația asociată cancerului, fiind implicate în funcții protumorale precum proliferarea celulelor tumorale, angiogeneza tumorală, metastazarea tumorii și activitatea imunosuresoare (Noy și Pollard 2014, Solinas și colab., 2009).

Macrofagele sunt o componentă proeminentă a inflamației, ele fiind fie activate clasic – fenotip cunoscut ca macrofage M1, un fenotip proinflamator și antitumoral, sau activate alternativ – în fenotipul M2 sau apropiat de acest fenotip cu efecte anti-inflamatorii și protumorale. Macrofagele sunt celule plastice care se adaptează stimulilor din micromediu, adoptând astfel, diferite fenotipuri, fie ca răspuns la citokinele și chemokinele produse de celule (celule tumorale), fie ca răspuns la produșii eliberați de patogeni la locul inflamației.

TAMs sunt considerate ca un fenotip distinct M2, datorită funcțiilor protumorale exercitate, precum restructurarea matricei extracelulare și remodelarea tisulară, vindecarea rănilor și repararea țesutului, promovarea angiogenezei, acțiuni supresoare asupra imunității doândite și producerea de factori de creștere și supraviețuire (Sica și colab., 2006). Numeroase studii asociază acumularea TAMs în țesutul tumoral cu un prognostic negativ pentru pacienți (Noy și Pollard 2014). De aceea TAMs prezintă un interes major pentru imunoterapia în cancer.

Ajunse în tumoră, TAMs sunt supuse unei schimbări fenotipice importante induse de semnale provenite din micromediul tumoral, în final adoptând un fenotip protumoral și eliberând un spectru larg de citokine, chemokine și factori de creștere cu un impact important asupra angiogenezei tumorale prin inițierea acesteia (Albini și colab., 2005, Lin și Pollard 2007), asupra metastazării tumorii, remodelării matricei extracelulare (Condeelis și Pollard 2006, Pollard 2004), asupra imunosupresiei, astfel prevenind eliminarea celulelor tumorale de către sistemul imunitar (Balkwill F. și Mantovani 2001, Mantovani și colab., 2002, Sica și colab., 2000).



## **2. Terapii administrate în CRC**

Terapia CRC este reprezentată de terapii aplicate local precum intervenții chirurgicale și radioterapie, chimioterapie convențională și terapii țintite (Grothey și Sargent 2016).

**Chimioterapia convențională** a CRC se bazează pe diferite clase de agenți chimioterapeutici precum antimetaboliții (fluoropirimidine), inhibitori ai topoizomerazei (irinotecan), și derivați de platină (oxaliplatină). Acești agenți chimioterapeutici sunt administrați fie singuri, fie combinați între ei, fie cu alte substanțe care să le potențeze efectele lor terapeutice.

Fluoropirimidinele sunt o clasă de antimetaboliți care acționează prin încorporarea lor în ADN și ARN. **5-FU** este o fluoropirimidină care este convertită intracelular în trei metaboliți activi, acționând prin întreruperea sintezei ARN și inhibarea sintezei timidilat sintazei, necesară în sinteza ADN (Longley și colab., 2003).

Chimiorezistența este una dintre cele mai mari limitări ale chimioterapiei convenționale care cauzează insuccesul tratamentelor, iar heterogenitatea tumorilor este unul dintre factorii cauzatori (Cazin și colab., 1992). În chimioterapia CRC rezistența celulelor de cancer de colon la administrarea 5-FU este un exemplu de chimiorezistență (Violette și colab., 2002). Combinarea 5-FU cu alte medicamente care sensibilizează celulele de cancer de colon la 5-FU amplificându-i efectele citotoxice, reprezintă o depășire a limitării dată de chimiorezistență în terapia CRC. O altă soluție de a depăși această limitare este dezvoltarea de noi agenți terapeutici care să țintească procesele care promovează dezvoltarea CRC, nu numai țintirea celulelor maligne care dezvoltă rapid rezistență la agentul citotoxic. Statinele au potențialul de a îndeplini aceste cerințe.

**Statinele** sunt utilizate în mod frecvent ca agenți hipolipemianți în prevenirea bolilor cardiovasculare, acționând ca inhibitori competitivi ai HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A) reductazei, o enzimă limitantă în calea mevalonatului, implicat în biosinteza colesterolului (Alberts și colab., 1980, Sirtori 2014). Pe lângă proprietățile hipocolesterolemizante, statinele exercită efecte pleiotropice (Bellosta și colab., 2000). Dintre acestea, s-a observat că statinele au proprietăți antineoplastice, precum inhibarea creșterii și angiogenezei tumorale, inducerea apoptozei și efecte împotriva invaziei tumorale (Hindler și colab., 2006). SIM este un agent hipolipemiant aprobat de FDA. În plus, câteva studii au raportat proprietățile antitumorale ale SIM (Alupeș și colab., 2015, Gopalan și colab., 2013, Schointuch și colab., 2014, Stine și colab., 2016). Într-un studiu coordonat de Kodach și colab., a fost raportat faptul că SIM a crescut chimiosensibilitatea celulelor CRC la acțiunile 5-FU (Kodach și colab., 2011).

În ciuda potențialului antitumoral al acestor agenți, dozele de statine necesare pentru a exercita efecte antitumorale sunt substanțial mai mari decât dozele administrate pentru tratamentul

hipercolesterolemiei în practica clinică. Efectele adverse induse de statinele utilizate în doze mari, cu scopul de a obține efecte antitumorale, au fost raportate în câteva studii (Knox și colab., 2005, Thibault și colab., 1996) și sunt miopatia asociată statinelor, anorexie, diaree, oboseala și dureri abdominale (Gazzerro și colab., 2012). Strategia de a depăși aceste dezavantaje ar putea fi administrarea țintită spre tumoră a statinelor, limitând efectele adverse asupra țesuturilor sănătoase și măbind astfel doza de statine care ajunge în tumoră (Licarete și colab., 2015). Unul dintre sistemele de cărauși care ar putea fi utilizați sunt liposomii (Askarizadeh și colab., 2019).

Particularitățile arhitecturale ale vasculaturii tumorilor pot fi exploatate pentru a livra țintit medicamente încorporate în nanoparticule. Vasele de sânge ale tumorii prezintă pori a căror mărime este cuprinsă în intervalul de 10 până la 1000 nm, permeabilitatea crescută în aceste zone permit nanocăraușilor special realizați să extravazeze în spațiul interstițial (Torchilin 2000). Pe lângă permeabilitatea crescută a vaselor de sânge tumorale, drenajul limfatic deficitar facilitează acumularea nanocăraușilor în tumoră, fenomen numit și „efectul permeabilității și retenției crescute”(EPR) (Maeda și colab., 2009, Matsumura și Maeda 1986). Până să ajungă la tumoră, în circulația sanguină, nanocăraușii cu medicamentele antitumorale sunt expuși la sistemul reticuloendotelial (RES) care îi recunoaște și îi elimină. Pentru a evita recunoașterea și opsonizarea, nanocăraușii pot fi acoperiți cu polimeri inerti și astfel devin nanocărauși „ascunși”. De asemenea, pentru a putea extravaza prin vasele de sânge ale tumorii, nanocăraușii sunt produși la o mărime cuprinsă între 10 și 200 nm (Haley și Frenkel 2008).

Printre nanocăraușii folosiți pentru livrarea medicamentelor în terapia cancerului, sunt și liposomii – vezicule sferice cu bistrat fosfolipidic, care pot încorpora atât substanțe hidrofile (în faza apoasă) cât și substanțe lipofile (în bistratul lipidic) (Malam și colab., 2009).

**Liposomii cu timp de circulație prelungit** sunt utilizați atât în studii preclinice cât și în practica clinică (Gabizon 2001). Sunt liposomi grefați cu polimeri precum PEG (polietilenglicol) pentru evitarea opsonizării cu proteine din ser și recunoașterea de către RES, fiind numiți și liposomi „ascunși”. Prelungirea timpului de circulație permite LCL să se acumuleze la locul tumorii și să extravazeze în spațiul interstițial. În prezenta lucrare au fost utilizați LCL, ca și cărauși ai agenților antitumorali SIM și 5-FU.

