

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ DENTARĂ**



**EXPLORAREA ROLULUI PROTEINEI KRAS
JUCAT IN PEISAJUL MOLECULAR AL CANCERULUI
ORAL CU CELULE SCUAMOASE
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. ALEXANDRA RIPSZKY**

BIANCA VOICU BĂLAȘEA

Student-doctorand:

Cuprins

INTRODUCERE	5
I. Partea generală: Stadiul actual al cunoașterii	5
Capitolul 1. OSCC	5
1.1 Caracterizare OSCC	5
1.1.1 Mutații.....	5
1.1.2 Fenotip	5
1.1.3 Agresivitate	5
1.1.4 Frecvență.....	5
1.2 Rolul KRAS în OSCC	5
1.2.1 Funcțiile moleculare ale KRAS	6
1.2.2 Prevalența mutațiilor KRAS în OSCC	6
1.2.4 Nivelurile de expresie ale KRAS în OSCC	6
1.3. Căi de semnalizare asociate KRAS	6
1.3.1 Proteina KRAS și calea de semnalizare MAPK în OSCC	6
1.3.2 KRAS și apoptoza în OSCC	6
1.3.3 KRAS și autofagia în OSCC.....	6
Capitolul 2. Biocompuși cu potențial antitumoral	7
2.1. Curcumina	7
2.1.1 Proveniență	7
2.1.2 Structura chimică	7
2.1.3 Mecanism de acțiune și studii privind efectele curcuminei.....	7
2.1.4 Biodisponibilitatea curcuminei	7
2.2. Apigenina.....	7
2.2.1 Proveniență	7
2.2.2 Structura chimică	7
2.2.3 Mecanisme de acțiune și efectele biologice ale apigeninei	7
2.2.4 Biodisponibilitatea apigeninei	7
2.3. Cordicepina	7
2.3.1 Proveniență	7
2.3.2 Structura chimică	7

2.3.3 Mecanisme de acțiune și studii privind efectele cordicepinei	7
2.3.4 Biodisponibilitatea cordicepinei	7
II. Contribuții personale	8
Capitolul 3: Ipoteza de lucru și obiectivele generale	8
3.1. Ipoteza de lucru	8
3.2. Obiectivele Cercetării.....	8
Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării	9
4.1. Biocompușii.....	9
4.2. Cultivarea celulelor	9
4.3. Monitorizare în timp real a celulelor timp de 48 h – HoloMonitor® M4.....	9
4.4. Activitatea metabolică mitocondrială (MTT).....	9
4.5. Dozarea lactat dehidrogenazei (LDH).....	9
4.6. Testul Griess	9
4.7. Specii reactive de oxigen (ROS)	9
4.8. Glutathionul redus (GSH).....	9
4.9. Dozarea ATP intracelular.....	10
4.10. Determinarea activării autofagiei	10
4.11. Activitatea caspazelor-3/7 (fluorescență)	10
4.13. Determinarea izoformelor RAS (KRAS, HRAS, NRAS) – testare multiplex	10
4.14. Analiză statistică.....	10
Capitolul 5. Evaluarea comparativă a efectelor citotoxice și a mecanismelor moleculare ale curcuminei în celulele scuamoase orale tumorale și în celulele epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, apoptozei și proteinei KRAS. – Studiul 1.....	11
5.1. Introducere.....	11
5.2. Materiale și metode	11
5.3.Rezultate	11
5.3.1.Citotoxicitatea diferențială a curcuminei asupra celulelor HGEpiC și OECM-1	11
5.3.2. Activitatea caspazelor-3/7 după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la curcumină.....	11
5.3.3. Microscopia holografică digitală arată efecte specifice ale curcuminei asupra volumului și morfologiei celulare	11

5.3.4. Urmărirea celulelor individuale arată că biocompusul curcumină induce contracție progresivă (shrinkage celular) a celulelor OECM-1	11
5.3.5. Tratamentul cu biocompusul curcumină inhibă motilitatea și migrarea celulelor OECM-1	11
5.3.6. Proteine corelate cu apoptoza timpurie după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la curcumină	12
5.3.7. Panel de semnalizare Ras-Raf în HGEpiC și OECM-1 după expunerea la curcumină	12
5.4. Discuții	12
5.5. Concluzii	12
Capitolul 6. Analiza comparativă a efectelor apigeninei asupra celulelor scuamoase orale tumorale și a celulelor epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, autofagiei și apoptozei - Studiul 2.....	13
6.1. Introducere.....	13
6.2. Materiale și metode	13
6.3. Rezultate	13
6.3.1. Impactul asupra proliferării, activității metabolice și statusului energetic	13
6.3.2. Stres oxidativ și apărare antioxidantă	13
6.3.4. Semnalizare pro-survival vs. pro-apoptotică	13
6.3.5. Apoptoza târzie	14
6.4. Discuții	14
6.5. Concluzii	14
Capitolul 7. Analiza comparativă a efectelor cordicepinei asupra celulelor scuamoase orale tumorale și a celulelor epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, apoptozei și KRAS – Studiul 3.....	15
7.1. Introducere.....	15
7.2. Materiale și metode	15
7.3. Rezultate	15
7.3.1. Citotoxicitatea diferențială a cordicepinei asupra celulelor HGEpiC și OECM-1	15
7.3.2. Activitatea caspazelor-3/7 după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la cordicepină	15
7.3.3. Microscopie holografică digitală arată că moartea celulară apoptotică indusă de cordicepină nu inhibă complet diviziunea celulară	15

7.3.4. Proteine corelate cu apoptoza timpurie după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la cordicepină	15
7.3.5. Panel de semnalizare Ras-Raf în HGEpiC și OECM-1 după expunerea la cordicepină	16
7.4. Discuții	16
7.5. Concluzii	16
Capitolul 8. Analiza comparativă a efectelor combinațiilor dintre curcumină și cordicepină asupra celulelor scuamoase orale tumorale și a celulelor epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, apoptoza și KRAS – Studiul 4.....	17
8.1. Introducere.....	17
8.2. Materiale și metode	17
8.3. Rezultate	17
8.3.1. Citotoxicitatea diferențială a combinației curcumină-cordicepină asupra celulelor HGEpiC și OECM-1	17
8.3.2. Activitatea caspazelor-3/7 după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la combinația curcumină-cordicepină	17
8.3.3. Microscopie holografică digitală arată că tratamentul cu combinația curcumină-cordicepină amplifică efectele antitumorale și inhibă proliferarea și motilitatea	17
8.3.4. Proteine corelate cu apoptoza timpurie după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la combinația curcumină-cordicepină	18
8.3.5. Panel de semnalizare Ras-Raf în HGEpiC și OECM-1 după expunerea la combinația curcumină-cordicepină	18
8.4. Discuții	18
8.5. Concluzii	18
Capitol 9. Concluzii și contribuții personale.....	19
9.1 Concluzii	19
9.2 Contributii proprii.....	19

INTRODUCERE

Carcinomul scuamos oral (OSCC) este o tumoră agresivă, caracterizată prin recurență și rezistență terapeutică, fiind necesare strategii selective care să afecteze celulele tumorale fără toxicitate asupra țesuturilor normale. Progresia OSCC este asociată cu dezechilibrul redox, interacțiunea autofagie–apoptoză și activarea căilor oncogenice KRAS/PI3K/AKT/mTOR și RAF/MEK/ERK.

Studiul pornește de la ipoteza că apigenina, curcumina și cordicepina modulează diferențiat axa ROS–autofagie–apoptoză în celulele OSCC comparativ cu celulele epiteliale normale, prin mecanisme asociate KRAS.

Obiectivele au inclus evaluarea citotoxicității selective, investigarea stresului oxidativ, autofagiei, apoptozei și expresiei KRAS, precum și analiza efectelor combinațiilor de compuși. Cercetarea a utilizat o abordare multiparametrică in vitro pe celule OECM-1 și HGEpiC, incluzând teste de viabilitate, citotoxicitate, stres oxidativ, analize ale autofagiei/apoptozei și monitorizare morfologică în timp real.

În ansamblu, studiul evidențiază potențialul terapeutic al compușilor naturali în țințirea vulnerabilităților moleculare ale OSCC.

I. Partea generală: Stadiul actual al cunoașterii

Capitolul 1. OSCC

1.1 Caracterizare OSCC

Datele privind relația OSCC – KRAS au fost publicate anterior [40].

1.1.1 Mutații

OSCC se dezvoltă prin acumularea de mutații în gene supresoare tumorale (*TP53*, *CDKN2A*) și proto-oncogene (*EGFR*, *PIK3CA*) [2,3]. Factorii de risc principali includ fumatul, consumul de alcool, infecția cu HPV și expunerea la substanțe genotoxice [3,5].

