

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

TEZA DE DOCTORAT

Rezumat

Conducător științific:

Prof. Dr. Manuela BANCIU

Doctorand:

Giorgiana Gabriela NEGREA

Cluj-Napoca

2025

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

**Perspective pentru terapia melanomului:
strategii țintite pentru combaterea rezistenței
celulelor de melanom la tratamentele oncologice**

Rezumat

Conducător științific:

Prof. Dr. Manuela BANCIU

Doctorand:

Giorgiana Gabriela Negrea

Cluj-Napoca

2025

“Continuous effort, not strength or intelligence, is the key to unlocking our potential.”

Liane Cord

Cuprins

Lista de abrevieri	9
SCHIȚA TEZEI	11
CAPITOLUL 1	
1.1 Mecanisme moleculare implicate în Semnele distinctive ale cancerului	14
1.2 Micromediul tumoral (TME).....	16
1.2.1 Funcții ale macrofagelor asociate tumorii (TAMs) în dezvoltarea tumorală și metastază	18
1.2.2 TAMs în angiogeneza.....	20
1.2.3 EVs în rezistența la medicamente și în progresul tumorii	21
1.3 Factorul de hipoxie - 1 (HIF-1) ca un regulator al dezvoltării canceroase în hipoxie cât și în normoxie ...	22
1.3.1 Efectele induse de <i>HIF-1</i> în hipoxie.....	22
1.3.2 Efectele induse de <i>HIF-1</i> în normoxie	23
1.4 Reprogramarea metabolismului ca un semn distinctiv al cancerului	28
1.4.1 Reprogramarea metabolismului în celule canceroase	29
1.4.3 Reprogramarea metabolismului în celule din TME	33
1.4.4 Implicații ale tinerii metabolismului.....	34
1.5 Strategii de dobândire a rezistenței la medicamente	36
1.5.1 Rolul TME în rezistența la medicamente	37
1.5.2 Mecanisme moleculare implicate în rezistența la medicamente	39
1.6 Strategii de depășire a rezistenței la medicamente	41
1.6.1 Terapii țintite.....	42
1.6.2 Terapii țintite bazate pe nanosisteme de transport al medicamentelor	43
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI	57
CAPITOLUL 2	
2.1 INTRODUCERE.....	61
2.2 MATERIALE ȘI METODE.....	62
Linie celulară și condiții	62
SIM	63
RNA-Seq	63
Analiza datelor de secvențiere ARN	
Real-Time PCR (RT-qPCR).....	64
Lizate celulare.....	66
Evaluarea activității Lactat Dehidrogenazei (LDH)	66
Evaluarea activității PFK1	67
Evaluarea activității Glucozo 6-fosfat Dehidrogenazei (G6PD)	67
Evaluarea activității Citrate Sintazei (CS)	67
Western blot	68
Analiza statistică	69
2.3 REZULTATE.....	69
<i>SIM a împiedicat moleculele reglatoare-cheie implicate în reprogramarea metabolismului celulelor canceroase ..</i>	69
<i>Tratamentul cu SIM a modificat expresia ARN mesager pentru SREBP1 și FOXM1 – doi regulatori importanți ai biosintezei colesterolului și ai dezvoltării tumorale.....</i>	72
<i>Investigarea efectelor SIM asupra metabolismului celulelor de melanom B16.F10 la nivel proteic.....</i>	82
2.4 DISCUȚII	87
2.5 CONCLUZII.....	91
CAPITOLUL 3	
3.1 INTRODUCERE.....	106
3.2 MATERIALE ȘI METODE.....	108
Formarea sferoizilor	108
Test de viabilitate	108
Tratament	109

Izolarea ARN	112
Secventiere ARN si analiza date.....	112
Real-Time PCR (RT-qPCR).....	113
Lizate	114
Western blot	114
Angiogeneza	114
Activitatea metaloproteazelor	115
Apoptoza.....	115
Analiza statistica	116
3.3 REZULTATE.....	116
Caracterizarea sferoizilor	116
Modificari la nivel transcriptional asociate cu raspunsul celulelor la DOX	117
Investigarea efectelor expunerii repetate la DOX la nivel proteic	127
3.4 DISCUTII	132
3.5 CONCLUZII.....	135
CAPITOLUL 4: DEPASIREA REZISTENTEI INDUSE DE MEDICAMENTE PRIN ABORDARI	
TERAPEUTICE CU TINTIRE ACTIVA	144
4.1.1 INTRODUCERE.....	147
4.1.2 MATERIALE SI METODE.....	149
Pregatirea nanoformularilor	149
Tipuri de celule	150
Test de preluare de catre celule	150
Test de proliferare	151
Model tumoral murin	151
Tratamentul asupra cresterii tumorale	152
Lizate tumorale	152
Array de proteine implicate in angiogeneza	153
Analiza imunohistochimica	
Evaluare a stresului oxidativ	154
Analiza Western blot	154
Analiza statistica	155
4.1.3 REZULTATE.....	155
Caracterizarea nanoformularilor.....	156
Preluarea preferentiala a lipozomilor functionalizate de catre macrofagele M2	158
Efectele antiproliferative ale terapiei secventiale	161
Inhibarea puternica a cresterii melanomului datorita terapiei	162
Efectele antiangenice ale terapiei combinate	165
Cresterea stresului oxidativ de catre terapie	168
Terapia a indus o tranzitie inspre apoptoza.....	169
4.1.4 DISCUTII	170
4.1.5 CONCLUZII	173
4.2.1 INTRODUCERE	178
4.2.2 MATERIALE SI METODE.....	180
Efectul terapeutic al terapiei IL-13-LCL-PLP, in vivo	180
Pregatirea lizatelor tumorale.....	181
Analiza proteinelor angiogenice prin protein array	181
Analiza Western blot	181
Activitatea metaloproteazelor in tumori	182
Analiza statistica	182
4.2.3 REZULTATE.....	182
Terapia a inhibat puternic cresterea tumorală	182
Terapia a inhibat puternic capacitatea angiogenica	184
Analiza unor promotori ai apoptozei si invaziei	186
4.2.4 DISCUTII	188
4.2.5 CONCLUZII	190
CAPITOLUL 5	193