Câteva formulări de liposomi au fost aprobate ca terapie pentru cancer, precum doxil (PEG-LCL cu doxorubicină). Pentru CRC metastatic avansat există două formulări liposomale care sunt în faza II a studiilor clinice, Aroplatin™ (analog similar oxaliplatinei în liposomi multilamelari) și LE-SN38 (irinotecan liposomal) (Bulbake și colab., 2017). În studiu preclinic LCL-oxaliplatina a indus apoptoză în celulele de CRC în comparație cu forma liberă (Yang și colab., 2011).

## **Capitolul II. Obiective generale**

Scopul acestei teze a fost dezvoltarea unei terapii antitumorale țintite bazată pe simvastatina încorporată în liposomi cu timp de circulație prelungit, capabilă să moduleze procesele coordonate de micromediul carcinomului de colon.

- **Primul obiectiv** al acestei teze a fost investigarea interacțiunii dintre TAMs și celulele de carcinom de colon C26, rezultatele putând fi exploatate pentru viitoare terapii anticanceroase.
- **Al doilea obiectiv** al acestei cercetări a fost testarea activității antitumorale a LCL-SIM asupra micromediului carcinomului de colon ca potențială terapie a CRC.
- **Al treilea obiectiv** al acestei teze a fost investigarea potențialului LCL-SIM de a amplifica activitatea antitumorală a LCL-5-FU într-un model de carcinom de colon murin *in vivo*.

## **Capitolul III. Macrofagele asociate tumorii favorizează proliferarea celulelor C26 de carcinom de colon murin într-o manieră dependentă de stresul oxidativ**

*[Acest capitol a fost publicat ca: Luput L, Licarete E, Sesarman A, Patras L, Alupei MC, Banciu M. Tumor-associated macrophages favor C26 murine colon carcinoma cell proliferation in an oxidative stress-dependent manner. Oncol Rep. 2017; 37(4):2472-2480. doi: 10.3892/or.2017.5466. O parte a acestei secțiuni conține rezultate parțial prezentate în disertație.]*

### **1. Introducere**

Rolul TAMs în dezvoltarea carcinomului de colon este încă controversată. De aceea prezentul studiu are scopul de a investiga procesele coordonate de TAMs care afectează proliferarea celulelor de cancer de colon. Pentru îndeplinirea acestui scop, macrofagele murine au fost co-cultivate cu celulele de carcinom de colon murin C26 într-un raport de densitate celulară care aproximează condițiile fiziologice ale dezvoltării carcinomului de colon *in vivo*. Astfel, au fost studiate efectele mediate de TAMs asupra angiogenezei, inflamației și stresului oxidativ care afectează capacitatea proliferativă a celulelor de carcinom de colon murin C26. Pentru a aprofunda înțelegerea mecanismului de implicare a TAMs în stresul oxidativ, principala enzimă pro-oxidantă a macrofagelor, NADPH oxidaza, a fost inhibată. Rezultatele noastre sugerează că efectele stimulative ale TAMs asupra proliferării celulelor C26 pot fi în principal legate de efectele pro-oxidante exercitate de NADPH oxidaza, care mențin capacitatea angiogenică și o anumită stare redox a micromediului tumoral. În plus, efectele anti-inflamatorii și pro-angiogenice ale TAMs asupra celulelor tumorale creează un micromediu favorabil pentru dezvoltarea și progresia carcinomului de colon C26. În concluzie, datele noastre au dovedit rolul protumoral al TAMs în dezvoltarea carcinomului de colon într-o manieră dependentă de stresul oxidativ și care potențează

capacitatea angiogenică a micromediului tumoral. Aceste date oferă o informație valoroasă pentru viitoare terapii țintite antitumorale bazate pe strategii de „reeducare” a TAMs.

## 2. Materiale și metode

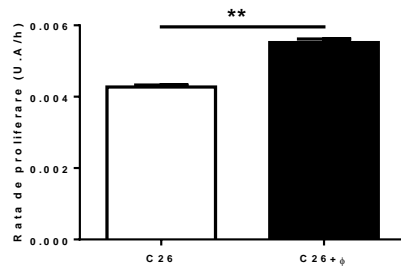
- **Celulele de carcinom de colon murin C26** (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germania) au fost cultivate în mediu RPMI-1640 (Lonza, Group AG, Basel, Elveția), suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat prin încălzire (HyClone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, SUA), în monostrat la 37<sup>0</sup> C în atmosferă umidificată conținând 5% CO<sub>2</sub>.
- **Co-cultura de celule tumorale C26 și macrofage** a fost efectuată prin cultivarea suspensiei de celule tumorale C26 peste monostratul de macrofage murine intraperitoneale (proaspăt recoltate din cavitatea peritoneală a șoarecilor Balb/c (Institutul Cantacuzino, București, România), fiind cultivate într-un raport de densitate celulară de 4:1 între celulele C26 și macrofage, asigurând o aproximare a condițiilor fiziologice de dezvoltare a carcinomului de colon *in vivo* (Herbeuval și colab., 2004). Experimentele au fost efectuate în acord cu regulile naționale și au fost aprobate de comisia de etică a universității pentru animalele utilizate în experimente (numărul de înregistrare 31375/06.04.2015).
- **Capacitatea proliferativă** a celulelor de carcinom de colon C26 a fost evaluată în cultură standard de celule C26 (1x10<sup>3</sup>/godeu) și de asemenea în co-cultură a celulelor C26 cu macrofagele murine peritoneale (raportul densității de 1:4). Celulele au fost cultivate în plăci cu 96 de godeuri și incubate pentru 48h. Rata prolidării a fost exprimată ca număr al unităților de absorbantă per ore de incubare (James și colab., 2015) și testate utilizând **testul colorimetric ELISA BrdU** (Roche Applied Science, Penzberg, Germania).
- **Culturile de celule au fost lizate cu tampon de liză** pentru **întreg lizatul celular** conținând tablete cu amestec de inhibitori de proteaze (Complete, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), iar pentru extracția nucleară, culturile de celule au fost lizate cu **tampon de extracție** conținând tablete cu inhibitori de proteaze și de fosfataze (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania) obținându-se **fracțiunile nucleare**. Concentrația proteică a fost determinată prin testul Bradford (Sigma-Aldrich, Germany) (Bradford 1976).
- Producția de proteine inflamatorii/angiogenice în celulele cultivate în ambele condiții de cultură a fost investigată prin analiza a 24 de proteine implicate în angiogeneză utilizând un „array” de proteine **RayBio® Mouse Angiogenic Cytokine Antibody Array kit** (RayBiotech Inc., Norcross, GA, SUA) după cum a fost descris anterior (Banciu și colab., 2006).

- Determinarea stresului oxidativ în diferite condiții de cultură a fost efectuat prin cuantificarea cantității malondialdehidei (MDA) prin **lichid cromatografia de înaltă performanță (HPLC)** în lizatele obținute din celule C26 și celule C26 și macrofage (Karatas și colab., 2002).
- Pentru determinarea **capacității totale antioxidante non-enzimatice** a fost folosită metoda **spectrofotometrică** descrisă de Erel (Erel 2004) și **activitatea catalitică a catalazei** a fost evaluată prin metoda **spectrofotometrică** descrisă de Aebi (Aebi 1984).
- Pentru determinarea indirectă a rolului NADPH oxidazei din macrofage în generarea unui nivel fiziologic de specii reactive de oxigen (ROS) în micromediul co-culturii, celulele au fost tratate cu **300 μM apocinină**, un **inhibitor al NADPH oxidazei** (Santa Cruz Biotechnology, USA) pentru 48h. Mai mult, pentru a determina dacă stresul oxidativ generat de NADPH oxidază poate modula **proliferarea celulelor C26, angiogeneza tumorală și inflamația**, toate testele descrise mai sus au fost efectuate după incubarea co-culturii cu apocinină.
- Rezultatele diferitelor experimente sunt exprimate ca **media ± deviația standard (SD)**. Diferențele între procesele protumorale în condiții standard și de co-cultură au fost evaluate utilizând **testul t de neperechi**. Diferențele între producția proteinelor angiogenice în celulele din cultura standard și co-cultură au fost analizate prin metoda analizei de varianță bifactoriale (**two-way ANOVA**) cu **corecția Bonferroni pentru comparații multiple**. Corelația dintre diferenții parametri a fost evaluată utilizând **coeficientul de corelație Pearson, r**. Toate analizele statistice au fost efectuate utilizând **GraphPad Prism versiunea 6 pentru Windows**, GraphPad Software (San Diego, CA). O valoare mai mică de 0,05 a **valorii P** a fost considerată semnificativă.