1.1.2 Fenotip

Clinic, OSCC se manifestă prin leziuni ulcerative sau exofitice, cu caracter infiltrativ. Aceste caracteristici reflectă modificările genetice și influențează răspunsul la tratament [3].

1.1.3 Agresivitate

OSCC are un comportament agresiv, caracterizat prin metastaze ganglionare și recurență locală [2]. Rezistența la terapiile convenționale justifică dezvoltarea unor tratamente țințite pe mecanisme moleculare specifice [2,3].

1.1.4 Frecvență

OSCC are o incidență ridicată la nivel global, mai frecventă în Asia de Sud și Sud-Est, Africa și Europa de Est, predominant la bărbați [4]. Distribuția geografică este influențată de consumul de tutun și alcool [5]. În 2019, au fost raportate aproximativ 370 000–380 000 de cazuri noi și până la 180 000 de decese la nivel mondial [4].

1.2 Rolul KRAS în OSCC

Deși mutațiile genei *KRAS* sunt raportate mai frecvent în alte tipuri de cancer, precum cele pancreatice, colorectale sau pulmonare, semnalizarea dependentă de familia RAS reprezintă un

element central al rețelelor oncogenice implicate în carcinogeneză, inclusiv în carcinomul scuamos oral (OSCC) [14,41].

1.2.1 Funcțiile moleculare ale KRAS

Proto-oncogenă *KRAS*, membră a familiei genelor RAS, codifică o proteină GTP-azică (KRAS) implicată în reglarea proceselor fundamentale de creștere, proliferare și supraviețuire celulară [41].

1.2.2 Prevalența mutațiilor KRAS în OSCC

Mutațiile *RAS*, în special *KRAS*, sunt frecvente în numeroase tumori, însă în OSCC apar rar [51]. Totuși, activarea căii MAPK poate susține proliferarea și supraviețuirea celulară [18]. Studiile disponibile raportează mutații *KRAS* cu frecvență scăzută, predominant G12D și G12V, variabilitatea fiind influențată de factori geografici, etnici și metodele de detecție.

1.2.3 Proteina KRAS și dezvoltarea OSCC

Proteina KRAS joacă un rol important în patogeneza OSCC. Inhibarea ICMT afectează ancorarea și activitatea KRAS la nivelul membranei celulare, reducând proliferarea și migrarea celulară și inducând apoptoza în TSCC [60]. De asemenea, reglarea expresiei KRAS prin miR-181d și miR-181a inhibă proliferarea și stimulează apoptoza în celulele OSCC, susținând rolul său de promotor tumoral [61,62].

1.2.4 Nivelurile de expresie ale KRAS în OSCC

Expresia *KRAS* poate fi asociată cu invazia, metastazarea și agresivitatea OSCC, sugerând un potențial rol prognostic [14,63,64]. Implicarea sa în căile MAPK și PI3K/Akt/mTOR indică o posibilă relevanță în terapiile țintite și în răspunsul la tratament. Totuși, dovezile actuale sunt limitate, fiind necesare studii suplimentare pe cohorte mai mari pentru validare [14,63,64].

1.3. Căi de semnalizare asociate KRAS

1.3.1 Proteina KRAS și calea de semnalizare MAPK în OSCC

În ansamblu, KRAS activează calea MAPK, favorizând carcinogeneza prin proliferare, supraviețuire și invazie celulară. Astfel, inhibitorii Ras/Raf/MEK/ERK reprezintă strategii terapeutice promițătoare în OSCC [46].

1.3.2 KRAS și apoptoza în OSCC

În OSCC, căile RAS/RAF/MEK/ERK și PI3K/AKT/mTOR sunt frecvent activate, favorizând proliferarea celulară și rezistența la apoptoză [79,80]. *KRAS* contribuie la acest proces prin activarea semnalelor de supraviețuire celulară, iar inhibarea acestor căi poate induce apoptoza și reduce progresia tumorală [20].

1.3.3 KRAS și autofagia în OSCC

În OSCC, autofagia reglează proliferarea și apoptoza, având un rol dual în progresia tumorală [87–89]. KRAS poate inhiba autofagia prin calea PI3K/AKT/mTOR sau o poate activa prin MAPK, în funcție de contextul celular [91]. În tumorile dependente de KRAS, autofagia poate favoriza atât supraviețuirea, cât și moartea celulară, ceea ce face din KRAS și autofagie ținte terapeutice promițătoare [91–93].

Capitolul 2. Biocompuși cu potențial antitumoral

2.1. Curcumina

2.1.1 Proveniență

Curcumina, principalul polifenol din *Curcuma longa* (turmeric), este utilizată tradițional ca aliment și agent medicinal și este studiată pentru efectele sale antioxidante, antiinflamatorii și anticancerigene [28].

2.1.2 Structura chimică

Curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion), cunoscută și ca diferuloimetan, are formula moleculară $C_{21}H_{20}O_6$ și o structură simetrică formată din două nuclee fenolice unite printr-un lanț heptadienic central.

2.1.3 Mecanism de acțiune și studii privind efectele curcuminei

Curcumina are efecte anticancerigene și pro-apoptotice, modulând căi implicate în inflamație și proliferare, precum NF- κ B, Wnt/ β -catenină și EGFR [95].

2.1.4 Biodisponibilitatea curcuminei

Curcumina are biodisponibilitate redusă din cauza solubilității scăzute și metabolizării rapide, însă formulările nano îi pot îmbunătăți stabilitatea și livrarea tumorală [96].

2.2. Apigenina

2.2.1 Proveniență

Apigenina este un flavonoid natural prezent în numeroase plante, inclusiv mușețel, pătrunjel și țelină, precum și în diverse fructe și legume [98].

2.2.2 Structura chimică

Apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavonă), cu formula $C_{15}H_{10}O_5$, este un flavonoid alcătuit din două inele benzenice unite printr-un inel heterociclic pironic [98].

2.2.3 Mecanisme de acțiune și efectele biologice ale apigeninei

Apigenina prezintă activitate antioxidantă, antiinflamatoare și antitumorală [23].

2.2.4 Biodisponibilitatea apigeninei

Utilizarea terapeutică a apigeninei este limitată de biodisponibilitatea scăzută, cauzată de solubilitatea redusă, absorbția intestinală limitată și metabolizarea rapidă [23].

2.3. Cordicepina

2.3.1 Proveniență

Cordicepina este un compus bioactiv principal din ciupercile *Cordyceps*, responsabil pentru efectele lor farmacologice și utilizat tradițional în medicina chineză [33].

2.3.2 Structura chimică

Cordicepina (3'-deoxiadenozină) este un analog al adenozei, caracterizat prin absența grupei hidroxil la poziția 3' a ribozei [33].

2.3.3 Mecanisme de acțiune și studii privind efectele cordicepinei

Mecanismele cordicepinei includ interferența cu sinteza ARN și proteinelor, modularea căilor AMPK și PI3K/AKT/mTOR implicate în proliferare și apoptoză, precum și efecte antioxidante și antiinflamatorii, contribuind la activitatea sa anticancerigenă [33–35,106,107].

2.3.4 Biodisponibilitatea cordicepinei

Cordicepina are biodisponibilitate redusă din cauza absorbției limitate și metabolizării rapide, însă formulările nano pot îmbunătăți stabilitatea și absorbția sa [33,107].

II. Contribuții personale

Capitolul 3: Ipoteza de lucru și obiectivele generale

3.1. Ipoteza de lucru

Curcumina, apigenina și cordicepina exercită efecte citotoxice selective asupra celulelor de cancer scuamos oral (OECM-1), comparativ cu celulele epiteliale gingivale normale (HGEpiC), prin modularea stresului oxidativ, autofagiei, apoptozei și expresiei proteinei KRAS.

Scopul principal al cercetării: Evaluarea comparativă a efectelor citotoxice ale curcuminei, apigeninei, cordicepinei asupra celulelor HGEpiC și OECM-1, precum și identificarea mecanismelor moleculare implicate, cu accent pe autofagie, apoptoză și proteina KRAS.

3.2. Obiectivele Cercetării

1. Investigarea efectelor citotoxice ale curcuminei, apigeninei și cordicepinei asupra liniilor celulare HGEpiC și OECM-1, în vederea evaluării selectivității lor antitumorale.
2. Analiza procesului de autofagie în OSCC sub influența apigeninei, pentru a evidenția implicarea acestuia în progresia cancerului oral.
3. Evaluarea stresului oxidativ indus de curcumină, apigenină și cordicepină în OSCC, în scopul identificării vulnerabilităților oxidative ale celulelor tumorale și al potențialului terapeutic asociat.
4. Evaluarea apoptozei induse de curcumină, apigenină și cordicepină în OSCC, pentru caracterizarea mecanismelor moleculare implicate în efectele lor antitumorale.
5. Investigarea rolului proteinei KRAS în progresia OSCC și a influenței acesteia asupra răspunsului celulelor tumorale la tratamentul cu cordicepină și curcumină.
6. Evaluarea efectelor combinației curcumină–cordicepină asupra OSCC, în vederea identificării unui posibil efect sinergic antitumoral.
7. Evaluarea comparativă a potențialului antitumoral al curcuminei, apigeninei și cordicepinei în OSCC, în vederea identificării compusului cu cea mai mare selectivitate citotoxică asupra celulelor tumorale și a efectului protector asupra celulelor epiteliale orale normale.

Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării

4.1. Biocompușii

Biocompușii curcumina ($\geq 90\%$, CAS: 458-37-7), apigenina ($\geq 98\%$, CAS: 520-36-5) și cordicepina ($\geq 98\%$, CAS: 73-03-0) au fost utilizați în studiu [Cayman Chemical]. Aceștia au fost dizolvați în DMSO, sterilizați UV (1 h) și diluați în mediu de cultură până la concentrații finale de 150 μM și 50 μM .

4.2. Cultivarea celulelor

Linia celulară HGEpiC (Innoprot, Bizkaia, Spania; P10864) a fost cultivată în Epithelial Cell Medium-Plus suplimentat, la 37 °C și 5% CO₂, și înșămânțată în plăci de 96 de godeuri pretratate cu poli-L-lizină, la 4×10^4 celule/godeu. Linia celulară OECM-1 (Sigma-Aldrich, SUA; SCC180) a fost cultivată în RPMI-1640 suplimentat cu 5% FBS și 1% antibiotice, la 37 °C și 5% CO₂, și înșămânțată la aceeași densitate (4×10^4 celule/godeu) în plăci de 96 de godeuri, fără pretratare.

4.3. Monitorizare în timp real a celulelor timp de 48 h – HoloMonitor® M4

Modificările morfologice, migrarea și proliferarea celulară au fost evaluate cu microscopul holografic digital HoloMonitor® M4 (PHI AB, Suedia). Celulele au fost tratate cu apigenină, curcumină, cordicepină și combinația curcumină–cordicepină, cu celule netratate ca martor. Imaginile time-lapse au fost achiziționate la fiecare 30 min timp de 48 h și analizate cu HoloMonitor® App Suite 4.0.1.546, fără marcaj fluorescent. Sistemul a fost menținut la 37 °C și 5% CO₂.

4.4. Activitatea metabolică mitocondrială (MTT)

Activitatea mitocondrială a fost evaluată prin testul MTT (Biotium, Cat. Nr. 30006) după 24 și 48 h de tratament cu apigenină, curcumină, cordicepină și combinația curcumină–cordicepină. Formazanul a fost solubilizat cu izopropanol, iar absorbanta a fost măsurată la 570/630 nm cu FLUOstar Omega (BMG Labtech).

4.5. Dozarea lactat dehidrogenazei (LDH)

Eliberarea LDH a fost utilizată ca marker al integrității membranei și al citotoxicității, folosind kitul LDH Cytotoxicity Assay Kit (Merck, Darmstadt, Germania; Cat. Nr. MAK529A). Celulele au fost tratate cu cordicepină, curcumină și combinația lor timp de 24 și 48 h. Activitatea LDH a fost măsurată la 500 nm cu FLUOstar Omega.

4.6. Testul Griess

Pentru evaluarea producției de oxid nitric (NO), s-a utilizat Nitric Oxide Assay Kit (Merck, Darmstadt, Germania; Cat. Nr. MAK454), bazat pe reacția Griess pentru detectarea nitriților (NO₂⁻). Celulele au fost tratate cu cordicepină, curcumină și combinația lor timp de 24 și 48 h, apoi mediul a fost incubat cu reactiv Griess (1:2) timp de 60 min la 37 °C, la întuneric. Absorbanta a fost măsurată la 540 nm cu FLUOstar Omega.

4.7. Specii reactive de oxigen (ROS)

Nivelul intracelular de H₂O₂ a fost determinat cu ROS-Glo™ H₂O₂ Assay (Promega, Madison, WI, SUA; Cat. Nr. G8820) după tratamentul cu apigenină, curcumină, cordicepină și combinația lor. După 24 și 48 h, reactivul a fost adăugat și incubat 6 h la 37 °C, iar luminescența a fost măsurată cu MyGlo® Reagent Reader (Promega), semnalul fiind proporțional cu H₂O₂.

4.8. Glutationul redus (GSH)

GSH a fost detectat fluorescent cu BioTracker™ 625 Red GSH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA; Cat. Nr. SCT036), conform protocolului producătorului. După 24 și 48 h de

tratament cu apigenină, celulele au fost incubate 30 min la 37 °C în întuneric. Fluorescența a fost capturată cu microscopul Optika IM-3LD4D și cuantificată cu FLUOstar Omega.

4.9. Dozarea ATP intracelular

Conținutul intracelular de ATP a fost determinat cu CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, Madison, WI, SUA; Cat. Nr. G9241), conform protocolului producătorului. După 24 și 48 h de tratament cu apigenină, s-a adăugat reactivul, urmat de incubare 10 min la temperatura camerei, la întuneric. Luminescența a fost măsurată cu MyGlo® Reagent Reader și exprimată în RLU, proporțional cu nivelul de ATP.

4.10. Determinarea activării autofagiei

Vacuolele autofagice au fost marcate cu Autophagy Assay Kit (Merck, Darmstadt, Germania; Cat. Nr. MAK138) după 24 h de tratament cu apigenină. Celulele au fost incubate 30 min cu Autophagosome Detection Reagent la 37 °C, în întuneric, apoi spălate cu PBS. Fluorescența (Ex/Em = 480/530 nm) a fost captată cu microscopul Optika și analizată cu ImageJ, intensitatea semnalului reflectând activitatea autofagică.

4.11. Activitatea caspazelor-3/7 (fluorescență)

Pentru detectarea apoptozei, s-a utilizat Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Merck, Darmstadt, Germania; Cat. Nr. SCT100), care evidențiază activitatea caspazelor 3/7 prin fluorescență verde (Ex/Em ~488/530 nm). Celulele au fost tratate cu apigenină, curcumină, cordicepină și combinația lor timp de 24 și 48 h, apoi incubate 30 min cu reactivul (5 μM) la temperatura camerei, în întuneric. Fluorescența a fost captată cu microscopul Optika și cuantificată cu FLUOstar Omega.

4.12. Test multiplex (markeri de apoptoză timpurie)

După 48 h de tratament, celulele au fost lizate cu Cell Signaling Lysis Buffer (Promega), suplimentat cu inhibitor de proteaze, iar lizatele au fost stocate la -80 °C pentru analiza Luminex. Proteinele implicate în apoptoză timpurie (p-AKT, p-BCL-2, p-p53, p-JNK și caspaze 8/9) au fost cuantificate cu kitul MILLIPLEX® MAP 7-Plex (Merck Millipore). Concentrația totală de proteine a fost determinată prin metoda Bradford (Sigma-Aldrich), iar probele au fost standardizate la 0,7 mg/mL. Analiza s-a realizat pe platforma Luminex® 200, pe baza intensității fluorescenței (MFI).

4.13. Determinarea izoformelor RAS (KRAS, HRAS, NRAS) – testare multiplex

După 48 h de tratament, celulele au fost lizate, iar supernatantul a fost colectat și stocat la -80 °C pentru analiza Luminex. Proteinele (Total Ras, RasG12D, RasG12V, pCRAF și pMEK1) au fost cuantificate cu Ras-Raf Oncoprotein Panel 6-Plex (Merck Millipore). Concentrația proteică a fost determinată prin metoda Bradford (Sigma-Aldrich), iar probele au fost standardizate la 0,7 mg/mL. Analiza s-a realizat pe platforma Luminex® 200, pe baza intensității fluorescenței (MFI).

4.14. Analiză statistică

Analizele statistice au fost realizate pe date brute. Normalitatea și omogenitatea varianțelor au fost evaluate prin testele Shapiro-Wilk și Levene. Pentru date normale s-au utilizat ANOVA (unidirecțională/bidirecțională sau Welch) cu teste post-hoc Tukey HSD sau Games-Howell, iar pentru date non-parametrice testele Kruskal-Wallis și Dunn. Corelațiile au fost evaluate prin testul Pearson ($p < 0,05$). Pentru comparațiile între două grupuri (HoloMonitor® M4) s-a folosit testul Mann-Whitney U. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SD ($n = 3$), ca procente față de control, și au fost reprezentate grafic în Microsoft Excel.

Capitolul 5. Evaluarea comparativă a efectelor citotoxice și a mecanismelor moleculare ale curcuminei în celulele scuamoase orale tumorale și în celulele epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, apoptozei și proteinei KRAS. – Studiul 1

5.1. Introducere

Ipoteza de lucru: curcumina exercită un efect diferențiat asupra celulelor OECM-1 față de celulele HGEpiC, prin modularea stresului oxidativ, inducerea apoptozei și implicarea căilor moleculare specifice.