5.1 CONCLUZII GENERALE.....	194
5.2 NOUTATEA TEZEI	196
5.3 PERSPECTIVE VIITOARE.....	198
INFORMATII SUPLIMENTARE	200
LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ.....	201
LISTA PUBLICAȚIILOR NEINCLUSE ÎN TEZĂ.....	201
LISTA PARTICIPĂRILOR LA CONFERINTE SI SIMPOZIOAME INTERNATIONAL.....	202
SURSE DE FINANTARE ALE PROIECTELOR INCLUSE IN TEZA	205
PREMII SI BURSE.....	206
PARTICIPARI IN PROIECTE NATIONALE	206
MULȚUMIRI	208

SCHIȚA TEZEI

Cuvinte cheie: rezistență la medicamente, vezicule extracelulare, micromediul tumoral, factor de inducere al hipoxiei-1 (HIF-1), reprogramare metabolică, nanosisteme de țintire activă

Actuala teză a constat în 5 capitole care sunt prezentate pe scurt mai jos.

Capitolul 1 a oferit o privire de ansamblu asupra semnelor distinctive ale cancerului, implicarea unor factori cheie care modulează dezvoltarea tumorii, subliniind rolul macrofagelor asociate tumorii și al veziculelor extracelulare ca instrumente esențiale de comunicare intercelulară în micromediul tumoral care promovează și sprijină toate procesele protumorale. Mai mult, a fost subliniat rolul factorului de transcripție, factor de inducere al hipoxiei-1 (HIF-1) în dezvoltarea și agresivitatea tumorii, ca principal regulator al reprogramării metabolice tumorale și dobândirea rezistenței la medicamente în celulele canceroase. De remarcat, a fost oferită, de asemenea, o privire de ansamblu asupra acțiunilor de reglare în normoxie ale HIF-1 în celulele canceroase, care au expresia constitutivă a acestei proteine. În strânsă legătură cu dezvoltarea rezistenței la medicamente în celulele canceroase, această teză a prezentat și strategii de tratament care vizează depășirea rezistenței tumorale, integrându-le cu descoperirile științifice de bază. Astfel, primele două capitole experimentale (**Capitolul 2 și 3**) au descris modul în care celulele de melanom murin B16.F10 (cultivate în modele 2D și 3D) s-ar putea adapta la acțiunile antitumorale ale diferitelor medicamente (Simvastatină (**SIM**) și Doxorubicină (**DOX**)), conducând la dezvoltarea ulterioară a toleranței la medicament prin modularea metabolismului TME-coordonat al tumorii. Pe baza acestor constatări, **Capitolul 4** a investigat eficacitatea antitumorală a administrării combinate a SIM și DOX prin nanoformulări care au capacitatea de a viza în mod activ atât TAM-urile (ca tip principal de celule cu funcții protumorale în TME) cât și celulele de melanom *in vivo*. Bazându-ne pe succesul nanopurtătorilor lipozomali funcționalizați cu IL-13 pentru a viza în mod specific TAM-urile, a doua parte a **capitolului 4** a evaluat dacă această abordare terapeutică bazată pe lipozomi conjugați cu IL-13 ar putea fi extinsă la transportarea unui medicament antiinflamator, prednisolon fosfat (**PLP**), pentru a ținti angiogeneza inflamatorie indusă de macrofagele asociate tumorii și de a reduce agresivitatea tumorală.

Ultimul capitol, **Capitolul 5** a oferit un rezumat al principalelor constatări legate de mecanismele de rezistență la medicamente și strategiile terapeutice concepute pentru a contracara aceste procese în celulele de melanom, cu accent deosebit pe eficacitatea tratamentului. Cercetările viitoare ar trebui să acorde prioritate validării acestor constatări în modele biologice mai complexe, inclusiv studii care utilizează linii celulare umane sau celule derivate de la pacienți, pentru a permite extrapolarea rezultatelor noastre de la modelul murin la om și pentru a optimiza în continuare caracteristicile acestor sistemelor de administrare a medicamentelor.

Progresia logică prezentată în această teză, începând cu explorarea mecanismelor de rezistență la medicamente, până la dezvoltarea de terapii țintite pentru a depăși aceste mecanisme, asigură că fiecare capitol se conectează la cel precedent și creează o contribuție științifică semnificativă în cercetarea cancerului.