### **3. Resultate și discuții**

#### **3.1. TAMs stimulează proliferarea celulelor de carcinom de colon C26**

Efectul TAMs asupra proliferării celulelor C26 după 48h de incubare, a fost evaluată prin compararea ratei de proliferare a celulelor de carcinom murin C26 cultivate singure, cu rata de proliferare a celulelor C26 co-cultivate cu macrofagele (**Fig. 1**) într-un raport de densitate celulară de 4:1 între celulele C26 și macrofage, asigurând o aproximare a condițiilor fiziologice de dezvoltare a carcinomului de colon *in vivo* (Herbeuval și colab., 2004). Rezultatele noastre arată că celulele C26 proliferază mai rapid în prezența macrofagelor (cu 28%,  $P < 0.01$ ) decât cele cultivate singure. De aceea implicarea TAMs în coordonarea principalelor procese responsabile pentru proliferarea celulelor C26 au fost pe mai departe investigate.

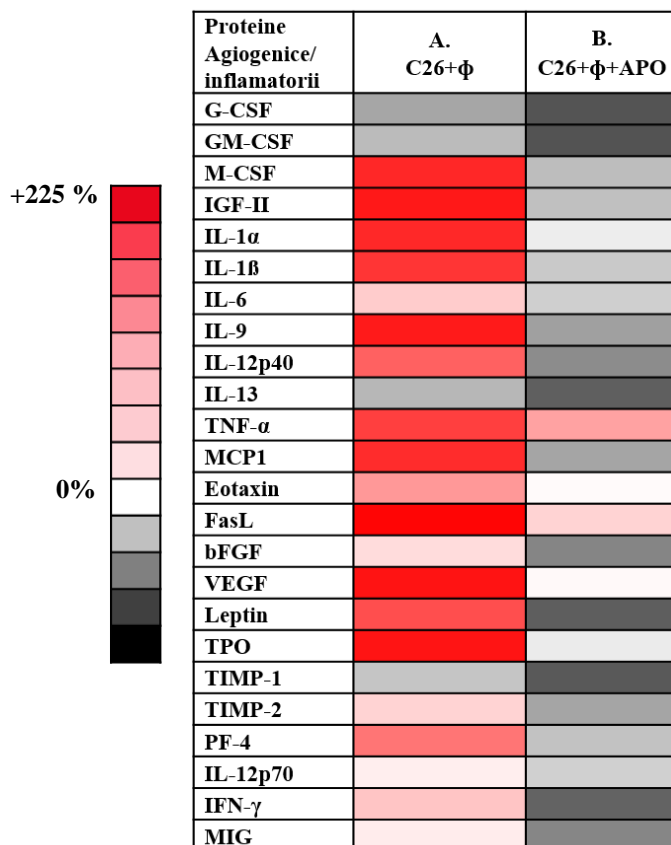


**Figura 1. Efectele TAMs asupra proliferării celulelor C26.** Rata de proliferare a celulelor C26 în culturi standard și de asemenea în prezența TAMs au fost evaluate după 48h de incubare cu mediu de cultură. Rezultatele sunt prezentate ca medie a ratei de proliferare, care este reprezentată ca unități de absorbantă (U.A.) per oră de incubare  $\pm$  SD;  $n=5$  măsurători. C26 = celule de carcinom de colon murin C26; C26+ $\phi$  = celule de carcinom de colon murin C26 co-cultivate cu macrofage intraperitoneale murine ( $\phi$ ) la o densitate celulară de 4:1 (celule C26: macrofage). Pentru a compara rata de proliferare celulară a celulelor C26 în cultură standard cu rata proliferării celulelor C26 în co-cultură cu macrofage, a fost utilizat testul  $t$  de neperechi, iar valoarea  $P$  este indicată ca \*\*,  $P < 0.01$ .

### 3.2. Efectele angiogenice ale TAMs asupra celulelor de carcinom de colon murin C26

Pentru a evalua legătura dintre efectele TAMs asupra proliferării celulelor C26 și angiogeneza indusă de TAMs, 24 de proteine implicate în acest proces au fost testate prin tehnica „array” pentru proteine din lizatele celulelor C26 în monocultură și cultivate cu TAMs pentru 48h.

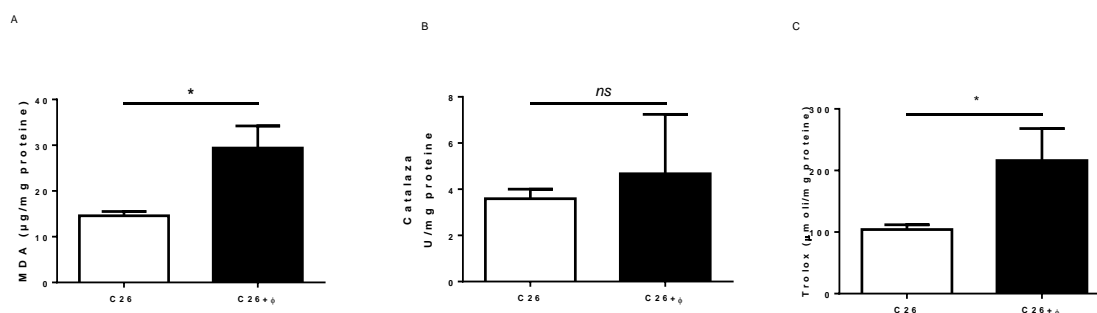
Rezultatele prezentate în **Figura 2A** au arătat o creștere în ansamblu a producției de proteine angiogenice, cu 112% în lizatele obținute în condiția de co-cultură în comparație cu producția acestor proteine în monocultura de celule C26.



**Figura 2. A.** Efectele TAMs asupra producției de proteine angiogenice în modelul de co-cultură. **B.** Implicarea NADPH oxidazei din TAMs în producția de proteine angiogenice în modelul de co-cultură. Rezultatele sunt exprimate ca media % a inhibiției producției de proteine în intervalul de la 0% (alb) la -100% (negru) sau stimularea (+) producției de proteine în intervalul de la 0% (alb) la +225% (roșu) comparând cu producția acelorași proteine în monocultura de celule C26. C26+ $\phi$  – celule C26 co-cultivate cu macrofage; C26+ $\phi$ +APO – celule C26 co-cultivate cu macrofage în prezența apocininei pentru 48h.

### 3.3. Efectele pro-oxidante ale TAMs asupra celulelor de carcinom de colon murin C26

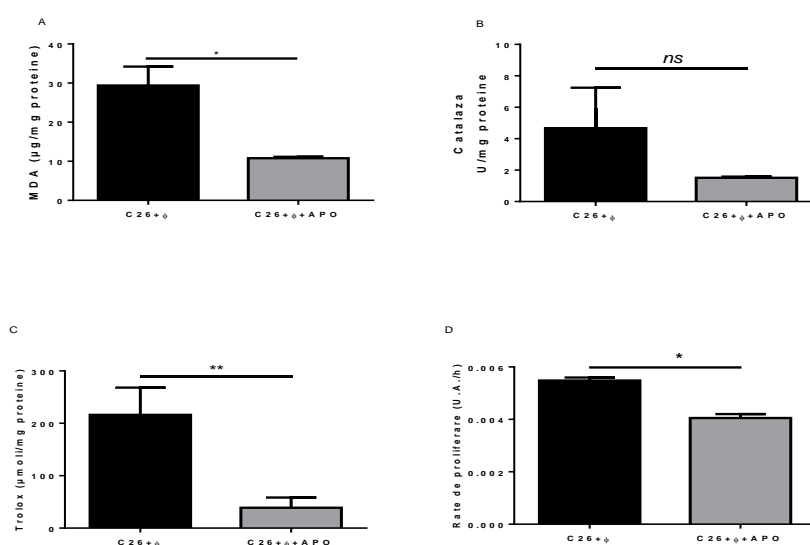
Pentru a determina dacă activitatea proliferativă a TAMs asupra celulelor de carcinom de colon murin C26 are legătură cu efectele modulatorii asupra stresului oxidativ, producția unui marker general al stresului oxidativ – MDA, și de asemenea activitatea catalitică a catalazei și activitatea sistemelor non-enzimatice antioxidante au fost evaluate și sunt prezentate în **Fig. 3A-C**. Mai mult, a fost evaluată implicarea principalei enzime pro-oxidante din macrofage, NADPH oxidaza (Pick 2014), în menținerea unui nivel al stresului oxidativ care stimulează proliferarea în micromediul tumoral (**Fig. 4A-D**). Rezultatele noastre demonstrează că TAMs au un rol important în generarea stresului oxidativ tumoral întrucât producția de MDA a fost semnificativ crescută (de 2 ori mai mare,  $P < 0.05$ ) în lizatele co-culturilor de celule C26 și macrofage comparativ cu producția în monoculturile de celule C26 (**Fig. 3A**). Aceste rezultate sunt de asemenea susținute și de rezultatele privind activitatea crescută a antioxidanților non-enzimatici în lizatele din co-cultură comparativ cu cele din monocultura de celule C26 (producția în co-culturi de 2 ori mai mare comparativ cu producția în monocultură a celulelor C26,  $P = 0.04$ ) (**Fig. 3C**). Activitatea catalazei fiind ușor crescută dar nesemnificativ statistic în prezența macrofagelor (**Fig. 3B**,  $P = 0.61$ ), sugerează că principalul mecanism protectiv împotriva nivelului crescut de ROS în modelul de co-cultură este mai degrabă mediat de sistemele antioxidante non-enzimatice decât de către catalază.