5.2. Materiale și metode

Vezi Capitolul 4.

5.3. Rezultate

Rezultatele privind efectele curcuminei asupra celulelor epiteliale orale normale HGEpiC și tumorale OECM-1 au fost publicate anterior [108].

5.3.1. Citotoxicitatea diferențială a curcuminei asupra celulelor HGEpiC și OECM-1

Curcumina a redus activitatea metabolică în ambele linii celulare într-un mod dependent de doză și timp, cu efectul cel mai puternic la 150 μ M, mai ales după 48 h. Aceste modificări au fost însoțite de o creștere a eliberării LDH, indicând afectarea integrității membranei celulare și corelându-se cu scăderea viabilității. Nivelurile de oxid nitric au crescut ușor în celulele HGEpiC, fără semnificație statistică, și nu au fost modificate semnificativ în OECM-1. În schimb, nivelurile de ROS au crescut semnificativ în ambele linii celulare, fiind mult mai pronunțate în OECM-1, ceea ce indică un stres oxidativ accentuat indus de tratament.

5.3.2. Activitatea caspazelor-3/7 după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la curcumină

Curcumina a crescut activitatea caspazelor-3/7 în ambele linii celulare, indicând inducerea apoptozei. În HGEpiC efectul a fost mai evident la 150 μ M (24–48 h), iar în OECM-1 creșterea semnificativă a apărut mai devreme, la 24 h.

5.3.3. Microscopia holografică digitală arată efecte specifice ale curcuminei asupra volumului și morfologiei celulare

În OECM-1, curcumina a redus progresiv confluența și proliferarea la 50 și 150 μ M, cu scăderea suprafeței celulare și a viabilității. Confluența a scăzut semnificativ la 24 și 48 h, fără evidența diviziunii celulare în condițiile tratate.

5.3.4. Urmărirea celulelor individuale arată că biocompusul curcumină induce contracție progresivă (shrinkage celular) a celulelor OECM-1

Cu150 a determinat în OECM-1 contracție celulară progresivă și reducerea semnificativă a dimensiunii celulare, cu scăderi ale înălțimii, lungimii, volumului și suprafeței la 24 și 48 h, precum și deplasarea populației spre celule mai mici ($p < 0,001$).

5.3.5. Tratamentul cu biocompusul curcumină inhibă motilitatea și migrarea celulelor OECM-1

Tratamentul cu curcumină a avut efecte diferite asupra motilității celulelor OECM-1: cordicepina nu a influențat semnificativ deplasarea, în timp ce curcumina (Cu50, Cu150) și combinațiile au redus marcat motilitatea și migrarea celulară. Celulele tratate cu Cu150 au prezentat aproape absența deplasării, observată mai degrabă ca efect al contracției celulare decât al migrației reale, diferențele fiind semnificative față de control ($p < 0,001$).

5.3.6. Proteine corelate cu apoptoza timpurie după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la curcumină

În HGEpiC, curcumina a crescut caspaza-8 la 50 μ M, iar la 150 μ M a redus caspazele-8/9 și proteinele AKT și JNK fosforilate, corelat cu scăderea metabolismului. În OECM-1, markerii apoptozei nu au mai fost detectați la 150 μ M după 48 h, sugerând activare mai timpurie a apoptozei, iar la 50 μ M nu s-au observat diferențe semnificative față de control.

5.3.7. Panel de semnalizare Ras-Raf în HGEpiC și OECM-1 după expunerea la curcumină

Nivelurile bazale ale proteinelor Ras–Raf au fost similare între HGEpiC și OECM-1. Curcumina a redus activarea acestei căi într-un mod dependent de doză, mai ales la 150 μ M, cu scăderi ale Ras total și MEK1 în HGEpiC și ale RasG12D în OECM-1, precum și ale pBRAF/pCRAF în ambele linii. În ansamblu, a inhibat predominant semnalizarea downstream a căii Ras–Raf.

5.4. Discuții

Studiul arată că curcumina are efecte citotoxice dependente de doză și timp asupra celulelor HGEpiC și OECM-1, cu un impact mai puternic asupra celulelor tumorale. Aceasta reduce activitatea metabolică mitocondrială, crește eliberarea de LDH și induce stres oxidativ marcat prin acumularea de ROS, corelat cu activarea caspazelor-3/7 și inducerea apoptozei. În paralel, sunt afectate și procesele de migrare, proliferare și morfologie celulară, în special în OECM-1, unde se observă contracție celulară, inhibarea diviziunii și pierderea motilității.

La nivel molecular, curcumina inhibă semnalizarea RAS/RAF/MEK/ERK, reducând activarea Ras și fosforilarea proteinelor downstream (BRAF, CRAF, MEK1), ceea ce contribuie la suprimarea proliferării și supraviețuirii celulare. Deși nivelurile bazale ale proteinelor RAS nu diferă între liniile celulare, tratamentul determină o inhibare clară a cascadei MAPK.

Stresul oxidativ joacă un rol central în mecanismul de acțiune, ROS având un efect dual: la nivel moderat susțin adaptarea celulară, iar la nivel crescut induc moarte celulară. Celulele tumorale încearcă să contracareze acest stres prin mecanisme antioxidante și autofagie, însă curcumina perturbă aceste echilibre.

În ansamblu, efectele observate sunt rezultatul interacțiunii dintre creșterea ROS, inhibarea căilor de supraviețuire (RAS/RAF/MEK/ERK și PI3K/AKT/mTOR), activarea apoptozei și modificarea proceselor de autofagie, sugerând un potențial mecanism antitumoral al curcuminei în OSCC.

5.5. Concluzii

În celulele HGEpiC, nivelurile ROS au indicat un răspuns mai redus, sugerând o vulnerabilitate redox mai mică față de celulele OECM-1. În OECM-1, curcumina a determinat modificări morfologice, reducerea motilității și activarea apoptozei, asociate cu creșterea ROS și activarea caspazelor-3/7. Analiza Ras–Raf sugerează că efectele citotoxice ale curcuminei implică inhibarea căii RAS/RAF/MEK/ERK, susținând potențialul său de a modula semnalizarea proliferativă și de a induce moarte celulară în OSCC.

Capitolul 6. Analiza comparativă a efectelor apigeninei asupra celulelor scuamoase orale tumorale și a celulelor epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, autofagiei și apoptozei -Studiul 2

6.1. Introducere

Ipoteza de lucru: apigenina exercită un efect diferențiat asupra celulelor OECCM-1 față de celulele HGEpiC, prin modularea stresului oxidativ, inducerea apoptozei și autofagiei, implicând căi moleculare specifice.

6.2. Materiale și metode

Vezi Capitolul 4.

6.3. Rezultate

Rezultatele privind efectele apigeninei asupra celulelor epiteliale orale normale HGEpiC și tumorale OECCM-1 au fost publicate anterior [131].

6.3.1. Impactul asupra proliferării, activității metabolice și statusului energetic

Apigenina nu inhibă proliferarea celulelor HGEpiC, acestea menținându-și organizarea și prezentând chiar o ușoară creștere a activității metabolice, în timp ce celulele OECCM-1 rămân proliferative, dar prezintă o reducere dependentă de doză a confluentei și a activității metabolice. În mod specific, apigenina exercită efecte minime asupra celulelor normale, dar determină scăderi semnificative ale viabilității și metabolismului în celulele tumorale OECCM-1, mai ales la 48 h. Nivelurile de ATP scad inițial în ambele linii celulare la 24 h, însă cresc ulterior la 48 h, în special în OECCM-1, sugerând o adaptare metabolică și o posibilă reprogramare energetică spre glicoliză anaerobă. În ansamblu, apigenina prezintă un efect selectiv, cu impact limitat asupra celulelor normale și efect metabolic inhibitor asupra celulelor tumorale.

6.3.2. Stres oxidativ și apărare antioxidantă

Apigenina influențează diferit echilibrul redox în funcție de tipul celular. În HGEpiC, nivelurile de GSH cresc în timp, sugerând o capacitate antioxidantă menținută sau ușor îmbunătățită, în timp ce ROS cresc modest, mai ales la 48 h, fără efecte toxice majore. În OECCM-1, GSH scade inițial la 24 h, urmat de o recuperare parțială la 48 h, indicând activarea mecanismelor antioxidante de adaptare. În ceea ce privește stresul oxidativ, apigenina induce o creștere semnificativă a ROS în celulele tumorale OECCM-1, mult mai pronunțată decât în celulele normale, cu un vârf la 24 h și o reducere parțială la 48 h, sugerând răspuns adaptativ al celulelor supraviețuitoare. În ansamblu, apigenina determină un dezechilibru redox mai accentuat în celulele tumorale, asociat cu inducerea stresului oxidativ și activarea mecanismelor antioxidante compensatorii, în timp ce celulele normale sunt relativ protejate.

