

Bruna de Araujo Miranda

AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA PELA COMBINAÇÃO DE OXALIPLATINA COM
INIBIDORES DE CDK4/6 EM CÉLULAS HCT116 DE CÂNCER COLORRETAL *IN*
VITRO



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO RIO DE JANEIRO

JULHO / 2025

**Trabalho a ser realizado no Laboratório
de Biologia Tumoral, do Instituto de
Ciências Biomédicas/UFRJ, sob a
orientação da Professora Helena Lobo
Borges**

CIP - Catalogação na Publicação

d672a de Araujo Miranda, Bruna
AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA PELA COMBINAÇÃO DE
OXALIPLATINA COM INIBIDORES DE CDK4/6 EM CÉLULAS
HCT116 DE CÂNCER COLORRETAL IN VITRO / Bruna de
Araujo Miranda. -- Rio de Janeiro, 2025.
73 f.

Orientadora: Helena Lobo Borges.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2025.

1. Câncer colorretal. 2. Autofagia. 3. iCDK. 4.
Resistência tumoral. I. Lobo Borges, Helena,
orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): Bruna de Araujo Miranda

DRE:121080862

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Alessandra D'Almeida Filardy (Presidente)

Prof. Renata de Meirelles Santos Pereira

Prof. João Marcos Delou

Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa (Suplente)

Título da Monografia: "Avaliação da Autofagia pela combinação de Oxaliplatina com Inibidores de CDK4/6 em Células HCT116 de Câncer Colorretal *in vitro*"

Local: sala 03 da PG (sala vermelha), IMPG, CCS/UFRJ

Data e hora de início: 08 de julho de 2025 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 8. de Julho..... de 2025.

NOTA:

Banca Examinadora:

10

Alessandra D'Almeida Filardy
 Prof. Alessandra D'Almeida Filardy (Presidente)

10

Prof. Renata de Meirelles Santos Pereira

João Marcos de A. Delou
 Prof. João Marcos Delou

10

Anderson Guimarães
 Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa (Suplente)

Aluno(a):

Bruna de Araujo Miranda
 Bruna de Araujo Miranda

Orientador(a)

(e coorientador):

Helena Lobo Borges
 Prof. Helena Lobo Borges

Coordenadora de

TCC:

Marinella Silva Laport
 Profa. Marinella Silva Laport

RESUMO

BRUNA DE ARAUJO MIRANDA

AValiação da Autofagia pela Combinação de Oxaliplatina com Inibidores de CDK4/6 em Células HCT116 de Câncer Colorretal In Vitro

Orientador: Helena Lobo Borges

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O câncer colorretal (CCR) está entre os tumores mais incidentes e letais no mundo, com elevada mortalidade em estágios avançados. A resistência terapêutica representa um dos principais obstáculos ao tratamento, frequentemente associada à ativação de mecanismos adaptativos, tal como a autofagia. Estudos indicam que a proteína pRB participa da indução da autofagia em resposta à quimioterapia e que seu silenciamento interrompe esse processo (Biasoli et al., 2013), sugerindo um papel funcional na resistência tumoral. Dados do nosso grupo demonstraram que a combinação dos inibidores de CDK4/6, palbociclibe e abemaciclibe, com quimioterápicos de primeira linha — especialmente a oxaliplatina — promoveu efeito sinérgico e aumento significativo da citotoxicidade em células de CCR (Souza, 2023). Com base nesses achados, este trabalho teve como objetivo investigar se a modulação da autofagia estaria envolvida nos efeitos sinérgicos observados com essas combinações terapêuticas. Para isso, foram aplicadas abordagens complementares para avaliar a autofagia em células de CCR tratadas com combinações de oxaliplatina e inibidores de CDK4/6. O acúmulo de vesículas autofágicas foi analisado por coloração com CYTO-ID em plataforma multiparamétrica, e alterações nos marcadores Beclina 1, LC3-I/II e p62 foram investigadas por Western Blot. De forma exploratória, avaliou-se a morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão e a dinâmica lisossomal por marcação com LysoTracker Red. Os dados obtidos até o momento não evidenciam uma associação direta entre a citotoxicidade induzida pela combinação de oxaliplatina com inibidores de CDK4/6 e a inibição do fluxo autofágico, dado que não foram observados acúmulo de vacúolos

autofágicos nem alterações marcantes nos níveis de LC3-II e p62. No entanto, considerando as limitações técnicas e a necessidade de replicações adicionais, não se pode excluir completamente a participação de mecanismos autofágicos. Entretanto, esses achados reforçam a importância de estudos complementares para investigar vias celulares alternativas envolvidas na resposta observada, bem como para aprofundar o entendimento sobre os múltiplos efeitos biológicos desencadeados pelos inibidores de CDK4/6 no contexto do câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer colorretal; autofagia; iCDK; resistência tumoral