**Figura 3. Efectele TAMs asupra stresului oxidativ generat în co-cultură.**

**A.** Concentrația de malondialdehidă (MDA) în lizatele celulare obținute din cultura standard de celule de carcinom de colon murin C26 (C26) și din co-cultura celulelor C26 cu macrofagele intraperitoneale (C26+φ) după 48h de incubare. **B.** Activitatea catalitică a catalazei în lizatele celulare obținute din culturile standard a celulelor de carcinom de colon murin C26 (C26) și din co-cultura celulelor C26 cu macrofagele intraperitoneale (C26+φ) după 48h de incubare. **C.** Activitatea sistemelor antioxidante non-enzimatice totale în lizatele celulare obținute din culturile standard a celulelor de carcinom de colon murin C26 (C26) și din co-cultura celulelor C26 cu macrofagele intraperitoneale (C26+φ) după 48h de incubare. Pentru a compara producția MDA, activitatea sistemele non-enzimatice de apărare antioxidantă și activitatea catalazei în culturile standard și co-culturi, a fost utilizat testul *t* de neperechi, valoarea *P* fiind indicată după cum urmează: *ns*  $P > 0.05$ ; \* $P < 0.05$ . Rezultatele sunt prezentate ca media  $\pm$  SD a două măsurători independente.

Pentru a evalua pe mai departe implicarea NADPH oxidazei exprimată de TAMs în menținerea stresului oxidativ în carcinomul C26, TAMs co-cultivate cu celulele C26 au fost incubate pentru 48h cu un inhibitor al acestei enzime (300  $\mu$ M apocinină) și parametrii stresului oxidativ prezentați anterior au fost de asemenea evaluați (**Fig. 4A-C**). Ca și control negativ a fost utilizată cultura standard de celule C26 tratate cu apocinină. După tratamentul cu apocinină a monoculturii de celule C26 nu a fost observat niciun efect asupra producției de MDA, de antioxidanți sau asupra activității catalazei (rezultate neincluse). Rezultatele noastre dovedesc clar rolul principal al NADPH oxidazei în menținerea stresului oxidativ în carcinomul C26 întrucât producția de MDA în lizatele celulare obținute din co-cultura tratată cu apocinină a fost redusă până la cantitatea produsă în monocultura de celule C26 (**Fig. 4A** comparată cu **Fig. 4A**,  $P < 0.08$ ). Neutralizarea stresului oxidativ în micromediul co-culturii prin supresia NADPH oxidazei este de asemenea acompaniată de diminuarea activității sistemelor antioxidante non-enzimatice (cantitatea a fost redusă de 5 ori după tratamentul co-culturii cu apocinină în comparație cu cantitatea acestora din co-cultura în care NADPH oxidaza era activă,  $P = 0.0027$ ) (**Fig. 4C**).



**Figura 4. Implicarea NADPH oxidazei din TAMs în stresul oxidativ generat în co-cultura celulelor de carcinom de colon murin C26 cu macrofage.** Celulele C26 co-cultivate cu macrofage în absența apocinininei (C26+ϕ) și celulele C26 co-cultivate cu macrofage în prezența apocinininei pentru 48h (C26+ϕ+APO) au fost comparate în ce privește producția de MDA (**A**), activitatea catalitică a catalazei (**B**), activitatea sistemelor non-enzimatice antioxidante (**C**), și rata de proliferare a celulelor C26 (**D**). Rezultatele sunt prezentate ca media  $\pm$  SD; n=3 măsurători pentru cantitatea MDA, activitatea catalazei și a sistemelor antioxidante non-enzimatice și n=6 replicare pentru rata de proliferare. A fost utilizat testul *t* de neperechi pentru compararea statistică, iar valoarea *P* este indicată după cum urmează: ns  $P > 0.05$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Mai mult, pentru a corela rolul NADPH oxidazei cu efectele stimulatorii ale TAMs asupra celulelor C26, proliferarea acestor celule a fost testată în condițiile co-cultivării cu TAMs în



prezența apocininei. Rezultatele noastre demonstrează că efectele stimulatorii ale TAMs asupra proliferării celulelor C26 a fost anihilată după inhibarea NADPH oxidazei din macrofage. Astfel, după tratamentul co-culturii cu apocinină celulele C26 au proliferat similar celulelor C26 cultivate singure (**Fig. 4D** comparată cu **Fig. 1**,  $P=0.06$ ).

### **3.4. Rolul NADPH oxidazei în modularea activităților protumorale ale TAMs asupra celulelor C26**

Pentru a evalua dacă efectele pro-oxidante ale TAMs generate prin activitatea NADPH oxidazei pot fi corelate cu potențialul stimulator al TAMs asupra proliferării celulelor C26, celulele au fost cultivate cu macrofagele în prezența apocininei pentru 48h, iar apoi a fost evaluată producția diferitelor proteine angiogenice (**Fig. 2B**). Rezultatele noastre au arătat că celulele C26 co-cultivate cu macrofage și tratate cu apocinină, prezentau o producție redusă statistic semnificativ ( $P<0.0001$ ) a tuturor proteinelor angiogenice testate comparativ cu producția lor în co-culturile celulelor netratate. În medie, inhibarea NADPH oxidazei a redus producția acestor proteine cu până la 63% în celulele incubate cu apocinină comparativ cu producția lor în celulele netratate din co-cultură.. Exceptând producția de TNF- $\alpha$  care a fost doar ușor redusă (cu 35%), toate proteinele angiogenice și inflamatorii au fost reduse fie moderat (cu 35-75%) fie puternic inhibitate (reducerea producției cu peste 75%) după tratamentul cu apocinină (**Fig. 2B**).

În **concluzie**, rezultatele noastre suțin rolul stimulator al TAMs asupra proliferării celulelor de carcinom de colon murin C26 prin intermediul efectelor anti-inflamatorii, pro-angiogenice, și pro-oxidante asupra micromediului co-culturii. Principalul mecanism al acțiunii protumorale al TAMs în dezvoltarea tumorilor C26 este bazat pe menținerea unui nivel fiziologic al stresului oxidativ și a capacității angiogenice a carcinomului de colon C26 prin intermediul activității NADPH oxidazei. Mai mult, pe lângă acest mecanism principal de acțiune, efectele anti-inflamatorii și pro-angiogenice ale TAMs asupra acestor celule tumorale creează un micromediu favorabil pentru dezvoltarea și progresia carcinomului de colon C26. Aceste descoperiri asigură noi perspective în terapiile antitumorale țintite bazate pe strategii de reeducare a TAMs.