6.3.3. Modularea autofagiei

Apigenina determină răspunsuri opuse ale autofagiei în celulele normale și tumorale. În HGEpiC, tratamentul induce o creștere semnificativă a autofagiei, sugerând activarea unui mecanism protector celular corelat pozitiv cu concentrația. În OECCM-1, apigenina reduce autofagia într-un mod dependent de doză, indicând inhibarea acestui proces, cu corelație negativă între concentrație și activitate autofagică. În ansamblu, autofagia este stimulată în celulele normale și suprimată în celulele tumorale, sugerând o diferențiere importantă a răspunsului celular la apigenină.

6.3.4. Semnalizare pro-survival vs. pro-apoptotică

Analiza multiplex a evidențiat răspunsuri apoptotice distincte între cele două tipuri celulare după tratamentul cu apigenină. În celulele HGEpiC, apigenina a redus semnificativ

semnalele de supraviețuire (AKT, BCL-2) și a crescut markerii apoptozei (p53, caspaza-8 și caspaza-9), sugerând activarea controlată a căilor apoptotice. În schimb, celulele OECM-1 au prezentat un profil predominant anti-apoptotic, cu creșteri ale AKT și BCL-2, reducerea JNK și activare limitată sau absentă a caspazelor la concentrații mari, indicând un răspuns apoptotic compromis și posibilă rezistență la moarte celulară.

În ansamblu, rezultatele arată un efect diferențial clar al apigeninei: celulele HGEpiC își mențin viabilitatea prin răspunsuri adaptive (proliferare relativ stabilă, reglare redox prin GSH, activare moderată a apoptozei și autofagiei), în timp ce celulele OECM-1 sunt caracterizate de stres oxidativ accentuat, dereglarea homeostaziei redox, inhibarea autofagiei, perturbarea metabolismului energetic și răspuns apoptotic incomplet. Aceste diferențe sugerează o vulnerabilitate selectivă a celulelor tumorale OECM-1 la dezechilibrul redox indus de tratament și capacitatea celulelor normale de a activa mecanisme de protecție coordonate.

6.3.5. Apoptoza târzie

Apigenina induce activarea caspazelor-3/7, indicând instalarea apoptozei târzii în ambele tipuri celulare. În HGEpiC, activarea este moderată, dar semnificativă la 48 h, sugerând un răspuns apoptotic controlat dependent de doză și timp. În OECM-1, apoptoza este inițial mai evidentă la 24 h, dar scade ulterior la 48 h, indicând o execuție apoptotică incompletă sau supraviețuirea unei subpopulații celulare. În ansamblu, apigenina induce apoptoză mai stabilă în celulele normale și un răspuns apoptotic tranzitoriu sau limitat în celulele tumorale.

6.4. Discuții

Acest studiu evidențiază diferențe clare între celulele normale HGEpiC și celulele tumorale OECM-1 în răspunsul la apigenină, în special la nivel redox, autofagic și apoptotic. În HGEpiC, apigenina induce un răspuns adaptativ, cu creșteri moderate ale ROS, menținerea echilibrului redox prin GSH, activarea autofagiei ca mecanism protector și apoptoză limitată, fără afectarea semnificativă a viabilității.

În schimb, în OECM-1, tratamentul determină stres oxidativ accentuat, disfuncție mitocondrială și perturbări ale metabolismului energetic, cu scăderea inițială a ATP urmată de adaptare glicolică. Totodată, autofagia este inhibată, iar răspunsul apoptotic este incomplet, însoțit de semnalizare anti-apoptotică crescută și dereglarea axei AKT/BCL-2/JNK.

Per ansamblu, apigenina acționează ca un modulator dependent de tip celular, inducând homeostazie și mecanisme de protecție în celulele normale, dar dezechilibru redox și vulnerabilitate funcțională în celulele tumorale, susținând potențialul său ca agent adjuvant în OSCC.

6.5. Concluzii

Apigenina are efecte dependente de tipul celular: în HGEpiC menține homeostazia redox și viabilitatea, cu răspunsuri adaptive echilibrate între autofagie și apoptoză, în timp ce în OECM-1 induce stres oxidativ accentuat, reduce autofagia și evidențiază vulnerabilitate tumorală asociată cu modificarea semnalizării JNK. Rezultatele susțin potențialul axelor redox, autofagie și JNK ca ținte terapeutice în OSCC. Limitările studiului includ designul exclusiv in vitro și evaluarea incompletă a apoptozei tardive, bazată mai ales pe caspaza-3/7. Sunt necesare validări in vivo și studii suplimentare privind interacțiunea dintre autofagie și apoptoză (ex. AKT/mTOR).

Capitolul 7. Analiza comparativă a efectelor cordicepinei asupra celulelor scuamoase orale tumorale și a celulelor epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, apoptozei și KRAS – Studiul 3

7.1. Introducere

Ipoteza de lucru: cordicepina exercită un efect diferențiat asupra celulelor OECM-1 față de celulele HGEpiC, prin modularea stresului oxidativ, inducerea apoptozei și implicarea căilor moleculare specifice.

7.2. Materiale și metode

Vezi Capitolul 4.

7.3. Rezultate

Rezultatele privind efectele cordicepinei asupra celulelor epiteliale orale normale HGEpiC și tumorale OECM-1 au fost publicate anterior [108].

7.3.1. Citotoxicitatea diferențială a cordicepinei asupra celulelor HGEpiC și OECM-1

Cordicepina a redus activitatea metabolică în ambele linii celulare într-un mod dependent de doză și timp, fără modificări semnificative ale LDH și NO. În schimb, a indus o creștere a ROS în ambele tipuri celulare, mult mai accentuată în OECM-1, unde stresul oxidativ a fost foarte ridicat, sugerând o sensibilitate crescută a celulelor tumorale comparativ cu cele normale.

7.3.2. Activitatea caspazelor-3/7 după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la cordicepină

Imaginile de microscopie de fluorescență și cuantificarea intensității fluorescenței au arătat o creștere a intensității fluorescenței comparativ cu controlul, direct proporțională cu activitatea caspazelor-3/7, proteinele executante ale apoptozei, după tratamentul cu cordicepină, în celulele HGEpiC și OECM-1.

7.3.3. Microscopie holografică digitală arată că moartea celulară apoptotică indusă de cordicepină nu inhibă complet diviziunea celulară

Cordicepina nu a inhibat complet proliferarea celulelor OECM-1 la doze mici și medii, unde s-a observat o creștere progresivă a densității celulare similară controlului. În schimb, la concentrația mare (Co150), confluența a rămas stabilă și semnificativ redusă comparativ cu celelalte grupuri, deși au fost încă prezente semne de diviziune celulară. În același timp, au apărut modificări morfologice de tip apoptotic, sugerând un efect citostatic și parțial citotoxic la doză mare de cordicepină.

7.3.4. Proteine corelate cu apoptoza timpurie după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la cordicepină

Cordicepina a indus răspunsuri apoptotice diferențiale între cele două tipuri celulare: în HGEpiC a crescut activarea căii intrinseci a apoptozei prin creșterea semnificativă a caspazei-9, în timp ce în OECM-1 a fost observată o creștere accentuată a BCL-2, sugerând un răspuns anti-apoptotic și posibilă rezistență la moarte celulară.

7.3.5. Panel de semnalizare Ras-Raf în HGEpiC și OECM-1 după expunerea la cordicepină

Cordicepina a determinat o tendință de scădere a proteinelor din calea Ras-Raf, dar fără diferențe semnificative față de control în niciuna dintre liniile celulare.

7.4. Discuții

Cordicepina nu a indus un răspuns inflamator relevant, deoarece nivelurile de NO au rămas neschimbate, însă a crescut stresul oxidativ, mai accentuat în celulele tumorale OECM-1 decât în HGEpiC, sugerând o vulnerabilitate redox mai mare a acestora. Din punct de vedere biologic, efectul principal a fost citostatic, cu menținerea sau reducerea limitată a proliferării și doar modificări morfologice/apoptotice discrete, fără activare semnificativă a caspazelor-3/7, ceea ce indică absența unei apoptoze terminale clare.

La nivel molecular, s-a observat activarea parțială a căii apoptotice intrinseci (creștere caspaza-9 în HGEpiC), concomitent cu creșterea BCL-2 în OECM-1, sugerând un profil anti-apoptotic în celulele tumorale care limitează execuția apoptozei. În plus, calea RAS/RAF/MEK a rămas în mare parte stabilă, cu variații minore și fără modificări semnificative consistente.