CAPITOLUL 1. Introducere

1.1 Mecanisme moleculare implicate în semnele distinctive ale cancerului

Cancerul este un grup de boli caracterizate în primul rând prin diviziunea celulară necontrolată, rezistența la stimulii apoptotici și capacitatea de a se răspândi în organism. În celulele sănătoase, toate aceste procese sunt sub control strict. Călătoria către înțelegerea complexității cancerului a început în 2000, când cercetătorii Douglas Hanahan și Robert Weinberg au identificat și propus un set de șase trăsături/caracteristici esențiale și comune ale acestor tumori cunoscute sub numele de **Semnele distinctive ale cancerului**, dobândite în timpul progresiei tumorilor (Hanahan & Weinberg, 2000). Acest cadru a jucat un rol esențial în înțelegerea biologiei complexe a cancerului și a fost esențial în ghidarea cercetării și a strategiilor terapeutice. De-a lungul anilor, conceptul de semne distinctive ale cancerului a evoluat pentru a include noi trăsături și procese, reflectând natura dinamică a cancerului și implicațiile sale pentru dezvoltarea terapiei (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Micromediul tumoral (TME)

Micromediul tumoral (TME) este o zonă extrem de eterogenă de tumori, constând din celule non-maligne, cum ar fi fibroblaste asociate cancerului (CAF), macrofage asociate tumorilor (TAM), adipocite, celule endoteliale tumorale (TEC), trombocite educate tumoral (TEP), celule dendritice

(DC), celule T killer, limfocite T și celule stromale mezenchimale (MSC) (**Figura 2**) (Hanahan & Coussens, 2012). Fiecare dintre aceste tipuri de celule contribuie la progresia neoplazice (Fridman et al., 2017; Hanahan & Coussens, 2012; Jayatilaka & Phillip, 2019; Okamoto et al., 2019).

1.3 Factorul de inducere al hipoxiei - 1 (HIF-1) ca modulator cheie al dezvoltării tumorii în hipoxie, precum și în normoxie

1.2.1 Efecte induse de HIF-1 asupra dezvoltării tumorii în hipoxie

În tumori, TME este adesea lipsită de oxigen din cauza vaselor de sânge anormale și a activității crescute a celulelor tumorale. HIF-1 α joacă un rol central în a ajuta celulele tumorale să se adapteze la hipoxie prin reglarea directă a VEGF, TGF- β , IL-10 și PD-L1, întărind capacitatea tumorii de a suprima răspunsul imun (Logtenberg și colab., 2020; X. Meng și colab., 2018). De asemenea, promovează evadarea imună prin creșterea expresiei punctului de control imun, inducerea apoptozei celulelor T citotoxice și blocarea fagocitozei (Logtenberg și colab., 2020; Shen și colab., 2022).

1.2.2 Efecte induse de HIF-1 asupra dezvoltării tumorii în normoxie

Celulele canceroase prezintă mai multe adaptări în condiții de normoxie pentru a-și susține creșterea și supraviețuirea necontrolată, așa cum s-a demonstrat în celulele canceroase de sân uman (Li et al., 2018). În timp ce hipoxia a fost studiată pe larg în biologia cancerului, dovezile emergente sugerează că apar schimbări moleculare semnificative chiar și în condiții de normoxie (J. Zhang și colab., 2025). Rolul HIF-1 în metastaza cancerului în condiții de normoxie arată că nu este limitat la condițiile cu oxigen scăzut. Este critic în toate etapele metastazei cancerului, inclusiv migrarea locală, remodelarea matricei extracelulare și EMT (Araos și colab., 2018).

1.4 Reprogramarea metabolismului este un semn distinctiv al cancerului

Celulele canceroase se bazează pe căile metabolice modificate pentru a-și susține creșterea rapidă, supraviețuirea și rezistența la tratament. O adaptare cheie este preferința lor pentru glicoliză față de fosforilarea oxidativă, chiar și în prezența oxigenului - un fenomen cunoscut sub numele de efectul Warburg. Această schimbare duce la creșterea producției de lactat, care alimentează

proliferarea tumorii. În plus, celulele canceroase dezvoltă o dependență puternică de glutamină pentru a susține ciclul TCA, făcându-l o țintă terapeutică importantă. Supraexprimarea transportatorilor de glucoză precum GLUT1 îmbunătățește și mai mult absorbția de glucoză, susținând metabolismul cancerului. Căile oncogene precum PI3K/Akt și c-Myc reglează aceste adaptări metabolice, oferind tumorilor un avantaj de supraviețuire (Röhrig & Schulze, 2016; Tsouko și colab., 2014; Yu, 2011; S. Zhang și colab., 2024)

1.5 Strategii de dobândire a rezistenței la medicamente

Rezistența cancerului la diferite tratamente este rezultatul unei interacțiuni foarte complexe între factorii intrinseci (înnăscuți) și extrinseci (dobândiți) ai celulei canceroase. Mutațiile genetice preexistente, eterogenitatea tumorii și activarea căilor de apărare intracelulară sunt exemple de factori intrinseci care conferă rezistență prin activarea diferitelor căi oncogene, schimbarea țintelor medicamentoase, desensibilizarea la terapii, îmbunătățirea mecanismelor de reparare a ADN-ului și activarea căilor de supraviețuire, care, la rândul lor, permit celulelor canceroase să-și îmbunătățească rezistența la efectele citotoxice ale tratamentelor (Dzobo et al., 2018). Factorii extrinseci, pe de altă parte, constau în cea mai mare parte din componente TME care contribuie activ la capacitatea celulelor canceroase de a evita efectele citotoxice ale diferitelor tratamente anticancer (Labrie et al., 2022).