## **Capitolul IV. Dubla țintire *in vivo* a celulelor de carcinom de colon C26 și a proceselor protumorale folosind simvastatina încorporată în liposomi**

[Acest capitol a fost publicat ca: Luput L, Licarete E, Drotar DM, Nagy AL, Sesarman A, Patras L, Rauca VF, Porfire A, Muntean D, Achim M, Tomuta I, Vlase L, Catoi C, Dragos N, Banciu M. *In Vivo Double Targeting of C26 Colon Carcinoma Cells and Microenvironmental Protumor Processes Using Liposomal Simvastatin*. *J Cancer* 2018; 9(2):440-449. doi:10.7150/jca.21560]

## 1. Introducere

Pe lângă efectele de diminuare a colesterolului, SIM administrată în doze foarte mari are și acțiune antitumorală. Mai mult, studiile noastre anterioare au demonstrat că administrarea țintită spre tumoră a SIM utilizând LCL au îmbunătățit indicele terapeutic al acestui medicament în modelul *in vivo* de melanom murin. Pentru a evalua dacă această descoperire poate fi exploatată și pentru o terapie în cancerul colorectal, activitatea antitumorală și mecanismele pe care se bazează eficacitatea LCL-SIM în inhibarea creșterii carcinomului murin de colon C26 *in vivo* au fost investigate. Pentru a afla doza de LCL-SIM cu cel mai mare indice terapeutic, relația doză-răspuns și efectele adverse pentru diferite doze de LCL-SIM au fost evaluate în modelul *in vivo* de carcinom de colon murin C26. Mecanismele pe care se bazează tratamentele cu LCL-SIM *versus* SIM liberă au fost investigate în ce privește acțiunile lor asupra proliferării și apoptozei celulelor C26 (prin imunohistochimia țesuturilor tumorale pentru markerii PCNA și Bax), inflamației și angiogenezei (utilizând tehnica „array” pentru proteine angiogenice și inflamatorii). Rezultatele obținute sugerează că activitatea antitumorală a LCL-SIM asupra carcinomului de colon C26 este rezultatul proprietăților formulării liposomale de țintire a tumorii, deoarece tratamentul cu SIM liberă nu a fost eficient. În plus, LCL-SIM a exercitat acțiuni antiproliferative și pro-apoptotice asupra celulelor C26, având efecte supresive asupra a două procese principale de susținere a dezvoltării tumorale, inflamația și angiogeneza. Rezultatele noastre au dovedit că activitatea antitumorală a LCL-SIM în carcinomul de colon C26 a fost bazată pe efectele citotoxice asupra celulelor tumorale și pe activitatea supresivă asupra angiogenezei și inflamației tumorale.

## 2. Materiale și metode

- LCL-SIM au fost realizați utilizând metoda **hidratării filmului lipidic**. Pentru această formulare au fost utilizate 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) (Lipoid GmbH, Germania), N-(carbonil-metoxipolietilenglicol-2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamină (sare de Na) (MPEG-2000-DSPE) (Lipoid GmbH, Germania), colesterol (CHO) (Sigma-Aldrich, Germania), și SIM (Biocon Limited, India) într-un raport molar de 9.5:0.5:1:2.2. Concentrația de SIM liposomală a fost aproximativ 1300 μg/ml, corespunzând la o eficiență de încapsulare de 20%. Mărimea medie a veziculelor de liposomi a fost în jur de 115 nm și valoarea indicelui de polidispersie a fost mai mică de 0.15, ambii parametri indicând o distribuție îngustă a dimensiunilor și un potențial bun pentru acumularea pasivă a liposomilor în tumori (Alupei și colab., 2015, Porfire și colab., 2015).

- **Celule de carcinom de colon murin C26** (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germania) au fost cultivate în mediu RPMI-1640 (Lonza, Group AG, Basel, Elveția), suplimentat cu 10% ser fetal bovin inactivat prin încălzire (HyClone; GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT, SUA), ca monostrat la 37°C în atmosferă umidificată conținând 5% CO<sub>2</sub>. **Modelul de carcinom de colon** a fost generat prin inoculare subcutanată a 10<sup>6</sup> celule C26 în flancul drept al șoarecilor masculi de 6-8 săptămâni Balb/c (Institutul Cantacuzino, București, România).
- **Volumul tumoral** a fost determinat prin formula:  $V = 0.52a^2b$ , unde  $a$  este cel mai mic și  $b$  este cel mai mare diametru superficial al tumorii. Experimentele au fost efectuate în acord cu regulile naționale și au fost aprobate de comisia de etică a universității pentru animalele utilizate în experimente (numărul de înregistrare **31375/06.04.2015**).
- Pentru a evalua **doza optimă de SIM încorporată în LCL** cu cel mai mare indice terapeutic asupra carcinomului de colon C26, șoarecii au fost injectați *i.v.* (în vena caudală), de două ori în zilele 8 și 11 după inocularea tumorilor cu următoarele doze de LCL-SIM: 2.5, 5, 7.5, și 10 mg/kg. Dimensiunea tumorilor a fost măsurată zilnic iar șoarecii au fost sacrificați în ziua 16 după inducerea tumorilor, când primele tumori din grupul control au ajuns la 2000 mm<sup>3</sup> care reprezintă volumul sigur pentru prevenirea metastazelor de carcinom C26 (Oft și colab., 1998).
- Pentru evaluarea efectelor LCL-SIM *versus* SIM liberă asupra **creșterii tumorale**, LCL-SIM și SIM liberă au fost administrate în vena caudală la o doză de 5 mg/kg în zilele 8 și 11 după inocularea tumorilor. Volumul tumoral a fost măsurat zilnic și calculat cum a fost descris anterior. În ziua 12, șoarecii au fost sacrificați și tumorile au fost măsurate și colectate.
- Pentru a evalua citotoxicitatea tratamentelor asupra țesuturilor tumorale, o **analiză imunohistochimică** a fost efectuată pentru doi markeri, antigenul nuclear de proliferare celulară (PCNA) și Bcl-2-asociat proteinei X (BAX). Rezultatele au fost exprimate ca indici mitotici și apoptotici reprezentând procentul de celule PCNA-pozitive (cu nucleul colorat maro) (Jin și colab., 2004), respectiv procentul de celule Bax-pozitive (citoplasma colorată maro) din totalul de celule numărate (Jansson și Sun 2002).
- După sacrificarea șoarecilor, tumorile au fost izolate, cântărite și înghețate rapid în azot lichid, apoi incubate cu tampon de liză cu tablete cu inhibitori de proteaze și fosfataze (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), obținându-se **lizate tumorale tisulare** pentru fiecare grup. Concentrația de proteine din supernatant a fost măsurată utilizând metoda biuretului (Gornall și colab., 1949).
- Nivelul de exprimare al proteinelor angiogenice în țesutul tumoral au fost investigate prin evaluarea a 24 de proteine implicate în angiogeneză folosind un „array” pentru proteine,

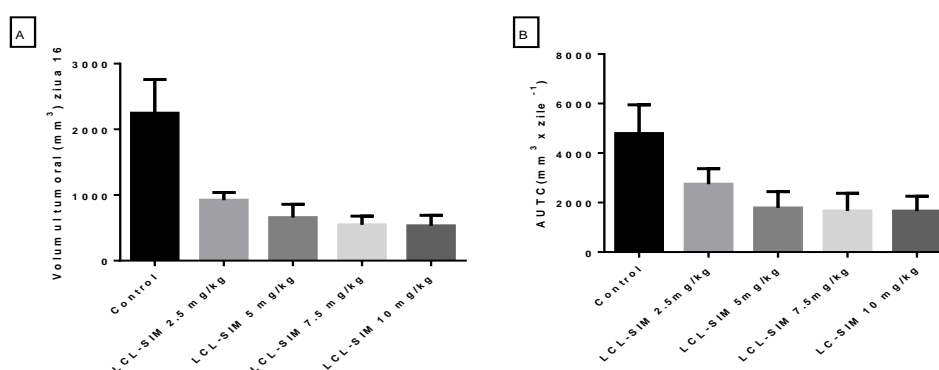
**RayBio® Mouse Angiogenic Cytokine Antibody Array kit** (RayBiotech Inc., Norcross, GA, SUA), cum a fost descris anterior (Banciu și colab., 2006).

- Rezultatele diferitelor experimente au fost raportate ca **media ± SD**. Comparările statistice a efectelor diferitelor tratamente în ansamblu asupra tumorilor au fost evaluate prin metoda analizei de varianță unifactorială (**one-way ANOVA**) cu **post-testul Dunnett pentru comparări multiple**. Timpul de dublare a volumului tumoral (DT) a fost estimat utilizând ecuația de creștere exponențială a tumorii. Diferențele dintre efectele tratamentelor asupra producției de proteine angiogenice au fost analizate prin metoda analizei de varianță bifactoriale (**two-way ANOVA**) cu **corecția Bonferroni pentru comparări multiple** utilizând GraphPad Prism versiunea 6 pentru Windows, GraphPad Software (San Diego, CA). O valoare  $P < 0.05$  a fost considerată statistic semnificativă.