Per ansamblu, cordicepina acționează predominant ca agent citostatic, inducând stres oxidativ și semnale apoptotice timpurii, dar fără activarea completă a morții celulare programate, efectul fiind mai degrabă de limitare a proliferării decât de citotoxicitate puternică.

7.5. Concluzii

În celulele HGEpiC, răspunsul la cordicepină a fost mai redus, caracterizat prin creșteri minime ale ROS comparativ cu OECM-1. În celulele OECM-1, cordicepina a exercitat în principal efecte citostatice, densitatea celulară menținându-se relativ constantă, în absența unor creșteri semnificative ale activității caspazelor-3/7.

Capitolul 8. Analiza comparativă a efectelor combinațiilor dintre curcumină și cordicepină asupra celulelor scuamoase orale tumorale și a celulelor epiteliale gingivale normale: implicațiile ROS, apoptoza și KRAS – Studiul 4

8.1. Introducere

Ipoteza de lucru: combinația dintre curcumina și cordicepina exercită un efect diferențiat asupra celulelor OECM-1 față de celulele HGEpiC, prin modularea stresului oxidativ, inducerea apoptozei și implicarea căilor moleculare specifice.

8.2. Materiale și metode

Vezi Capitolul 4.

8.3. Rezultate

Rezultatele privind efectele combinației curcumină-cordicepină asupra celulelor epiteliale orale normale HGEpiC și tumorale OECM-1 au fost publicate anterior [108].

8.3.1. Citotoxicitatea diferențială a combinației curcumină-cordicepină asupra celulelor HGEpiC și OECM-1

Combinația curcumină-cordicepină a indus un efect citotoxic dependent de doză și timp în ambele linii celulare, cu o scădere marcată a activității metabolice MTT, mult mai pronunțată în OECM-1, în special la CC150, unde viabilitatea a fost aproape complet suprimată. Aceste modificări au fost susținute de creșteri ale LDH, indicând deteriorarea membranei celulare, mai evidentă la dozele mari și în celulele tumorale. Nivelurile de NO au rămas practic neschimbate, sugerând lipsa unui răspuns inflamator major. În schimb, ROS au crescut semnificativ în ambele linii, dar extrem de accentuat în OECM-1, unde s-au înregistrat valori de ordinul miilor până la peste zece mii la CC150, indicând un stres oxidativ sever ca mecanism principal al citotoxicității selective asupra celulelor tumorale.

8.3.2. Activitatea caspazelor-3/7 după expunerea celulelor HGEpiC și OECM-1 la combinația curcumină-cordicepină

Tratamentul combinat curcumină-cordicepină a indus activarea caspazelor-3/7 în ambele linii celulare, efect mai evident la concentrația CC150 și la 48 h, indicând declanșarea apoptozei ca răspuns la stresul indus de tratament. În celulele HGEpiC, activarea caspazelor a fost dependentă de doză și timp, cu creșteri semnificative atât la 24 h (CC50 și CC150), cât și la 48 h (CC150), sugerând un răspuns apoptotic progresiv. În celulele OECM-1, activarea a fost mai limitată, observându-se creșteri semnificative doar la CC150, fără o amplificare marcată în timp, ceea ce indică un răspuns apoptotic mai restrâns în celulele tumorale.

8.3.3. Microscopie holografică digitală arată că tratamentul cu combinația curcumină-cordicepină amplifică efectele antitumorale și inhibă proliferarea și motilitatea

Tratamentul combinat CC50 și CC150 a determinat modificări morfologice și funcționale semnificative în celulele OECM-1, în special la CC150, unde s-au observat reducerea dimensiunii celulare, inhibarea completă a diviziunii și pierderea motilității. Aceste efecte au

fost susținute de imagini 2D și de scăderea progresivă a confluenței celulare în timp, indicând o inhibare puternică a proliferării. Reducerea suprafeței ocupate de celule a fost semnificativă la 24 h și 48 h comparativ cu momentul inițial, confirmând efectul antiproliferativ pronunțat al combinației, mai ales la concentrația mare.

8.3.4. Proteine corelate cu apoptoza timpurie după expunerea celulelor HGEpiC și OEMC-1 la combinația curcumină-cordicepină

În HGEpiC, combinația curcumină-cordicepină reduce în general proteinele de supraviețuire și induce o activare modestă a apoptozei extrinseci, fără modificări importante ale BCL-2. În OEMC-1, efectele sunt mai complexe și dependente de doză: la CC50 apar semnale mixte pro-supraviețuire și pro-apoptotice, iar la CC150 se observă o creștere a caspazei-8, BCL-2 și $\uparrow$ JNK, concomitent cu scăderea p53.

8.3.5. Panel de semnalizare Ras-Raf în HGEpiC și OEMC-1 după expunerea la combinația curcumină-cordicepină

Analiza Ras-Raf indică faptul că acest tratament combinat reduce activitatea acestei căi de semnalizare. În celulele HGEpiC, scăderi apar la Ras total, RasG12D și MEK1 la CC150, în timp ce în celulele OEMC-1 efectul este mai limitat, fiind semnificativ doar pentru MEK1 la aceeași concentrație. Per ansamblu, rezultatele sugerează o inhibare mai pronunțată a căii Ras-Raf în celulele normale comparativ cu cele tumorale.

8.4. Discuții

Combinația curcumină-cordicepină a exercitat efecte citotoxice puternice, dependente de doză, în special la CC150, unde a redus drastic activitatea metabolică mitocondrială în ambele linii celulare, cu efecte mai accentuate în OEMC-1. Aceste modificări au fost însoțite de creșterea LDH, indicând deteriorarea membranei, precum și de alterări morfologice, inhibarea migrației și blocarea proliferării, sugerând un efect antitumoral pronunțat dominat de curcumină.

La nivel molecular, combinația a activat apoptoza prin căile extrinsecă și intrinsecă, cu răspunsuri diferite între celulele normale și cele tumorale: HGEpiC au prezentat predominant mecanisme protective, în timp ce OEMC-1 au arătat activare mixtă a semnalizării pro- și anti-apoptotice (AKT, BCL-2, JNK), indicând adaptare la stres și rezistență parțială la moarte celulară. Totuși, creșterea caspazelor-3/7 în ambele linii confirmă instalarea apoptozei terminale.

Analiza Ras-Raf a evidențiat inhibarea generală a semnalizării proliferative (Ras total și MEK1), fără afectarea formelor mutante RasG12D și RasG12V, sugerând o acțiune asupra căii de semnalizare downstream, nu asupra mutațiilor oncogenice. În ansamblu, combinația curcumină-cordicepină induce stres oxidativ, inhibă proliferarea și activează apoptoza, cu efecte mai pronunțate asupra celulelor tumorale OEMC-1, susținând potențialul său terapeutic în OSCC.

8.5. Concluzii

Tratamentul combinat curcumină-cordicepină a reflectat modificările morfologice și funcționale determinate de curcumină, cordicepina coexistând fără a-i contracara efectele. În celulele OEMC-1, tratamentul a dus la pierderea motilității, reducerea dimensiunilor celulare și activarea apoptozei, cel mai probabil determinate de acumularea ROS. În ansamblu, aceste rezultate sugerează că ambii compuși, curcumina și cordicepina, contribuie la creșterea ROS și determină modificări ale nivelului proteinelor din calea Ras-Raf, ceea ce susține explorarea lor ulterioară și pe modele *in vivo* ca terapie în contextul OSCC.

Capitol 9. Concluzii și contribuții personale

9.1 Concluzii

Teza a investigat efectele curcuminei, apigeninei, cordicepinei și ale combinației curcumină–cordicepină asupra celulelor normale HGEpiC și ale celor tumorale OECM-1, urmărind rolul stresului oxidativ, autofagiei, apoptozei și căii Ras–Raf–MEK în OSCC. Curcumina a indus cel mai puternic efect citotoxic în celulele tumorale, prin creșterea ROS, activarea apoptozei și inhibarea semnalizării proliferative. Apigenina a avut efecte dependente de context, activând autofagia și menținând homeostazia în celulele normale, dar inducând stres oxidativ și inhibarea autofagiei în celulele tumorale. Cordicepina a acționat predominant citostatic, limitând proliferarea fără apoptoză marcată. Combinația curcumină–cordicepină a amplificat stresul oxidativ și efectele apoptotice, mai ales în OECM-1, prin inhibarea căilor Ras–Raf–MEK. În ansamblu, rezultatele evidențiază vulnerabilitatea redox și de semnalizare a celulelor OSCC și potențialul compușilor naturali ca terapii adjuvante selective.

9.2 Contributii proprii

Teza aduce o contribuție integrată în oncologia orală, evaluând comparativ efectele curcuminei, apigeninei și cordicepinei pe celule tumorale (OECM-1) și normale (HGEpiC). Noutatea principală constă în analiza simultană a stresului oxidativ, autofagiei, apoptozei și căilor de semnalizare oncogenice (inclusiv KRAS), într-un model comparativ relevant biologic.