1.6 Strategii de depășire a rezistenței la medicamente

Toleranța pe care cancerul și celulele TME o dezvoltă la terapii nu numai că limitează eficacitatea terapiilor actuale, dar evidențiază nevoia de strategii avansate pentru a depăși rezistența și a îmbunătăți prognosticul (Kurt Yilmaz & Schiffer, 2021). Împreună, aceste progrese oferă noi modalități de a trata cancerul și de a gestiona rezistența (L. Meng și colab., 2024; Sadida și colab., 2024). Tratamentele vizate sunt destinate să vizeze selectiv moleculele sau căile care sunt anormal de active în celulele canceroase, spre deosebire de chimioterapia standard, care dăunează atât celulelor maligne, cât și celulelor sănătoase. Unul dintre principalele avantaje ale terapiei țintite este că poate aborda rezistența la medicamente (Garg și colab., 2024). Terapiile țintite pentru cancer includ mai multe clase de inhibitori care perturbă procesele celulare cheie.

Scopul și obiectivele tezei

Scopul general

Această teză a propus să investigheze mecanismele care stau la baza rezistenței timpurii induse de medicamente în celulele de melanom, pentru a dezvolta în continuare strategii terapeutice eficiente pentru tratamentul melanomului.

Obiectivele generale

1. Evaluarea mecanismelor prin care celulele de melanom murin B16.F10 (cultivate în modele 2D și 3D) ar putea dezvolta toleranță la acțiunile antitumorale ale diferitelor medicamente (Simvastatină (**SIM**) și Doxorubicină (**DOX**)).

Astfel, **Capitolul 2** și-a propus să exploreze modul în care inhibarea nivelului de constitutiv al factorului de inducere al hipoxiei-1 (HIF-1) de către SIM afectează metabolismul celulelor canceroase de melanom murin B16.F10 crescute în cultură 2D, în timp ce **Capitolul 3** s-a concentrat pe identificarea mecanismelor legate de inducerea timpurie a rezistenței la DOX, în aceleași celule canceroase dar crescute sub formă de sferoizi, după expunerea acestora la o concentrație subinhibitorie (IC30) a medicamentului citotoxic.

2. Dezvoltarea de terapii de țintire activă bazate pe nanoformulări cu activitate antitumorală îmbunătățită și potențial de prevenire a dezvoltării rezistenței la medicamente în tumori din celule de melanom B16.F10.

Astfel, **capitolul 4.1** și-a propus să dezvolte o terapie țintită îmbunătățită pentru melanom prin optimizarea și evaluarea eficacității unei administrări secvențiale de nanoformulari bazate pe lipozomi cu timp prelungit în circulație conjugați cu IL-13 care conțin SIM (IL-13-LCL-SIM) pentru a ținti macrofagele asociate tumorilor și vezicule extracelulare stabilizate cu PEG, încărcate cu DOX (PEG-EV-DOX) pentru a viza celulele de melanom. **Capitolul 4.2** s-a concentrat pe dezvoltarea lipozomilor cu timp prelungit în circulație conjugați cu IL-13 care conțin prednisolon fosfat (IL-13-LCL-PLP) pentru a îmbunătăți specificitatea medicamentului pentru angiogeneza și inflamația mediată de macrofagele asociate tumorii, reducând în cele din urmă agresivitatea melanomului murin B16.F10.

CAPITOLUL 2

In Normoxie, Simvastatina Modifică Metabolismul Lipidic al Celulelor de Melanom

B16.F10 pentru a le susține agresivitatea

Studiile noastre anterioare au demonstrat o legătură strânsă între inhibarea proliferării celulelor de melanom murin B16.F10-dependentă de SIM *in vivo* și *in vitro* și suprimarea puternică a subunității α a factorului de inducere al hipoxiei-1 (HIF-1 α) în aceste celule canceroase agresive. Acest studiu investighează impactul SIM asupra reprogramării metabolice a celulelor de melanom murin B16.F10 în condiții de normoxie. Studiile anterioare au arătat că SIM inhibă expresia factorului de inducere al hipoxiei-1 subunitatea α (HIF-1 α), un regulator cheie al metabolismului cancerului, chiar și în normoxie. Bazându-ne pe aceste descoperiri, ne-am propus să explorăm mecanismele moleculare prin care SIM modulează metabolismul celulelor de melanom, concentrându-ne în special pe metabolismul lipidelor și cel energetic. Pentru a realiza acest lucru, a fost efectuată analiza de secvențiere a ARN pentru a examina modificările expresiei genelor în metabolism sub acțiunea SIM. Analiza Western blot a fost utilizată pentru a evalua nivelurile de exprimare proteică a unor regulatori metabolici cheie, inclusiv HIF-1 α , transportorul de glucoză 1 (GLUT1), acid-gras sintetaza (FASN), stearil-CoA desaturaza 1 (SCD1) și acil-CoA oxidaza (ACOX3), în timp ce testele enzimatice au determinat activitățile catalitice ale unor enzime cheie precum fosfofructokinaza (PFK) și lactat dehidrogenaza (LDH). Rezultatele noastre au arătat că tratamentul cu SIM a modulat în mod semnificativ exprimarea genelor implicate în biosinteza colesterolului și metabolismul acizilor grași, inducând o schimbare către producția accelerată de acizi grași nesaturați și de izoprenoizi. Mai mult, administrarea SIM a condus la o reducere a glicolizei, așa cum este evidențiată de scăderea activităților catalitice ale PFK și LDH, redirecționând celulele de melanom către metabolismul lipidic. Am investigat, de asemenea, efectul SIM asupra căii de sinteză a mevalonatului, observând că SIM a redus expresia genelor care codifică Proteina de legare a elementelor de reglare a sterolului (SREBPs) și *forkhead box M1* (FOXM1), regulatori cheie ai biosintezei colesterolului. În schimb, mai multe gene care codifică enzime ale căii mevalonatului au fost reglate pozitiv, excluzând HMG-CR, enzima reglatoare. Această trecere către o biosinteză îmbunătățită a lipidelor poate contribui la supraviețuirea celulelor de melanom și la potențialul metastatic, susținând ideea că tratamentul cu SIM promovează producția de molecule de semnalizare derivate din lipide, cum ar fi izoprenozii