### 3. Resultate și discuții

#### 3.1. Activitatea antitumorală a LCL-SIM: relația doză-răspuns

Pentru a evalua relația dintre diferite doze de LCL-SIM și activitatea lor antitumorală, șoarecii au primit două injecții *i.v.* cu dozele indicate, în ziua 8 și ziua 11 după inocularea tumorilor. Volumele tumorale au fost măsurate până în ziua 16, când primele tumori din grupul control au ajuns la 2000 mm<sup>3</sup>. Rezultatele au fost prezentate ca volume tumorale la ziua 16 în **Fig. 5A** și ariile de sub curbele de creștere tumorală (AUTC) în **Fig. 5B**.

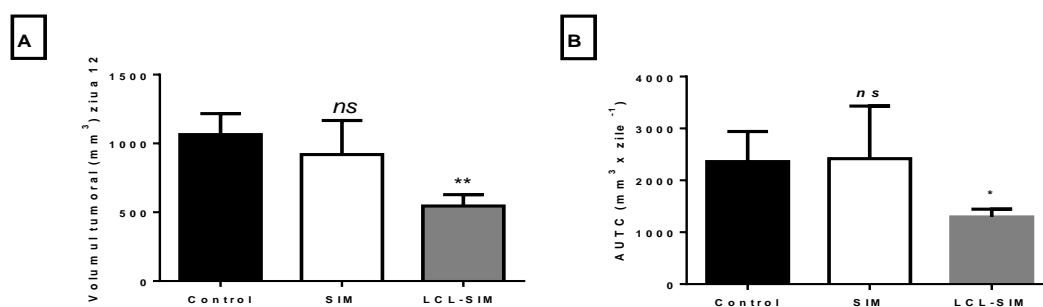


**Figura 5. Activitatea antitumorală a diferitelor doze de LCL-SIM.** Șoarecii au primit două injecții *i.v.* din fiecare formulare la ziua 8 și ziua 11, după inocularea celulelor tumorale. Rezultatele au fost raportate la ziua 16 după inocularea celulelor (ziua când primele tumori din grupul control au ajuns la 2000 mm<sup>3</sup>). **A. Volumul tumoral în ziua 16. B. Ariile de sub curbele de creștere tumorală (AUTC) până în ziua 16 după inducerea tumorilor.** Rezultatele au fost exprimate ca media ± SD a cinci șoareci; Control – grupul netratat (grup tratat cu PBS); 2.5 mg/kg LCL-SIM - grupul tratat cu 2.5 mg/kg LCL-SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; 5 mg/kg LCL-SIM - grupul tratat cu 5 mg/kg LCL-SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; 7.5 mg/kg LCL-SIM - grupul tratat cu 7.5 mg/kg LCL-SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; 10 mg/kg LCL-SIM - grupul tratat cu 10 mg/kg LCL-SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale.

Pentru toate dozele testate valorile, volumelor tumorale și de asemenea AUTC au fost mult mai mici decât cele obținute în grupul control și s-a observat o corelație semnificativ negativă între doză și răspuns (coeficientul de corelație Spearman= -1,  $P=0.01$ ). De remarcat, faptul că activitatea antitumorală maximă a fost deja atinsă la doza de 5 mg/kg de SIM. Astfel, la aceasta doză, volumele tumorale au fost reduse cu mai mult de 70% (Fig. 5A) iar decelerarea creșterii tumorale la ziua 16 după inducerea tumorilor a fost aproximativ 62% (Fig. 5B) raportat la grupul control.

### 3.2. Efectele LCL-SIM versus SIM liberă asupra creșterii tumorale

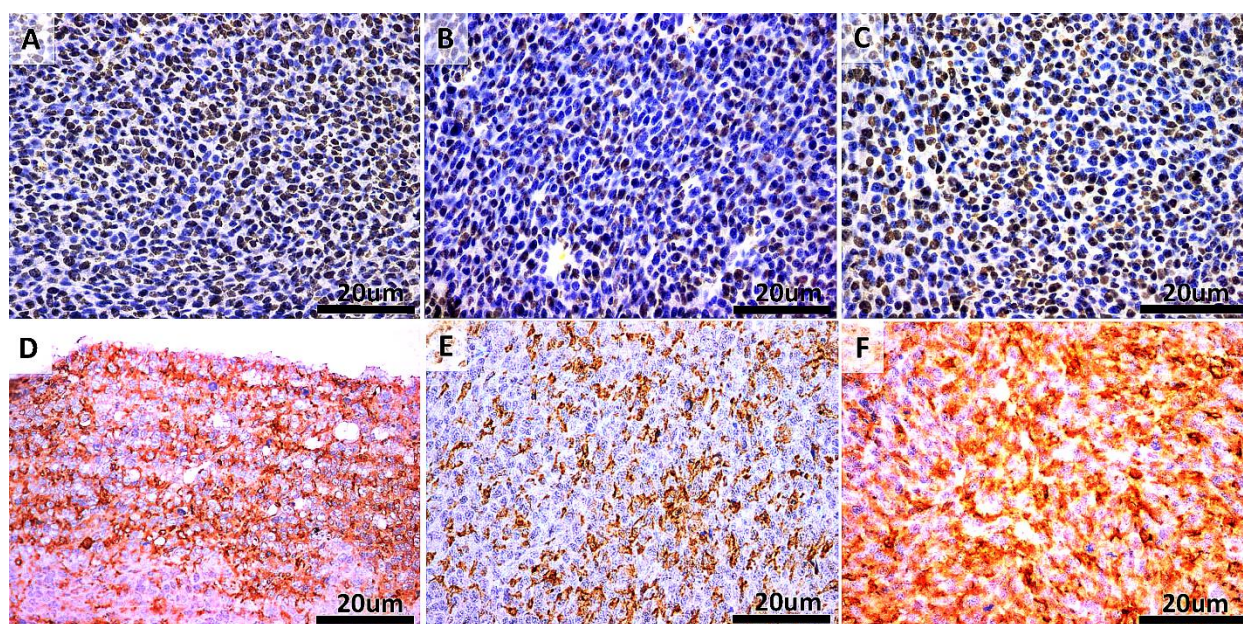
Pentru a compara efectele a 5 mg/kg LCL-SIM și aceeași doză de SIM liberă asupra carcinomului de colon C26 *in vivo*, tratamentele au fost administrate în ziua 8 și ziua 11 după inocularea celulelor tumorale. Activitățile antitumorale au fost evaluate prin măsurarea volumelor tumorale la ziua 12 (ziua când șoarecii au fost sacrificați) (Fig. 6A) și AUTC (Fig. 6B). Volumele tumorale din grupul tratat cu LCL-SIM au fost cu 50% mai mici în comparație cu cele din grupul control ( $P<0.01$ , Fig. 6A) în timp ce administrarea de SIM liberă nu a afectat acest parametru de creștere tumorală (Fig. 6A). În concordanță cu aceste rezultate, AUTC au fost semnificativ reduse de tratamentul cu LCL-SIM în comparație cu tumorile tratate cu SIM liberă sau grupul control ( $P<0.05$ , Fig. 6B). Toate aceste rezultate sugerează că activitatea antitumorală a LCL-SIM a fost asigurată de capacitatea liposomilor de a ținti tumora, măbind acumularea de statine intratumoral și prin urmare amplificând efectele inhibitorii ale SIM asupra carcinomului de colon C26.



**Figura 6. Activitățile antitumorale ale LCL-SIM și SIM liberă în carcinomul de colon C26 *in vivo*.** Șoarecii au primit două injecții *i.v.* din fiecare formulare în ziua 8 și ziua 11 după inocularea celulelor. Rezultatele au fost raportate la ziua 12 după inocularea tumorilor (ziua când șoarecii au fost sacrificați) **A. Volumele tumorale în ziua 12 ale diferitelor grupuri tratate.** **B. Ariile de sub curbele de creștere tumorală (AUTC) până în ziua 12 după inducerea tumorilor.** Rezultatele au fost exprimate ca media  $\pm$  SD a cinci șoareci; Control – grupul netratat (grup tratat cu PBS); SIM - grupul tratat cu 5 mg/kg SIM liberă în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; LCL-SIM -grupul tratat cu 5 mg/kg LCL-SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale. Pentru a compara efectele fiecărui tratament asupra tumorilor *in vivo* cu controalele (tumorile de la șoarecii tratați cu PBS), metoda analizei de varianță unifactorială (one-way ANOVA) cu Dunnett's Test pentru comparații multiple a fost utilizat iar valoarea  $P$  indicată după cum urmează: *ns*, nesemnificativ ( $P>0.05$ ); \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ .

### 3.3. Efectele citotoxice ale LCL-SIM asupra țesutului tumoral

Pentru a corela activitatea antitumorală a LCL-SIM cu efectele citotoxice directe asupra celulelor de carcinom de colon C26, moleculele asociate atât cu proliferarea cât și cu apoptoza au fost evaluate prin analiză imunohistochimică a tumorilor după diferite tratamente și rezultatele au fost prezentate în **Fig. 7A-F**. Astfel, tumorile au fost evaluate imunohistochimic pentru exprimarea antigenului nuclear de proliferare celulară (PCNA) (**Fig. 7A-C**) și de asemenea pentru proteina apoptotică Bax (**Fig. 7D-F**). Rezultatele noastre sugerează că activitățile antitumorale ale diferitelor tratamente sunt corelate negativ cu indicele mitotic (coeficientul de corelație Spearman= -0.82,  $P=0.0001$ ) și pozitiv cu indicele apoptotic (coeficientul de corelație Spearman= 0.82,  $P=0.0014$ ). Mai exact, tumorile tratate cu LCL-SIM au prezentat un potențial proliferativ mult mai mic cu 50-60% comparativ fie cu tumorile control fie cu tumorile tratate cu SIM liberă (**Fig. 7A-C**). După administrarea LCL-SIM, exprimarea intratumorală a proteinei apoptotice Bax a fost ușor crescută cu 15% în comparație cu producția ei în tumorile tratate cu SIM liberă, și respectiv crescută moderat cu 36% în comparație cu exprimarea în tumorile control (**Fig. 7D-F**).



**Figura 7. Analiza imunohistochimică a efectelor citotoxice a diferitelor tratamente asupra carcinomului murin de colon C26 *in vivo*. A-C. Exprimarea PCNA în tumori.** Celulele care prezintă nucleul colorat în maro sunt celule PCNA-pozitive. Secțiunile au fost contracolorate cu hematoxilină Gill 2. **D-F. Exprimarea Bax în tumori.** Celulele care prezintă colorare citoplasmatică cu maro sunt celule Bax-pozitive. Secțiunile au fost contracolorate cu hematoxilină Gill 2. **A și D-**Control (grup netratat); **B și E-** grup tratat cu 5 mg/kg SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale; **C și F-** grup tratat cu 5 mg/kg LCL-SIM în zilele 8 și 11 după inocularea celulelor tumorale. Scala de 20 μm și mărire a originalului de 400X.

### 3.4. Efectele LCL-SIM asupra angiogenezei tumorale

Pentru a corela activitatea antitumorală a LCL-SIM în carcinomul de colon C26 cu efectele asupra angiogenezei tumorale am investigat efectele administrării SIM liposomală și SIM liberă asupra producției a 24 de proteine implicate în angiogeneză și inflamație din tumoră, folosind un „array” pentru proteine. Efectele LCL-SIM și SIM liberă asupra producției tumorilor C26 de proteine pro-angiogenice, au fost prezentate în detaliu în **Tabelul 1**.

**Table 1. Efectele LCL-SIM și SIM liberă asupra producției de proteine pro-angiogenice în tumorile C26.**

Proteine pro-angiogenice	Procentul inhibiției (-) și stimulării (+) producției proteinelor pro-angiogenice în carcinomul de colon C26 după aplicarea diferitelor tratamente în comparație cu producția lor în grupul control	
	SIM	LCL-SIM
G-CSF	-52.89 ± 0 (****)	-83.11 ± 2.85 (****)
GM-CSF	-71.22 ± 0 (****)	-69.66 ± 6.82 (****)
M-CSF	27.57 ± 3.84 (ns)	20.77 ± 6.84 (ns)
IGF-II	9.32 ± 0.15 (ns)	-6.13 ± 5.71 (ns)
IL-1α	1.13 ± 17.06 (ns)	-22.08 ± 0.14 (ns)
IL-1β	-79.20 ± 9.78 (****)	-76.02 ± 1.36 (****)
IL-6	-66.88 ± 15.64 (****)	-91.25 ± 0.74 (****)
IL-9	-32.48 ± 4.33 (*)	-32.1 ± 10.56 (*)
IL-12p40	57.37 ± 34.13 (****)	3.34 ± 6.29 (ns)
IL-13	-29.18 ± 10.33 (*)	-26.8 ± 2.68 (ns)
TNF-α	-72.38 ± 1.94 (****)	-70.96 ± 3.9 (****)
MCP-1	85.36 ± 15.36 (****)	73.66 ± 9.5 (****)
Eotaxin	-86.46 ± 0 (****)	-88.94 ± 5.67 (****)
FasL	-11.8 ± 7.52 (ns)	-60.38 ± 23.6 (****)
bFGF	55.32 ± 24.32 (****)	-59.77 ± 18.41 (****)
VEGF	-66.08 ± 0.17 (****)	-71.34 ± 1.46 (****)
Leptin	-42.69 ± 13.14 (***)	-48.25 ± 9.8 (***)
TPO	86.08 ± 0.46 (****)	23.96 ± 4.5 (ns)

Producția proteinelor în tumori după aplicarea diferitelor tratamente a fost comparată cu producția acestor proteine în tumorile control. Rezultatele au fost reprezentate ca media ± SD a două măsurători independente. ns, ne semnificativ,  $P > 0.05$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ . TPO, trombopoetină.

Producția majorității proteinelor pro-angiogenice a fost redusă semnificativ în cazul administrării SIM liposomale și liberă în comparație cu producția acestor proteine în tumorile control. Cu toate acestea, în ansamblu proteinele pro-angiogenice au fost statistic semnificativ reduse după tratamentul cu LCL-SIM comparativ cu efectul administrării SIM libere. În medie, efectele LCL-SIM asupra producției proteinelor pro-angiogenice a fost cu 22% mai puternice decât efectele SIM libere asupra producției aceluiași proteine ( $P < 0.0001$ ) (**Tabel 1**).

În cazul producției proteinelor anti-angiogenice, ambele tratamente au exercitat efecte stimulatorii puternice asupra producției proteinelor TIMP-1 și PF-4 (75-165% stimulare comparativ cu producția din control a acestor proteine), și efecte de reducere moderată a producției de TIMP-2 (45-65% reducere în comparație cu producția de proteine din control) (**Tabel 2**). Mai mult, administrarea de SIM liberă a stimulat producția de IL-12 subunitatea p70 (IL-12p70) (cu 104%) și monokina indusă de interferon- $\gamma$  (MIG) (cu 55%) în timp ce LCL-SIM au exercitat efecte de reducere notabile (cu 50%) asupra producției intratumorale a IFN- $\gamma$  și MIG (**Tabel 2**).

**Tabel 2. Efectele LCL-SIM și SIM liberă asupra producției de proteine pro-angiogenice în tumorile C26.**

Anti-angiogenic proteins	Procentul inhibiției (-) și stimulării (+) producției proteinelor anti-angiogenice în carcinomul de colon C26 după aplicarea diferitelor tratamente în comparație cu producția lor în grupul control	
	SIM	LCL-SIM
TIMP-1	75.52 ± 14.27 (****)	99.89 ± 1.2 (****)
TIMP-2	-44.11 ± 3.05 (***)	-64.33 ± 3.99 (****)
PF-4	162.56 ± 39.74 (****)	120.91 ± 11.48 (****)
IL-12p70	103.64 ± 24.41 (****)	25.03 ± 3.37 (ns)
IFN- $\gamma$	-8.48 ± 5.57 (ns)	-50.37 ± 0.16 (****)
MIG	54.74 ± 8.52 (****)	-49.78 ± 4.21 (****)

*Producția proteinelor în tumori după aplicarea diferitelor tratamente a fost compată cu producția acestor proteine în tumorile control. Rezultatele au fost reprezentate ca media ± SD SD a două măsurători independente. ns, nesemnificativ,  $P > 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .*

În concluzie, rezultatele noastre dovedesc că încorporarea SIM în LCL oferă o creștere a activității antitumorale asupra carcinomului de colon C26 *in vivo*. Un subiect de perspectivă ar putea fi identificarea potențialului acestui tratament de a reeduca macrofagele asociate tumorii pentru a lupta împotriva cancerului.