ABSTRACT

Bruna de Araujo Miranda

AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA PELA COMBINAÇÃO DE OXALIPLATINA COM INIBIDORES DE CDK4/6 EM CÉLULAS HCT116 DE CÂNCER COLORRETAL IN VITRO

Orientador: Helena Lobo Borges

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Colorectal cancer (CRC) is among the most common and lethal tumors worldwide, with high mortality rates in advanced stages. Therapeutic resistance remains one of the major challenges in treatment and is frequently associated with the activation of adaptive mechanisms, such as autophagy. Previous studies have shown that the pRB protein is involved in autophagy induction in response to chemotherapy, and that its silencing disrupts this process (Biasoli et al., 2013), suggesting a functional role in tumor resistance. Data from our group demonstrated that combining CDK4/6 inhibitors, palbociclib and abemaciclib, with first-line chemotherapeutics—particularly oxaliplatin—resulted in a synergistic effect and significantly increased cytotoxicity in CRC cells (Souza, 2023). Based on these findings, this study aimed to investigate whether autophagy modulation is involved in the synergistic effects observed with these therapeutic combinations. To this end, complementary approaches were used to assess autophagy in CRC cells treated with oxaliplatin and CDK4/6 inhibitor combinations. The accumulation of autophagic vesicles was analyzed using CYTO-ID staining in a multiparametric platform, and alterations in Beclin 1, LC3-I/II, and p62 markers were evaluated by Western Blot. Exploratory analyses included ultrastructural assessment by transmission electron microscopy and investigation of lysosomal dynamics through LysoTracker Red staining. The data obtained so far do not provide evidence of a direct association between the cytotoxicity induced by the combination of oxaliplatin and CDK4/6 inhibitors and the inhibition of autophagic flux, since no accumulation of autophagic vacuoles

or significant changes in LC3-II and p62 levels were observed. However, considering technical limitations and the need for additional replicates, the involvement of autophagic mechanisms cannot be completely ruled out. These findings nonetheless highlight the importance of complementary studies to investigate alternative cellular pathways involved in the observed response, as well as to further explore the multiple biological effects triggered by CDK4/6 inhibitors in the context of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal cancer; Autophagy; CDK4/6 inhibitors; Therapeutic resistance

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

Título: Investigando se novas combinações de medicamentos no câncer colorretal conseguem parar a reciclagem que protege as células tumorais

Palavras-Chave: Câncer colorretal, Tratamento do câncer, Quimioterapia, Resistência ao tratamento, Morte de células tumorais

O câncer colorretal é um dos tipos de câncer mais comuns e que mais causam mortes no mundo, especialmente quando diagnosticado em estágios avançados. Um dos principais desafios do tratamento é que as células tumorais podem se tornar resistentes às terapias, dificultando sua eliminação. Um dos processos que contribuem para essa resistência é a autofagia, um mecanismo natural em que a célula “recicla” partes internas para sobreviver a situações de estresse, como a exposição à quimioterapia. Pesquisas anteriores mostraram que uma proteína chamada pRB participa da ativação da autofagia após o tratamento com quimioterapia, ajudando as células tumorais a resistirem. Já estudos do nosso grupo indicaram que a combinação da oxaliplatina (um quimioterápico comum no tratamento do câncer colorretal) com medicamentos conhecidos como inibidores de CDK4/6 (iCDKs) aumentou significativamente a morte dessas células. Esses medicamentos agem bloqueando proteínas que controlam a multiplicação celular e atuam justamente na via da proteína pRB, podendo interferir também no processo de autofagia. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar se o efeito mais potente dessas combinações estaria ligado à interferência no processo de autofagia. Para isso, realizamos experimentos com células de câncer colorretal em laboratório, usando diferentes técnicas para verificar se a autofagia estava sendo afetada (ativada ou bloqueada) após os tratamentos. Os resultados mostraram que, embora a combinação dos tratamentos tenha aumentado a morte das células tumorais, esse efeito não parece estar diretamente ligado ao bloqueio da autofagia — um processo natural de reciclagem das células. Ainda assim, não é possível descartar totalmente essa relação. Isso indica que outros mecanismos, ainda pouco compreendidos, podem estar contribuindo para esse resultado. Por isso, são necessárias mais

pesquisas para entender melhor como essas terapias agem e, assim, ajudar no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para o câncer colorretal.