Metodologic, studiul combină teste de viabilitate (MTT, LDH), markeri ai stresului redox (ROS, NO, GSH, ATP), analize multiplex ale apoptozei, evaluarea autofagiei și imagistică în timp real (HoloMonitor M4), oferind o caracterizare dinamică și multiparametrică a răspunsului celular.

Rezultatele evidențiază efecte diferențiale ale compușilor: curcumina are cel mai puternic efect citotoxic prin stres oxidativ și inhibarea Ras–Raf; apigenina modulează, dependent de tipul celular, echilibrul redox și autofagia; cordicepina este predominant citostatică; iar combinația curcumină–cordicepină amplifică stresul oxidativ și efectele antiproliferative în celulele tumorale.

În ansamblu, teza arată că acești compuși naturali pot exploata vulnerabilitățile redox și de semnalizare ale OSCC, sugerând potențial terapeutic adjuvant și bază pentru strategii combinate în tratamentul cancerului oral, cu necesitatea validării în modele mai complexe.

Bibliografia selectată

[40] Voicu Balasea B, Popa A, Rus F, Radulescu R, Izet M, Ripszky A. Implications of KRAS in molecular signaling pathways in oral squamous cell carcinoma: interplay with autophagy, apoptosis, and oxidative stress. *BIOCELL*. doi:10.32604/biocell.2026.000000

[2] Dong L, Xue L, Cheng W, Tang J, Ran J, Li Y. Comprehensive survival analysis of oral squamous cell carcinoma patients undergoing initial radical surgery. *BMC Oral Health*. 2024;24:919. <https://doi.org/10.1186/s12903-024-04690-z>

[3] Tan Y, Wang Z, Xu M, et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *Int J Oral Sci*. 2023;15:44. <https://doi.org/10.1038/s41368-023-00249-w>

[5] George GS, Patil A, Moirangthem R, Doibale PN, Manjrekar A, Golapkar SV, et al. Association of alcohol and different types of alcoholic beverages with the risk of buccal mucosa cancer in Indian men: a multicentre case-control study. *BMJ Glob Health*. 2025;10:e017392. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2024-017392>

[40] Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:269–282.

[4] Sun R, Dou W, Liu W, et al. Global, regional, and national burden of oral cancer and its attributable risk factors from 1990 to 2019. *Cancer Med*. 2023;12:13811–13820. <https://doi.org/10.1002/cam4.6025>

[14] El Hanbuli HM, Abou Sarie MA. KRAS protein expression in oral squamous cell carcinoma: a potential marker for progression and prognosis. *Iran J Pathol*. 2022;17(4):469–479. <https://doi.org/10.30699/IJP.2022.550727>

[41] Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009.

[51] Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The frequency of Ras mutations in cancer at a glance. *Cancer Res*. 2020;80:2969–2974.

[18] Marconi GD, Della Rocca Y, Fonticoli L, Melfi F, Rajan TS, Carradori S, Pizzicannella J, Trubiani O, Diomede F. C-Myc expression in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms in cell survival and cancer progression. *Pharmaceuticals*. 2022;15:890.

[60] Wang S, Wang W, Zhang S, Yang F, Qiu J, Guo Q, Zheng J, Chen Z. Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase promotes the progression of tongue squamous cell carcinoma via the K-Ras and RhoA signaling pathways. *Arch Oral Biol*. 2022;134:105320. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105320.

[61] Shin KH, Bae SD, Hong HS, Kim RH, Kang MK, Park NH. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(4):896–902. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.055.

[62] Shi Y, Li Y, Wu W, Xu B, Ju J. miR-181d functions as a potential tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by targeting K-ras. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(7):7847–7855.

[63] Tashiro K, Oikawa M, Miki Y, Takahashi T, Kumamoto H. Immunohistochemical assessment of growth factor signaling molecules: MAPK, Akt, and STAT3 pathways in oral epithelial precursor lesions and squamous cell carcinoma. *Odontology*. 2020;108(1):91–101. doi:10.1007/s10266-019-00428-4.

[64] Al-Rawi NH, Merza MS, Ghazi AM. PIK3CB and K-ras in oral squamous cell carcinoma. A possible cross-talk! *J Orolfac Sci*. 2014;6(2):99–103. doi:10.4103/0975-8844.143049.

- [46] Tímár J. The clinical relevance of KRAS gene mutation in non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2014;26:138–144.
- [79] He S, Chakraborty R, Ranganathan S. Proliferation and apoptosis pathways and factors in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1562. doi:10.3390/ijms23031562.
- [80] Kashyap T, Pramanik KK, Nath N, Mishra P, Singh AK, Nagini S, Rana A, Mishra R. Crosstalk between Raf-MEK-ERK and PI3K-Akt-GSK3 β signaling networks promotes chemoresistance, invasion/migration and stemness via expression of CD44 variants (v4 and v6) in oral cancer. *Oral Oncol*. 2018;86:234–243. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.09.028.
- [20] Wang Y, Liu H, et al. Mechanism of apoptosis in oral squamous cell carcinoma promoted by cardamonin through PI3K/AKT signaling pathway. *Sci Rep*. 2024;14:20802. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-71817-1>
- [87] Qiu B, Sun Y, Nie W, Yang Q, Guo X. FBXW7 promotes autophagy and inhibits proliferation of oral squamous cell carcinoma. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11(5):e845. doi:10.1002/iid3.845.
- [88] Vo TT, Wee Y, Cheng HC, Wu CZ, Chen YL, Tuan VP, Liu JF, Lin WN, Lee IT. Surfactin induces autophagy, apoptosis, and cell cycle arrest in human oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2023;29(2):528–541. doi:10.1111/odi.13950.
- [89] Borges AA, de Souza MP, da Fonseca AC, et al. Chemoselective synthesis of Mannich adducts from 1,4-naphthoquinones and profile as autophagic inducers in oral squamous cell carcinoma. *Molecules*. 2023;28(1):309. doi:10.3390/molecules28010309.
- [91] Kim MJ, Woo SJ, Yoon CH, et al. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J Biol Chem*. 2011;286:12924–12932. doi:10.1074/jbc.M110.138958.
- [92] Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell*. 2011;42:23–35. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.009.
- [93] Swiderek E, Kalas W, Wysokinska E, Pawlak A, Rak J, Strzadala L. The interplay between epigenetic silencing, oncogenic KRas and HIF-1 regulatory pathways in control of BNIP3 expression in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441:707–712. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.098.
- [28] Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*. 2017;6:92. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>
- [95] Zhen L, Fan D, Yi X, Cao X, Chen D, Wang L. Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion via EGFR signaling pathways. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:6438–6446.
- [96] Rahman MA, Yadab MK, Ali MM. Therapeutic advances of curcumin and nanocurcumin in glioblastoma: molecular targets, bioavailability, and drug delivery. *Nutrients*. 2026;18:194. doi:10.3390/nu18020194.
- [98] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci World J*. 2013;2013:162750.
- [23] Rahmani AH, Alsahli MA, Almatroudi A, et al. The Potential Role of Apigenin in Cancer Prevention and Treatment. *Molecules*. 2022;27:6051. <https://doi.org/10.3390/molecules27186051>
- [33] Ashraf SA, Elkhailifa AEO, Siddiqui AJ, et al. Co for health and wellbeing. *Molecules*. 2020;25:2735. <https://doi.org/10.3390/molecules25122735>

- [34] Binlath T, Uppatcha N, Thepchai J, et al. Cordycepin attenuates migration and invasion of HSC-4 oral squamous carcinoma cells. *J Dent Sci.* 2022;17:1677–1688. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2022.03.002>
- [35] Ho SY, Wu WS, Lin LC, et al. Cordycepin enhances radiosensitivity in oral squamous carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20:5366. <https://doi.org/10.3390/ijms20215366>
- [106] Liu X, et al. Cordycepin exerts anti-inflammatory and anticancer effects via NF- κ B and MAPK pathways. *Phytomedicine.* 2025;114:154546. doi:10.1016/j.phymed.2025.154546.
- [107] Zhang Y, et al. Recent advances in cordycepin pharmacokinetics and therapeutic potential. *J Ethnopharmacol.* 2025;304:115884. doi:10.1016/j.jep.2024.115884.
- [108] **Voicu Bălașea B**, Stan MS, Radulescu R, et al. Differential effects of curcumin and cordycepin on oral squamous cell carcinoma cells. *Molecules.* 2026;31:1221. <https://doi.org/10.3390/molecules31071221>
- [131] **Voicu Bălașea B**, Stan MS, Dinescu M, et al. Differential effects of apigenin on normal and squamous oral epithelial cells reveal redox–autophagy signaling vulnerabilities in OSCC. *Int J Mol Sci.* 2026;27:2091. <https://doi.org/10.3390/ijms27052091>