și prostaglandinele, în micromediul normoxic al celulelor tumorale. Pe scurt, SIM a reprogramat metabolismul celulelor de melanom prin inhibarea glicolizei și promovarea metabolismului lipidic, în special acizii grași nesaturați și izoprenoizilor. Aceste schimbări au sporit probabil supraviețuirea și agresivitatea celulelor de melanom. Tintirea biosintezei lipidelor, a turnover-ului prostaglandinelor și metabolismul glutaminei ar putea modifica flexibilitatea metabolică a celulelor de melanom, oferind o potențială strategie pentru a depăși mecanismele adaptative din normoxie conduse de HIF-1 α și pentru a îmbunătăți rezultatele tratamentului.

CAPITOLUL 3

Explorarea mecanismelor de rezistență dobândită timpurie la doxorubicină în model 3D de melanom

Chimioresistența continuă să rămână o barieră semnificativă în tratamentul eficient al diferitelor tipuri de cancer, inclusiv melanomul. Studiile anterioare, inclusiv ale noastre, au demonstrat eficacitatea limitată a doxorubicinei (DOX) împotriva celulelor de melanom și a tumorilor, atât *in vitro*, cât și *in vivo*, în principal datorită chimioresistenței dobândite. Acest studiu explorează răspunsurile adaptive timpurii în sferoizii melanomului B16.F10 după două expuneri sub-inhibitoare DOX ($\approx$ IC30), concentrându-se pe mecanismele de chimioresistență în reglarea ciclului celular, repararea ADN-ului, apoptoză, angiogeneză și invazivitate. Sferoizii de melanom au fost cultivați în plăci de atașare ultra-scăzută și tratați cu DOX în două faze de 48 de ore separate de perioade de recuperare de 48 de ore, urmate de evaluări ale viabilității, morfologiei, expresiei genei/proteinei și activității enzimatică folosind ARN-seq, RT-qPCR, Western blot și respectiv gelatinază. Analiza funcțională a confirmat reglarea în jos a căilor ciclului celular, suprimarea răspunsului la stres și căile de supraviețuire (de exemplu, TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB și MTORC1_SIGNALING). În ciuda datelor ARNm care arată oprirea ciclului celular (CDK1 reglat în jos, Ticrr, Cdc20) și deteriorarea majoră a ADN-ului și repararea afectată (BRIP1, BARD1, Rad51, Rmi2 reglată în jos), după prima expunere la DOX, celulele probabil au ocolit punctele de control ale ciclului celular prin favorizarea transcrierii și translației proteinelor legate de supraviețuire (*Tnfrsf19*, cIAP-2) și angiogeneza (VEGF, eotaxin-1) cât și a transcrierii unor gene legate de adeziunea celulară (membrii familiei Pcdh beta) și remodelarea matricei extracelulare (Ecm1, Jam2), sugerând mecanisme de adaptare timpurie la DOX. Odată cu o a doua expunere la

DOX, sferoizii au prezentat chimioresistență mai puternică, evidențiată de angiogeneză îmbunătățită (Aqp1, VEGF și Ackr3 suprareglate), invazie crescută (MMP-2, MMP-9) și o creștere cu 40% a nivelului de exprimare proteică a pNF-kB, întărind toleranța la DOX și agresivitatea. Acest studiu oferă informații valoroase asupra factorilor moleculari ai chimioresistenței, dezvăluind că rezistența timpurie la DOX în melanom provine din mecanismele adaptive care sporesc supraviețuirea, angiogeneza și invazivitatea. Expunerea repetată la DOX întărește aceste trăsături, susținând toleranța la medicamente.