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Pelo presente instrumento, Bruna de Araujo Miranda (nome do aluno), portador(a) da Cédula de Identidade nº 29.272.281-6, CPF nº 186.578.207-65, e seu orientador, Helena Lobo Borges (nome do orientador), na condição legal de autores/detentores dos direitos autorais sobre o resumo de divulgação científica (**Resumo para pessoas leigas**) contido na monografia (Trabalho de Conclusão do Curso) de graduação em Ciências Biológicas; Microbiologia e Imunologia da UFRJ, intitulada “AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA PELA COMBINAÇÃO DE OXALIPLATINA COM INIBIDORES DE CDK4/6 EM CÉLULAS HCT116 DE CÂNCER COLORRETAL *in vitro*” (título da monografia), decidem pelo presente Termo de Cessão de Direitos Autorais, autorizar a divulgação e ceder total e gratuitamente ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sediado na Av. Carlos Chagas Filho 373, CCS – bloco I, CEP 21941-902, CNPJ nº 33.663.683/0001-16, os direitos patrimoniais e de autor referentes à criação supramencionada, em caráter permanente, irrevogável e NÃO EXCLUSIVO, todos os direitos patrimoniais NÃO COMERCIAIS de utilização do **Resumo para Pessoas Leigas**, em qualquer idioma e em todos os países, restando claro que serão devidos os respectivos créditos autorais em todas as utilizações da obra e que esta terá sua integridade original mantida. A divulgação poderá ser realizada em diferentes plataformas (website, Facebook, Instagram, Youtube) associadas ao IMPG e à Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia da UFRJ.

Rio de Janeiro, 9 de Julho de 2025

Documento assinado digitalmente
 BRUNA DE ARAUJO MIRANDA
Data: 10/07/2025 10:21:18-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

(Nome do aluno)

Documento assinado digitalmente
 HELENA LOBO BORGES
Data: 09/07/2025 18:52:01-6309
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

(Nome do orientador)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Câncer Colorretal (CCR).....	2
1.3. Tratamento do CCR.....	3
1.5. Via de Retinoblastoma (RB) e Ciclo Celular.....	6
1.6. Funções não-canônicas da proteína RB.....	9
1.7 Autofagia.....	10
1.8 Autofagia e RB.....	13
1.9. Inibidores seletivos de CDK4/6 (iCDK4/6).....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVO.....	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.1. Objetivo específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Cultivo das Linhagens Celulares.....	18
4.2. Tratamento.....	18
4.3. Análise em plataforma multiparamétrica Cytation-5: CYTO-ID Autophagy....	19
4.5. Caracterização Morfológica em Microscopia eletrônica de transmissão.....	22
4.6. Análise em plataforma multiparamétrica Cytation-5: LysoTracker.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Combinações de quimioterápicos com inibidores de CDK4/6 não resultaram em acúmulo significativo de vacúolos autofágicos.....	24
5.2. As combinações terapêuticas não modularam de forma significativa a expressão de marcadores relacionados à autofagia.....	27
5.3. Não foi identificado acúmulo de vacúolos com conteúdo em células HCT116 tratadas com as combinações terapêuticas.....	29
5.4. Dados exploratórios sugerem aumento de lisossomos nas combinações terapêuticas.....	30
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer é um dos maiores desafios de saúde pública global (INCA, 2022), com um impacto crescente em termos de morbidade e mortalidade, sendo estimado que um em cada cinco indivíduos desenvolverá algum tipo de câncer ao longo da vida (SUNG et al., 2021). No Brasil, a previsão é de que ocorram aproximadamente 704 mil novos casos da doença no triênio 2023-2025 (INCA, 2022).

O câncer pode ser definido, de maneira geral, como um conjunto de mais de 100 doenças em que há crescimento desordenado de células com capacidade de invadir tecidos, formar metástases e comprometer as funções dos órgãos afetados, propagando-se de maneira agressiva (INCA, 2022). A base patológica da doença se baseia na acumulação progressiva de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplas etapas, que atuam de forma cooperativa, conferindo uma vantagem seletiva em relação ao restante da população celular, resultando em uma expansão descontrolada (BISHOP, 1987; VOLGENSTEIN; KINZLER, 1993).