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate in extenso ca rezultat al cercetării doctorale

1. **Voicu Bălașea B**, Stan MS, Dinescu M, Imre M, Rădulescu R, Cernega A, Musteanu M, Ripszky A, Pituru SM. Differential effects of apigenin on normal and squamous oral epithelial cells reveal redox–autophagy signaling vulnerabilities in OSCC. *Int J Mol Sci.* 2026;27:2091, FI -4,9/2026, Q1, capitolul VI, pag. 63-88

<https://doi.org/10.3390/ijms27052091>

<https://www.mdpi.com/1422-0067/27/5/2091>

2. **Voicu Bălașea B**, Stan MS, Radulescu R, Cernega A, Alm K, Musteanu M, Rus F, Ripszky A, Pituru SM. Differential effects of curcumin and cordycepin on oral squamous cell carcinoma cells: ROS-mediated cytotoxicity and real-time morphological analysis. *Molecules.* 2026;31:1221, FI -4,6/2026, Q2, capitole: V, pag. 38-50; VII, pag. 89-95; VIII, pag. 103-109

<https://doi.org/10.3390/molecules31071221>

<https://www.mdpi.com/1420-3049/31/7/1221>

3. **Voicu Balasea B**, Popa A, Rus F, Radulescu R, Izet M, Ripszky A. Implications of KRAS in molecular signaling pathways in oral squamous cell carcinoma: interplay with autophagy, apoptosis, and oxidative stress. *BIOCELL*, FI -1/2026, Q4, capitole: I, pag. 17-26; V, pag. 59-62

doi:10.32604/biocell.2026.000000

Acceptat pentru publicare la 15.05.2026

Lista cu lucrările științifice publicate

1. Mizrahi, I.K., Neculau, C., **Balasea, B.V. et al.** Cellular bioenergetic and migratory responses of human gingival fibroblasts to 940 nm diode laser photobiomodulation. *Sci Rep* **16**, 5972 (2026). <https://doi.org/10.1038/s41598-026-35824-8>

2. Popa, A.; Imre, M.; Pițuru, S.M.; **Voicu-Bălașea, B.**; Cernega, A.; Rădulescu, R.-V.; Rus, F.; Trușcă, R.; Musteanu, M.; Andronescu, E.; et al. Physicochemical Characterization and In Vitro Biocompatibility of Epoxy- and Silicone-Based Endodontic Materials. *Materials* **2026**, *19*, 1388. <https://doi.org/10.3390/ma19071388>

3. Mihai Butucescu, **Bianca Voicu Balasea**, Marina Imre, Iulian Pana, Radu Radulescu, Florentina Duica, Mihaela Dinu, Florentina Rus, Anca C. Parau, Adrian E. Kiss, Corina Muscurel, Alexandra Popa, Catalin Vitelaru, Ana Cernega, Alexandra Ripszky, Alina Vladescu (Dragomir), Silviu Pituru. Biological response of human osteoblasts cultured on magnesium-doped hydroxyapatite coatings on Ti6Al7Nb alloy substrates, *Ceramics International*, Volume 52, Issue 4, **2026**, Pages 4234-4249, ISSN 0272-8842, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2025.12.161>.
4. Dumitru, C.D.; Ilie, C.-I.; Neacsu, I.A.; Motelica, L.; Oprea, O.C.; Ripszky, A.; Pițuru, S.M.; **Voicu Bălașea, B.**; Marinescu, F.; Andronescu, E. Antimicrobial Composite Films Based on Alginate–Chitosan with Honey, Propolis, Royal Jelly and Green-Synthesized Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 6809. <https://doi.org/10.3390/ijms26146809>
5. Dinescu, M.; Ciocan, L.T.; Țâncu, A.M.C.; Vasilescu, V.G.; **Voicu-Balasea, B.**; Rus, F.; Ripszky, A.; Pițuru, S.-M.; Imre, M. In Vitro Study Regarding Cytotoxic and Inflammatory Response of Gingival Fibroblasts to a 3D-Printed Resin for Denture Bases. *J. Funct. Biomater.* **2025**, *16*, 442. <https://doi.org/10.3390/jfb16120442>
6. Mihai Moisa, **Bianca Voicu Balasea**, Marina Imre, Catalin Vitelaru, Radu Radulescu, Florentina Duica, Florentina Rus, Iulian Pana, Corina Muscurel, Alexandra Popa, Alexandra Ripszky, Ana Cernega, Alina Vladescu (Dragomir), Silviu Pituru. Insights into the biocompatibility of human gingival fibroblasts cultured on a hydroxyapatite-coated new Ti-Nb Alloy. New perspectives for dentistry?, *Ceramics International*, Volume 51, Issue 22, Part A, **2025**, Pages 36525-36536, ISSN 0272-8842, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2025.05.367>.
7. Dumitru, C.D.; Neacșu, I.A.; Oprea, O.C.; Motelica, L.; **Voicu Balasea, B.**; Ilie, C.-I.; Marinescu, F.; Ripszky, A.; Pituru, S.-M.; Andronescu, E. Biomaterials Based on Bee Products and Their Effectiveness in Soft Tissue Regeneration. *Materials* **2025**, *18*, 2689. <https://doi.org/10.3390/ma18122689>.
8. Saramet V, Stan MS, Ripszky Totan A, Țâncu AMC, **Voicu-Balasea B**, Enasescu DS, Rus-Hrincu F, Imre M. Analysis of Gingival Fibroblasts Behaviour in the Presence of 3D-Printed versus Milled Methacrylate-Based Dental Resins—Do We Have a Winner? *Journal of Functional Biomaterials*. **2024**; 15(6):147. <https://doi.org/10.3390/jfb15060147>
9. Nițu CD, Mernea M, Vlasceanu RI, **Voicu-Balasea B**, Badea MA, Raduly FM, Rădițoiu V, Rădițoiu A, Avram S, Mihailescu DF, et al. Biomedical Promise of Sustainable Microwave-Engineered Symmetric Curcumin Derivatives. *Pharmaceutics*. **2024**; 16(2):205. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020205>
10. Lupuliasa AI, Prisada RM, Matei RI, Avramescu SM, Vasile BȘ, Fierascu RC, Fierascu I, **Voicu-Bălașea B**, Meleşcanu Imre M, Pițuru S-M, et al. Development of Biologically Active Phytosynthesized Silver Nanoparticles Using *Marrubium vulgare* L. Extracts: Applications and Cytotoxicity Studies. *Nanomaterials*. **2024**; 14(10):895. <https://doi.org/10.3390/nano14100895>
11. Lupuliasa AI, Baroi A-M, Avramescu SM, Vasile BS, Prisada RM, Fierascu RC, Fierascu I, Sărdărescu DI, Ripszky Totan A, **Voicu-Bălașea B**, et al. Application of Common Culinary Herbs for the Development of Bioactive Materials. *Plants*. **2024**; 13(7):997. <https://doi.org/10.3390/plants13070997>
12. Rus, F.; Neculau, C.; Imre, M.; Duica, F.; Popa, A.; Moisa, R.M.; **Voicu-Balasea, B.**; Radulescu, R.; Ripszky, A.; Ene, R.; et al. Polymeric Materials Used in 3DP in Dentistry—Biocompatibility Testing Challenges. *Polymers* **2024**, *16*, 3550.

<https://doi.org/10.3390/polym16243550>.

13. Butucescu, M.; Imre, M.; Rus-Hrincu, F.; **Voicu-Balasea, B.**; Popa, A.; Moisa, M.; Ripszky, A.; Neculau, C.; Pituru, S.M.; Pârvu, S. Cell-Type-Specific ROS–AKT/mTOR–Autophagy Interplay—Should It Be Addressed in Periimplantitis? *Diagnostics* **2024**, *14*, 2784. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14242784>

14. Enasescu DS, **Voicu-Balasea B**, Rus-Hrincu F, Radulescu R, Popa A, Moisa MR, Coculescu BI, Melescanu Imre M, Pituru SM, Ripszky A. Exploring comparatively the cytotoxicity of milled and 3D-printed PMMA-based resins to oral squamous cancer cells – What signals could the Akt/mTOR pathway send us through its downstream effector GSK-3? *RJOR*. **2024**. 16. DOI 10.6261/RJOR.2024.2.16.37

15. Ionescu RN, Bodnar DC, **Voicu Balasea B**, Gherghiceanu F, Ripszky Totan A, Pituru SM, Funieru C, Melescanu-Imre M. In vitro exploration of biocompatibility and surface properties of two different materials: hybrid ceramic and hybrid resin. *Romanian Journal of Oral Rehabilitation*. **2024**;16(4):40. doi:10.62610/RJOR.2024.4.16.40