CAPITOLUL 4. Depășirea rezistenței induse de medicamente prin abordări terapeutice cu țintire activă

Secțiunea 4.1. Nanoformulările active care vizează tumorile și care conțin simvastatină și doxorubicină inhibă creșterea melanomului și angiogeneza

Agresivitatea melanomului primar este determinată de selecția și creșterea rapidă a clonelor celulare rezistente la tratamentele convenționale, rezultând metastaze și recidive. Există o nevoie urgentă de a dezvolta strategii selective și specifice de livrare a medicamentelor pentru modularea interacțiunii dintre celulele canceroase și celulele imune în micromediul tumoral. Acest studiu propune o nouă terapie combinată constând în administrarea secvențială de SIM încorporată în lipozomii cu timp lung în circulație funcționalizați cu IL-13 (IL-13-LCL-SIM) și DOX încapsulată în vezicule extracelulare acoperite cu PEG (PEG-EV-DOX) pentru a ținti selectiv atât macrofagele asociate tumorilor, cât și celulele de melanom. În acest scop, IL-13 a fost conjugat la LCL-SIM care au fost obținuți prin metoda de hidratare a filmului lipidic. EV-urile îmbogățite din celulele de melanom au fost încărcate pasiv cu DOX. Ulterior, agenții terapeutici au fost administrați i.v la șoareci purtători de melanom B16.F10, iar dimensiunea tumorii a fost monitorizată în timpul tratamentului. Mecanismele moleculare ale activității antitumorale au fost investigate folosind array de proteine angiogenice și inflamatorii și analiză Western blot a markerilor de invazie (HIF-1) și apoptoză (Bcl-xL și Bax). Cuantificarea markerului de stres oxidativ malondialdehidei (MDA) a fost determinată prin HPLC. Colorarea imunohistochimică a markerilor angiogenici CD31 și VEGF și a markerului panmacrofag F4/80 a fost efectuată pentru a valida descoperirile noastre. Datele *in vitro* au arătat că LCL funcționalizat cu IL-13 au fost preluați în mod preferențial de

macrofagele asociate tumorii și au indicat că administrarea secvențială a IL-13-LCL-SIM și PEG-EV-DOX a avut cel mai puternic efect antiproliferativ asupra celulelor tumorale co-cultivate cu macrofagele asociate tumorii (TAMs). În consecință, a fost raportată *in vivo* o inhibare puternică a creșterii tumorii în grupul tratat cu terapia combinată secvențială. Datele noastre au sugerat că acțiunea antitumorală a tratamentului combinat a fost exercitată prin inhibarea puternică a mai multor factori pro-angiogenici (VEGF, bFGF și CD31) și prin favorizarea translației proteinei pro-apoptotice Bax indusă de stresul oxidativ. Această strategie nouă de livrare a medicamentelor bazată pe direcționarea activă combinată atât a celulelor canceroase, cât și a celulelor imune a fost capabilă să inducă un efect antitumoral puternic prin întreruperea interacțiunilor reciproce dintre TAMs și celulele de melanom.

Secțiunea 4.2. Țintirea macrofagelor M2 cu prednisolon lipozomal funcționalizați cu IL-13 inhibă angiogeneza melanomului *in vivo*

Cooperarea complexă dintre celulele canceroase și celulele stromale netumorale din micromediul melanomului (MME) permite progresia tumorii și metastaza. Am demonstrat anterior că interacțiunea dintre macrofagele asociate tumorii (TAMs) și celulele de melanom poate fi perturbată prin utilizarea lipozomilor cu timp prelungit în circulație (LCL) care încapsulează prednisolon fosfat (PLP) (LCL-PLP) și care inhibă angiogeneza tumorală coordonată de TAMs. În studiul de față, scopul nostru a fost să îmbunătățim specificitatea LCL pentru macrofagele protumorale (macrofage asemănătoare M2 (adică, TAMs)) și să inducem o acumulare mai precisă la locul tumorii prin încărcarea PLP în lipozomi conjugați cu IL-13 (IL-13-LCL-PLP), deoarece receptorul IL-13 este supraexprimat în acest tip de macrofage. Formularea lipozomală IL-13-LCL-PLP a fost obținută prin atașarea covalentă a IL-13 tiolat la LCL-PLP funcționalizat cu maleimidă. Șoarecii C57BL/6 purtând tumori de melanom B16.F10 s.c au fost utilizați pentru a investiga acțiunea antitumorală a LCL-PLP și IL-13-LCL-PLP. Rezultatele noastre au arătat că formularea IL-13-LCL-PLP a rămas stabilă în fluidele biologice după 24 de ore și a fost preluată de preferință de macrofagele polarizate M2. IL-13-LCL-PLP a indus inhibarea puternică a creșterii tumorii în comparație cu LCL-PLP nefuncționalizat la aceeași doză, prin modificarea angiogenezei mediate de TAMs și a stresului oxidativ, limitând rezistența la apoptoză și caracteristicile invazive în MME.

Aceste descoperiri sugerează că IL-13-LCL-PLP ar putea deveni o platformă promițătoare de livrare a agenților chimioterapeutici în melanom.

CAPITOLUL 5

Concluzii generale

Capitolul 2 Datele noastre au arătat că celulele de melanom murin B16.F10 s-au adaptat la tratamentul cu SIM prin realizarea unor modificări metabolice semnificative, și anume au favorizat metabolismul lipidic. Acest lucru a dus la acumularea de acizi grași nesaturați și cel mai probabil, la sinteza de izoprenoizi și prostaglandine, susținând supraviețuirea și agresivitatea celulelor de melanom.