A compreensão dos mecanismos que impulsionam o desenvolvimento do câncer foi ampliada com a proposição dos marcos do câncer (*Hallmarks of Cancer*) por Hanahan e Weinberg. Esses princípios fundamentais descrevem as características biológicas essenciais que permitem às células tumorais uma vantagem seletiva (HANAHAAN; WEINBERG, 2000) **(Figura 1).**



Figura 1. Hallmarks do Câncer (Marcos do Câncer): Nova Dimensão. Inicialmente descritos em seis capacidades adquiridas pelas células malignas, os 'Hallmarks' foram posteriormente atualizados, incluindo novas propriedades que refletem a complexidade da progressão tumoral. Imagem adaptada de HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31-46, jan. 2022. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Entre os marcos do câncer, uma das características mais fundamentais é a capacidade das células cancerosas de evadir de supressores de crescimento e manter a proliferação celular. Essas células conseguem desregular a liberação de sinais promotores de crescimento, que se ligam a receptores na superfície celular, desencadeando vias de sinalização intracelular que regulam a progressão pelo ciclo celular e influenciam outras propriedades biológicas, como a sobrevivência celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.2. Câncer Colorretal (CCR)

O CCR refere-se a tumores que se originam no cólon, no reto — a parte final do intestino antes do ânus — ou no ânus, tratando-se de uma doença heterogênea, desenvolvida principalmente a partir de mutações genéticas em lesões benignas, como pólipos adenomatosos e serrilhados. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2021b; SULLIVAN; NOUJAIM; ROPER, 2022).

Em 2020, o câncer colorretal foi responsável por cerca de 930 mil mortes no mundo, sendo a segunda principal causa de morte por câncer, atrás apenas do câncer de pulmão (WHO, 2023). Excluindo os tumores de pele não melanoma, o CCR ocupa a segunda posição

entre os tipos mais frequentes de câncer no Brasil (INCA, 2023). Estima-se que, no Brasil, o número de novos casos de câncer intestinal para cada ano do triênio de 2023 a 2025 seja de 45.630 casos, o que corresponde a um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes (INCA, 2022).

Os principais fatores de risco para o câncer colorretal (CCR) estão relacionados tanto ao estilo de vida quanto a condições genéticas e hereditárias. Entre os aspectos comportamentais, destacam-se o sedentarismo, a obesidade, o consumo regular de álcool e tabaco, além de uma dieta pobre em fibras, frutas, vegetais e carnes magras. Já entre os fatores biológicos e genéticos, incluem-se doenças inflamatórias intestinais crônicas, como a doença de Crohn, e alterações hereditárias, como a síndrome de Lynch e a polipose adenomatosa familiar (FAP), bem como o histórico pessoal ou familiar de adenomas ou câncer colorretal. Além disso, fatores ocupacionais, como a exposição a radiações, também estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento da doença (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2021a; WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

1.3. Tratamento do CCR

O tratamento do CCR depende do estágio em que se encontra o câncer, porém, a colectomia total ou parcial é o principal tratamento para casos não-metastáticos, geralmente seguida de quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante (T, ANDRE, 2024). Entre os quimioterápicos de primeira linha mais comumente aplicados na prática clínica, destacam-se a oxaliplatina (OXA), o irinotecano e o 5-fluorouracil (5-FU), geralmente administrados em esquemas combinados (LOTFOLLAHZADEH *et al.*, 2022; SOCIEDADE AMERICANA DE CÂNCER, 2020).

A oxaliplatina é um dos quimioterápicos mais utilizados no tratamento do CCR. Trata-se de um agente alquilante à base de platina, cuja ação citotóxica ocorre por meio da formação de ligações cruzadas com o DNA, resultando em lesões que inibem a síntese de DNA e de RNA mensageiro, além de promoverem o arresto do ciclo celular e, conseqüentemente, a morte das células tumorais (Devanabanda & Kasi, 2022). Sua eficácia é maior em tumores com alta taxa de proliferação celular (DEVANABANDA *et al.*, 2023), sendo indicada como tratamento adjuvante no câncer colorretal em estágio III, bem como em casos de doença metastática. Embora apresente eficácia moderada como monoterapia, sua atividade é significativamente potencializada em combinação com outros fármacos. Dessa forma, é geralmente administrada por via intravenosa em esquemas combinatórios, como

FOLFOX (com leucovorina e 5-FU), CAPEOX (com capecitabina) e FOLFOXIRI (com leucovorina, 5-FU e irinotecano), podendo ainda ser associada a terapias-alvo (Sociedade Americana do Câncer, 2024). Entre os principais efeitos adversos da oxaliplatina destacam-se febre, fadiga, náuseas, vômitos, fraqueza, neuropatia sensorial periférica, dor, insônia e toxicidade hematopoiética dependente da dose, a qual pode resultar em mielossupressão, anemia e trombocitopenia (Devanabanda et al., 2023).