## Capitolul V. Simvastatina liposomală sensibilizează carcinomul de colon C26 la efectele antitumorale ale 5-fluorouracil liposomal *in vivo*

[Acest capitol a fost trimis spre publicare în jurnalul PLoS ONE ca: Lavinia Luput, Alina Sesarman, Alina Porfire, Marcela Achim, Dana Muntean, Tibor Casian, Laura Patras, Valentin Florian Rauca, Denise Minerva Drotar, Ioana Stejerean, Ioan Tomuta, Laurian Vlase, Nicolae Dragos, Manuela Banciu, Emilia Licarete. Liposomal simvastatin potentiates the antitumor effects of liposomal 5-fluorouracil on C26 colon carcinoma *in vivo*]

În acest studiu am investigat eficacitatea unei noi terapii combinate pentru CRC, bazată pe administrarea LCL-SIM descriși în studiul anterior, combinați cu 5-FU – principalul agent chimioterapeutic utilizat în terapia CRC, de asemenea încapsulat în LCL. Principalele mecanisme moleculare pe care se bazează activitatea antitumorală a celor doi agenți terapeutici au fost investigate. Rezultatele acestui studiu au evidențiat potențialul LCL-SIM de a sensibiliza celulele carcinomului de colon murin C26 la acțiunea antitumorală a LCL-5-FU. Terapia combinată a exercitat efecte inhibitorii asupra angiogenezei carcinomului murin C26 și efecte antioxidante. Astfel, rezultatele noastre au demonstrat potențialul acestei terapii combinate ca viitoare terapie țintită pentru CRC.

## Capitolul VI. Concluzii

- **Primul studiu al acestei teze** a arătat că TAMs susțin proliferarea celulelor de carcinom de colon C26 într-o manieră dependentă de stresul oxidativ potențând capacitatea angiogenică a micromediului tumoral.
- **Al doilea studiu al acestei teze** a demonstrat că efectele antitumorale ale LCL-SIM exercitate asupra carcinomului de colon murin C26 indus la șoareci, au fost bazate pe suprimarea angiogenezei și inflamației tumorale și de asemenea pe acțiunile antiproliferative și pro-apoptotice asupra celulelor de carcinom de colon C26, aceste efecte fiind corelate cu capacitatea LCL de țintire pasivă a micromediului tumoral.
- **Al treilea studiu al acestei teze** a demonstrat potențialul LCL-SIM de a sensibiliza celulele de carcinom de colon C26 la administrarea LCL-5-FU. În ansamblu, rezultatele noastre au demonstrat potențialul terapiei combinate bazată pe administrarea LCL-SIM și LCL-5-FU să devină o terapie țintită de succes a cancerului colorectal.

## Bibliografie selectivă

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Alberts AW, et al. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:3957-3961.
- Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM. 2005. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 65:10637-10641.
- Alupei MC, Licarete E, Patras L, Banciu M. 2015. Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. *Cancer Lett* 356:946-952.
- Askarizadeh A, Butler AE, Badiie A, Sahebkar A. 2019. Liposomal nanocarriers for statins: A pharmacokinetic and pharmacodynamics appraisal. *J Cell Physiol* 234:1219-1229.
- Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.
- Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. 2012. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 125:5591-5596.
- Banciu M, Schiffelers RM, Fens MH, Metselaar JM, Storm G. 2006. Anti-angiogenic effects of liposomal prednisolone phosphate on B16 melanoma in mice. *J Control Release* 113:1-8.
- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. 2000. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 32:164-176.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394-424.
- Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. 2017. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* 9.
- Cazin JL, Gosselin P, Cappelaere P, Robert J, Demaille A. 1992. Drug resistance in oncology: from concepts to applications. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:76-86.
- Condeelis J, Pollard JW. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266.
- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37:277-285.
- Gabizon AA. 2001. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest* 19:424-436.
- Gazzerro P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, Santoro A, Laezza C, Bifulco M. 2012. Pharmacological actions of statins: a critical appraisal in the management of cancer. *Pharmacol Rev* 64:102-146.
- Gopalan A, Yu W, Sanders BG, Kline K. 2013. Simvastatin inhibition of mevalonate pathway induces apoptosis in human breast cancer cells via activation of JNK/CHOP/DR5 signaling pathway. *Cancer Lett* 329:9-16.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177:751-766.
- Grothey A, Sargent DJ. 2016. Adjuvant Therapy for Colon Cancer: Small Steps Toward Precision Medicine. *JAMA Oncol* 2:1133-1134.
- Haley B, Frenkel E. 2008. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* 26:57-64.
- Hanahan D, Coussens LM. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309-322.

- Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. 2004. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol* 172:4630-4636.
- Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD. 2006. The role of statins in cancer therapy. *Oncologist* 11:306-315.
- James AD, et al. 2015. The Plasma Membrane Calcium Pump in Pancreatic Cancer Cells Exhibiting the Warburg Effect Relies on Glycolytic ATP. *J Biol Chem* 290:24760-24771.
- Jansson A, Sun XF. 2002. Bax expression decreases significantly from primary tumor to metastasis in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 20:811-816.
- Jin W, Gao MQ, Lin ZW, Yang DX. 2004. Multiple biomarkers of colorectal tumor in a differential diagnosis model: a quantitative study. *World J Gastroenterol* 10:439-442.
- Karatas F, Karatepe M, Baysar A. 2002. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 311:76-79.
- Knox JJ, Siu LL, Chen E, Dimitroulakos J, Kamel-Reid S, Moore MJ, Chin S, Irish J, LaFramboise S, Oza AM. 2005. A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix. *Eur J Cancer* 41:523-530.
- Kodach LL, et al. 2011. Statins augment the chemosensitivity of colorectal cancer cells inducing epigenetic reprogramming and reducing colorectal cancer cell 'stemness' via the bone morphogenetic protein pathway. *Gut* 60:1544-1553.
- Licarete E, Sesarman A, Banciu M. 2015. Exploitation of pleiotropic actions of statins by using tumour-targeted delivery systems. *J Microencapsul* 32:619-631.
- Lin EY, Pollard JW. 2007. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* 67:5064-5066.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3:330-338.
- Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. 2009. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur J Pharm Biopharm* 71:409-419.
- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. 2009. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 30:592-599.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23:549-555.
- Matsumura Y, Maeda H. 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46:6387-6392.
- Noy R, Pollard JW. 2014. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41:49-61.
- Oft M, Heider KH, Beug H. 1998. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 8:1243-1252.
- Pick E. 2014. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases* 5:e27952.
- Pollard JW. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71-78.
- Porfire A, Tomuta I, Muntean D, Luca L, Licarete E, Alupeu MC, Achim M, Vlase L, Banciu M. 2015. Optimizing long-circulating liposomes for delivery of simvastatin to C26 colon carcinoma cells. *J Liposome Res* 25:261-269.

- Schointuch MN, Gilliam TP, Stine JE, Han X, Zhou C, Gehrig PA, Kim K, Bae-Jump VL. 2014. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exhibits anti-metastatic and anti-tumorigenic effects in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 134:346-355.
- Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J, Mantovani A. 2000. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 164:762-767.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. 2006. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717-727.
- Sirtori CR. 2014. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res* 88:3-11.
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86:1065-1073.
- Stine JE, Guo H, Sheng X, Han X, Schointuch MN, Gilliam TP, Gehrig PA, Zhou C, Bae-Jump VL. 2016. The HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, exhibits anti-metastatic and anti-tumorigenic effects in ovarian cancer. *Oncotarget* 7:946-960.
- Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM, DeClerck YA. 2012. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res* 72:2473-2480.
- Thibault A, et al. 1996. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2:483-491.
- Torchilin VP. 2000. Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 11 Suppl 2:S81-91.
- Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, Lacorte JM, Staedel C, Lesuffleur T. 2002. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer* 98:498-504.
- Yang C, Liu HZ, Fu ZX, Lu WD. 2011. Oxaliplatin long-circulating liposomes improved therapeutic index of colorectal carcinoma. *BMC Biotechnol* 11:21.