Capitolul 3 Studiul a arătat că rezistența timpurie la DOX a celulelor de melanom B16.F10 crescute sub formă tridimensională de sferoizi a fost indusă de mecanisme de adaptare care au promovat supraviețuirea celulelor, angiogeneza și creșterea gradului de invazie. Aceste rezultate au evidențiat importanța identificării și țintirii biomarkerilor timpurii de rezistență la medicamente pentru a depăși rezistență la terapie în melanom.

Capitolul 4.1 Noua terapie secvențială de țintire activă dezvoltată în acest studiu a vizat în mod eficient micromediul de melanom murin B16.F10, ducând la suprimarea aproape totală a creșterii tumorale, în principal datorită efectului anti-angiogenic al acestei terapii. Lipozomii cu SIM funcționalizați cu IL-13 au vizat în mod specific funcțiile pro-angiogenice ale macrofagelor asociate tumorii și a sensibilizat celulele de melanom la citotoxicitatea indusă de PEG-EV-DOX.

Capitolul 4.2 Efectul terapeutic al IL-13-LCL-PLP a rezultat din capacitatea lor de a modifica angiogeneza inflamatorie mediată de macrofagelor asociate tumorii, reducând rolurile de protecție a tumorii care duc în mod normal la rezistență la terapie.

Noutatea studiilor

Capitolul 2 aduce o noutate prin examinarea efectelor inhibării exprimării constitutive ale factorului HIF-1 α de către SIM asupra metabolismului celulelor de melanom B16.F10 în condiții de normoxie, un aspect mai puțin înțeles în comparație cu efectele bine studiate în hipoxie. Datele noastre arată că celulele de melanom s-au adaptat la acest tratament prin favorizarea metabolismului lipidic care susține agresivitatea celulelor canceroase.

Capitolul 3 oferă noi informații asupra rezistenței la DOX în stadiu incipient în celulele de melanom B16.F10 crescute ca model 3D care mimează heterogenitatea micromediului tumoral, permițând evidențierea unor biomarkeri ai rezistenței legați de procese protumorale precum angiogeneza, invazia și apoptoza inhibată, o abordare neexplorată anterior.

Noutatea **capitolului 4** constă în dezvoltarea de strategii terapeutice țintite care reduc agresivitatea melanomului și mecanismele de rezistență asociate, prin țintirea simultană a celulelor canceroase și a proceselor protumorale mediate de macrofagelor asociate tumorii în cadrul micromediului tumoral.

Perspective de viitor

Capitolul 2 Pentru a evalua relevanța clinică a rezultatelor, validarea ulterioară în sisteme mai complexe, cum ar fi sferoizii, organoizii cu linii celulare umane ar contribui la confirmarea/extrapolarea rezultatelor noastre de la modelul murin la om. Mai mult, datele noastre evidențiază posibile ținte metabolice în celulele de melanom murin care ar putea fi exploatate terapeutic, deschizând căi pentru strategii noi de tratament.

Capitolul 3 Studiile viitoare ar trebui să exploreze efectele DOX asupra acestui model 3D și în combinație cu alte tipuri de celule netumorale din micromediul tumoral pentru a înțelege mai bine interconexiunea celulară în contextul chimiorezistenței. Identificarea biomarkerilor în celulele derivate de la pacienți ar putea ajuta la dezvoltarea strategiilor de depășire a rezistenței la DOX prin crearea de terapii personalizate cu rezultate îmbunătățite.

Capitolul 4.1 Studiile viitoare ar putea optimiza terapia combinată prezentată pentru a reprograma macrofagele asociate tumorii de la fenotipul M2 protumoral la unul M1 antitumoral, favorizând răspunsurile imune antitumorale. Combinarea acestei abordări cu inhibitori ai punctelor de control imun ar putea îmbunătăți rezultatele terapeutice în melanom și alte tipuri de cancer agresiv.

Capitolul 4.2 Pentru a favoriza efectul terapeutic, studiile viitoare ar trebui să exploreze administrarea simultană a terapiei propuse în acest studiu cu alte strategii terapeutice.

În concluzie, această teză de doctorat oferă perspective valoroase asupra mecanismelor de rezistență la medicamentele antitumorale investigate și prezintă noi strategii terapeutice promițătoare pentru viitoare aplicații clinice.

Lista publicațiilor incluse în teză

Negrea, G., Rauca, V. F., Meszaros, M. S., Patras, L., Luput, L., Licarete, E., Toma, V. A., Porfire, A., Muntean, D., Sesarman, A., & Banciu, M. (2022). Active Tumor-Targeting Nano-formulations Containing Simvastatin and Doxorubicin Inhibit Melanoma Growth and Angiogenesis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 870347. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.870347>.

Sesarman, A., Luput, L., Rauca, V., Patras, L., Licarete, E., Meszaros, S., Dume, B., **Negrea, G.**, Toma, V., Muntean, D., Porfire, A., Banciu, M. (2024). Targeting of M2 macrophages with IL-13-functionalized liposomal prednisolone inhibits melanoma angiogenesis in vivo. *Journal of Liposome Research*, 34(4), 535–546. <https://doi.org/10.1080/08982104.2024.2315452>

Lista publicațiilor neincluse în teză

Patras L, Sesarman A, **Negrea G**, Dragan SM, Meszaros M-S, Licarete E, Rauca V, Luput L, Alupei M, Porfire A, Banciu M. Cancer therapeutic strategies to rewire tumor microenvironment .*SEE J Immunol.* 2025 Mar 27;8 (CITIM):030. <https://doi.org/10.3889/seejim.2025.6091>

Tóth, Z. R., Kiss, J., Todea, M., Kovács, G., Gyulavári, T., Sesarman, A., **Negrea, G.**, Vodnar, D. C., Szabó, A., Baia, L., & Magyar, K. (2022). Bioactive Properties of Composites Based on Silicate Glasses and Different Silver and Gold Structures. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/ma15051655>.