O irinotecano, um análogo da camptotecina -derivado da árvore *Camptotheca*-, é amplamente utilizado no tratamento do câncer colorretal metastático (CCRm). Após a administração, é convertido no fígado em seu metabólito ativo, o SN-38, que inibe a enzima DNA topoisomerase I — responsável por aliviar o superenrolamento do DNA por meio de quebras transitórias em uma das fitas durante os processos de replicação e transcrição. Ao estabilizar o complexo formado entre a topoisomerase I e o DNA, o irinotecano impede a religação da fita clivada. Como consequência, durante a replicação, a colisão com a forquilha replicativa pode gerar quebras de fita dupla, resultando em bloqueio da replicação, parada do ciclo celular em G2 ou morte celular (XU & VILLALONA-CALERO, 2002). O irinotecano é comumente administrado em regimes combinados, como o protocolo FOLFIRI, que inclui 5-FU e leucovorina.

O 5-FU é um quimioterápico de primeira linha no tratamento do CCR, classificado como um análogo da uracila com flúor na posição C-5. Atua como antimetabólito, inibindo a replicação do DNA e a síntese de RNA (VODENKOVA et al., 2020). Tanto as formulações intravenosas quanto as orais, assim como outras fluoropirimidinas (FPs), são amplamente utilizadas em terapias sistêmicas. Após administração intravenosa, o 5-FU é absorvido pelas células por meio dos mesmos transportadores da uracila e convertido em metabólitos ativos que bloqueiam a síntese de RNA e os processos de replicação e reparo do DNA (GHAFOURI-FARD et al., 2021). Regimes combinados, como FOLFOX e FOLFIRI, são eficazes no tratamento do CCR metastático (CCRm), aumentando a sobrevida média para cerca de dois anos (VODENKOVA et al., 2020) e melhorando a resposta terapêutica em 40 a 50% em relação à monoterapia (CHO et al., 2020). Os efeitos colaterais mais comuns incluem diarreia, náuseas, vômitos, desidratação e toxicidades hematológicas, como neutropenia, leucopenia e trombocitopenia (CASALE & PATEL, 2022).

Como mencionado, os quimioterápicos utilizados no tratamento do CCR podem causar graves efeitos adversos, especialmente quando administrados em combinação, o que aumenta sua eficácia, mas também o potencial de toxicidade. Para contornar esses efeitos, drogas

citotóxicas vêm sendo associadas a terapias alvo, que atuam especificamente em células tumorais com alterações moleculares definidas, como mutações ou superexpressão em genes como VEGF, BRAF, EGFR e HER2 (SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER, 2024). Essas terapias são desenvolvidas para interagir com biomarcadores específicos, permitindo reduzir as doses dos quimioterápicos convencionais e, assim, minimizar sua toxicidade. No entanto, o sucesso dos quimioterápicos é frequentemente comprometido pela recorrência da doença e pelo surgimento de metástases, muitas vezes associadas ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos (GUAN, 2015).

Uma vez que a sobrevida de 5 anos em estágios avançados é de apenas 11 a 14% em CCR (SIEGEL et al., 2023), ainda mostra-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento a esse tipo tumoral.

1.4. Subtipos moleculares do CCR

O CCR apresenta uma heterogeneidade molecular significativa, podendo ser estratificado com base em diferentes mecanismos genéticos e epigenéticos. Entre os principais padrões moleculares descritos estão a instabilidade microsatélite (MSI), a instabilidade cromossômica (CIN) e o fenótipo de metilação em ilhas CpG (CIMP). A MSI decorre de falhas no sistema de reparo de DNA por incompatibilidade de pares (MMR), o que leva ao acúmulo de mutações em regiões repetitivas do genoma. Já a CIN refere-se a alterações numéricas e estruturais nos cromossomos, incluindo aneuploidias, perdas, ganhos e rearranjos cromossômicos, o que gera ampla variabilidade genética nas células tumorais. Por sua vez, o CIMP está relacionado à hipermetilação de regiões promotoras ricas em dinucleotídeos CpG, resultando no silenciamento de genes, frequentemente incluindo genes supressores tumorais. A integração desses perfis com dados genômicos, transcriptômicos e epigenéticos levou à definição dos *Consensus Molecular Subtypes* (CMS), que estratificam o CCR em quatro subtipos com diferenças marcantes em prognóstico, inflamação, metabolismo e sensibilidade a terapias (Guinney et al., 2015). Dentre os mecanismos moleculares com relevância nos diferentes subtipos do CCR, destaca-se a desregulação da via do retinoblastoma (RB), um eixo central no controle da progressão do ciclo celular.

A inativação funcional do RB pode ocorrer por hiperfosforilação — frequentemente associada à perda de expressão de inibidores como p16 INK4a — ou por deleções e mutações do gene *RB1*. Essa perda de função leva à ativação sustentada de fatores E2F, promovendo entrada descontrolada na fase S, replicação aberrante e acúmulo de danos ao DNA. Além

disso, a ausência de RB prejudica a estabilidade genômica por afetar a segregação cromossômica, a resposta a quebras de DNA e o controle epigenético da cromatina. Importante destacar que a desregulação da via do RB apresenta impacto transversal nos subtipos moleculares do CCR — ou seja, ocorre em diferentes contextos genéticos e epigenéticos, como em tumores com instabilidade cromossômica (CIN), hipermetilação (CIMP) ou deficiência de reparo (MSI), por mecanismos distintos. Dessa forma, a via do RB contribui de maneira ampla para a progressão tumoral, independentemente da classificação molecular principal (DUNNE et al., 2024; MULLER et al., 2016).

1.5. Via de Retinoblastoma (RB) e Ciclo Celular

A via de RB desempenha um papel crucial no controle da proliferação celular no organismo ao inibir a progressão do ciclo celular (CHAU; WANG, 2003). A proteína RB é codificada pelo gene *RB1*, um gene supressor tumoral (MORRIS; CHAN, 2015) ao qual, quando apresenta perda de ambos os alelos, leva ao desenvolvimento de um tipo de tumor ocular infantil conhecido como retinoblastoma, onde foi inicialmente identificado esse gene (FRIEND et al., 1986).

A proteína RB atua na transição da fase G₁ para a fase S do ciclo celular (MORRIS; CHAN, 2015). O ciclo celular é o processo complexo que envolve diversas proteínas reguladoras que conduzem a célula por uma sequência específica de eventos, culminando na mitose e na produção de duas células-filhas (SCHAFFER, 1998). Em organismos eucarióticos, esse processo envolve quatro etapas finamente reguladas por diversas vias de sinalização: G₀/G₁ (gap 1), S (síntese de DNA), G₂ (gap 2) e M (mitose). As fases G₁ e G₂ do ciclo celular correspondem a intervalos entre os dois eventos principais: a replicação do DNA e a mitose. Durante a fase G₁, a célula realiza processos preparatórios para a síntese de DNA, como o aumento da atividade metabólica e a verificação de integridade genômica. Na fase S, ocorre a duplicação do material genético, e as células apresentam conteúdo de DNA intermediário, variando entre 2N e 4N. A fase G₂ representa o segundo intervalo, em que a célula se prepara para a entrada na mitose, promovendo o reparo de danos no DNA e a síntese de proteínas necessárias para a divisão celular. Já as células em G₀ encontram-se em um estado quiescente, sem atividade proliferativa (SCHAFFER, 1998). Cada uma dessas etapas é controlada por diferentes complexos de ciclina-CDK (Cinase Dependente de Ciclina), os quais garantem a progressão do ciclo celular (MATTHEWS et al., 2022) (**Figura 2**).

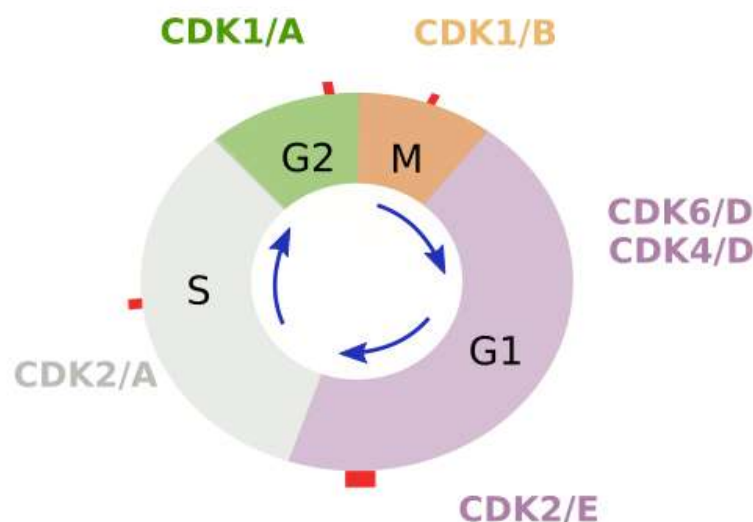


Figura 2. Principais pontos de controle no ciclo celular por diferentes complexos de ciclina-CDK. Imagem de MEGÍAS, M. Regulação do ciclo celular. Disponível em: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/ampliaciones/8-regulacion.php>. Acesso em: 15 de outubro de 2024.