Tóth, Z. R., Kiss, J., Todea, M., Kovács, G., Gyulavári, T., Sesarman, A., **Negrea, G.**, Vodnar, D. C., Szabó, A., Baia, L., & Magyar, K. (2022). Bioactive Properties of Composites Based on Silicate Glasses and Different Silver and Gold Structures. *Materials (Basel, Switzerland)*, 15(5), 1655. <https://doi.org/10.3390/ma15051655>

Patras, L., Ionescu, A. E., Munteanu, C., Hajdu, R., Kosa, A., Porfire, A., Licarete, E., Rauca, V. F., Sesarman, A., Luput, L., Bulzu, P., Chiroi, P., Tranca, R. A., Meszaros, M., **Negrea, G.**, Barbu-

Tudoran, L., Potara, M., Szedlacsek, S., & Banciu, M. (2022). Trojan horse treatment based on PEG-coated extracellular vesicles to deliver doxorubicin to melanoma in vitro and in vivo. *Cancer biology & therapy*, 23(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.2003656>

Lista participărilor la conferințe și simpozioane internaționale

Pe parcursul studiilor doctorale, am participat activ la peste 10 conferințe, cu prezentare orală și/sau poster. De exemplu:

Prezentare tip poster la 48th FEBS Congress, 29 June–3 July 2024, Milano, Italy – “Giorgiana Negrea, Loredana Balacescu, Alina Sesarman, Manuela Banciu. Simvastatin Triggers a Metabolic Shift Towards Lipid Metabolism in B16.F10 Murine Melanoma Cells – “FEBD 2024 published FEBS Open Bio 14 (Supplement 2) (2024) 94–516 DOI: 10.1002/2211-5463.13837Ó, P-26-015, pp 259.

Prezentare tip poster la EMBO Congress, 29-31 May 2024, Rimini, Italy – “Giorgiana- Gabriela Negrea, Szilvia Meszaros, Ștefan Drăgan, Vlad-Alexandru Toma, Bogdan-Răzvan Dume, Valentin-Florian Rauca, Laura Pătraș, Emilia Licărete, Manuela Banciu, Alina Sesărman. Unveiling the Complexity of Tumor Microenvironment Chemoresistance in Melanoma via Spheroid Mimicry (2024)” - EMBO WS „The many faces of cancer evolution”, Rimini 2024 | Abstract Book pp. 73, P34.

Prezentare orală la The Annual International Conference of Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology (RSBMB), September 2023, Cluj-Napoca, Romania - Simvastatin – “Giorgiana G. Negrea, Loredana Bălăcescu, Alina Sesărman, Manuela Banciu. Induced Energy Metabolic Shift Towards Lipid Metabolism in B16.F10 Murine Melanoma Cells”. Abstract published in STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI, BIOLOGIA, 68, 2, 2023, ABSTRACT 58, pp. 34.

Prezentare e-Poster tip prezentare orală scurtă de 5 minute la 2nd Conference edition Connecting scientists and Physicians for Next Generation Cancer Management, Oncohub "

21 - 23 September 2022, Poiana Braşov, Romania –“Giorgiana Negrea, Valentin-Florian Rauca, Marta Szilvia Meszaros, Laura Patras, Lavinia Luput, Emilia Licarete, Vlad- Alexandru Toma, Alina Porfire, Dana Muntean, Alina Sesarman and Manuela Banciu. Innovative Tumor-targeting Nanoformulations Containing Simvastatin and Doxorubicin Decrease Murine Melanoma Aggressiveness *in vivo*” **Oncohub conference** Poiana Brasov 2022 |Abstract Book, Pp. 32.

Prezentare orală la International Conference and XXXIX Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology - October 21st-23rd, Cluj-Napoca, Romania RSCB 2022 – “Giorgiana G. Negrea, Loredana Bălăcescu, Alina Sesărman, Manuela Banciu. Modulatory Effects of Simvastatin on the metabolism of B16.F10. murine melanoma cells under normoxia *in vitro*.” RSCB, October 2022, Cluj-Napoca.

Surse de finanțare pentru proiectele incluse în această teză de doctorat

Sprijinul financiar pentru această teză a fost asigurat de următoarele proiecte: L’Oréal - UNESCO “For Women in Science” Fellowship Programme (No. 914, 2020), UEFISCDI grants (PN-III-P2-2_1-PED-2021-0411, No. 659PED, 2022, PN-III-P4-ID-PCE-2016-0342, No. 91/2017, PN-III-P1-1.1-TE-2019-1320, No. TE 121/14.09.2020), Babeş-Bolyai University Grants for Young Researchers (No. 35282/2020), Grants for the Support of Strategic Infrastructure (33PFE/2018, CNFIS-FDI-2020-0387), și bursa științifică (No. 36597/25.11.2022), cât și sursa de la Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) număr Project-ID 360372040 (SFB 1335).