Ciclins específicas regulam as distintas fases do ciclo celular por meio da ativação das quinases dependentes de ciclins (CDKs). Nas células humanas, existem 20 CDKs e 29 ciclins (Cao et al., 2014). CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 e CDK7 regulam diretamente as transições do ciclo celular e a divisão celular, enquanto CDK7-11 mediam a transcrição gênica. A expressão de CDKs flutua de forma cíclica ao longo do ciclo celular (Cicenas; Valius, 2011). A ciclina A ativa os CDKs 2 e 1, desempenhando papéis nas fases S e M. A ciclina B, principal reguladora da mitose em eucariotos, forma um complexo com a CDK1, que fosforila proteínas essenciais para a progressão mitótica. A ciclina D facilita a transição da fase G1 ao ativar as CDKs 4 e 6, sendo frequentemente super expressa em vários tipos de câncer humano. Por sua vez, a ciclina E se associa à CDK2 e facilita a transição da fase G1 para a fase S (ZOU; LIN, 2021).

Durante a fase G1, a célula passa por uma etapa crítica de pontos de verificação regulatória, na qual pode iniciar a entrada no ciclo celular ou permanecer em G1. Essa regulação é controlada pelas cinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6, que são serina/treonina cinases cuja atividade catalítica é modulada por ciclins do tipo D (MATTHEWS et al., 2022). Caso a célula entre em ciclo celular, em resposta a estímulos mitogênicos, as ciclins D1, D2 e D3 se ligam e ativam CDK4 e CDK6. O complexo ciclina D-CDK4/6, então, fosforila seletivamente e inativa proteínas associadas à proteína RB (pRB). (CARDOSO et al., 2018;; MATIKAS e BERGH, 2017; ZARDAVAS e PICCART, 2013;

MASSAGUÉ, 2004; MALUMBRAS e BARBACID, 2009). A pRB normalmente permanece em estado hipofosforilado, ligada aos fatores de transcrição da família E2F. Quando fosforilada pelo complexo ciclina D-CDK4/6, resulta na liberação de E2F. Isso permite a entrada na fase S do ciclo celular - fase onde ocorre a replicação do DNA -, uma vez que os fatores de transcrição E2F ativam a expressão de genes alvo que estão envolvidos na progressão do ciclo celular, replicação do DNA e progressão mitótica (REN et al., 2002; BURKHART; SAGE, 2008; OTTO; SICINSKI, 2017). Ademais, a liberação de E2F também permite a transcrição de CDK2, ciclinas do tipo E e outras proteínas que, por sua vez, constituem um complexo capaz de fosforilar ainda mais a pRB (REN et al., 2002; BURKHART; SAGE, 2008; SHERR, 1996; SHERR; MCCORMICK, 2002; WEINBERG, 1995). Assim, a progressão do ciclo celular depende do estado fosforilado da pRB, que é rigidamente controlado por CDKs (PARAMIO et al., 1999) (**Figura 3**).

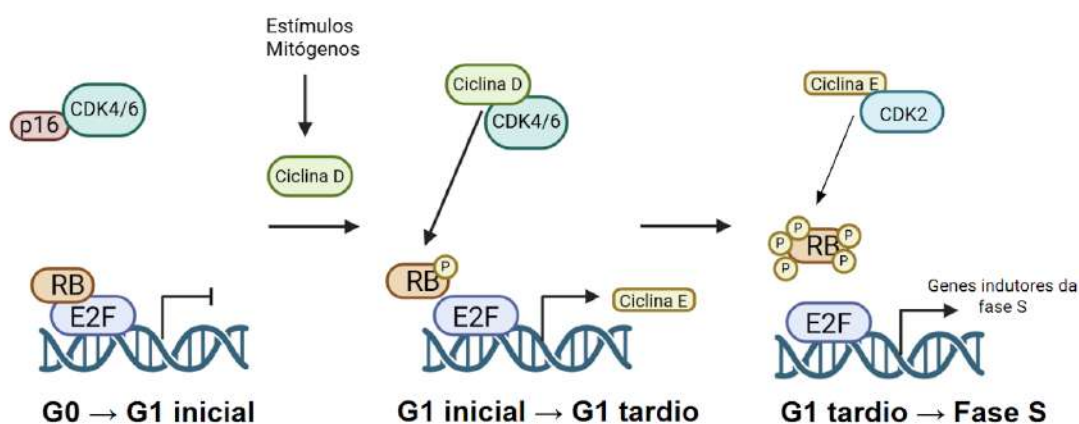


Figura 3. Modelo Clássico da regulação da transição G1/S por Rb e CDKs. O principal papel de RB é no controle da passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular, processo ao qual depende da fosforilação da pRB pelas CDK4 e CDK6 e é antagonizado por p16^{ink4a}. Imagem adaptada de GOEL, S.; DECRISTO, M.J.; MCALLISTER, S.S.; ZHAO, J.J. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 11, p. 911–925, nov. 2018.

A regulação da atividade de CDK4/6 é parcialmente mediada pela família de proteínas inibidoras endógenas INK4, incluindo a p16^{INK4A}. Como demonstrado na **Figura 3**, essas proteínas se ligam aos CDKs 4 e 6, formando complexos binários que não apresentam atividade quinase (SHERR; ROBERTS, 1999; HARPER et al., 1993). Assim, em resposta a estímulos estressantes, como a deficiência de nutrientes, a pRB pode ser desfosforilada pela ação de inibidores de CDK, como a p16, bloqueando a transição do ciclo celular

(KOLUPAEVA; JANSSENS, 2013). Entretanto, muitos tumores apresentam mutações no gene *CDKN2A* (SHERR; MCCORMICK, 2002), responsável por codificar a proteína p16^{INK4A}, resultando na disrupção dessa via, uma vez que a p16^{INK4A} é essencial para inibir a atividade das CDKs 4 e 6.

A desregulação desta função canônica de RB é central no câncer, com componentes da via CDK4/6-RB frequentemente exibindo mutações que resultarão em proliferação celular sustentada (OTTO; SICINSKI, 2017). Dessa forma, alterações na expressão ou função de RB é comum em vários tipos tumorais, onde disfunções na sua via são encontradas em cerca de 70% dos tipos tumorais (KNUDSEN & KNUDSEN, 2008; JANOSTIACK et al., 2022), incluindo CCR.

1.6. Funções não-canônicas da proteína RB

Embora a proteína pRB seja mais amplamente reconhecida por sua função clássica de inibir a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, evidências recentes também a associam a diversos outros *Hallmarks of Cancer* (Marcos do câncer) (BORGES et al., 2005; CHAU et al., 2002; COLLARD et al., 2012). Além do controle do ciclo celular, pRB desempenha papéis relevantes em processos como diferenciação celular, senescência, autofagia e apoptose.

A desregulação da via de RB em tumores está associada à aquisição de diversas características malignas, incluindo angiogênese, metástase, inflamação, evasão da resposta imune, sobrevivência celular, reprogramação metabólica e instabilidade genômica (THANGAVELU et al., 2025). Além disso, a via não canônica de RB tem sido implicada na modulação de histonas e na organização da estrutura cromossômica, de forma independente de sua atuação na progressão do ciclo celular (DICK et al., 2018). Notavelmente, mesmo sob hiperfosforilação — condição classicamente relacionada à sua inativação no controle do ciclo —, a pRB pode manter funções epigenéticas específicas, contribuindo para a regulação de diversos processos celulares ao longo do ciclo (THANGAVELU et al., 2025).

Em relação à apoptose, diversos estudos, incluindo trabalhos conduzidos por nosso grupo, sugerem que a pRB pode atuar como um fator antiapoptótico em determinados contextos, como na presença de estímulos quimioterápicos ou inflamatórios (CHAU et al., 2002; BORGES et al., 2005, 2007; HAN et al., 2013; BIASOLI et al., 2013; INDOVINA et al., 2015; LIU et al., 2016; SOLETTI et al., 2017). Tal atividade contribui para a resistência de

células tumorais ao estresse induzido por tratamentos e pode representar um entrave à eficácia terapêutica.

Por fim, estudos indicam que a via de RB regula diferentes etapas do processo autofágico, bem como a interação molecular entre autofagia e apoptose (BIASOLI et al., 2013; POLAGER et al., 2008; YANG et al., 2010), aspecto que será aprofundado nas seções seguintes.

1.7 Autofagia

A autofagia é um mecanismo homeostático conservado ao longo da evolução, responsável pela degradação e reciclagem de componentes celulares descartáveis ou tóxicos. Esse processo ocorre quando essas estruturas são englobadas em vesículas membranosas chamadas "autofagossomos", que, em seguida, se fundem com lisossomos ácidos, permitindo a degradação de seu conteúdo. Esse mecanismo fisiológico é crucial para a manutenção das condições celulares adequadas em situações de estresse, como a falta de nutrientes e oxigênio, além de promover a degradação de proteínas malformadas e organelas defeituosas (HE; KLIONSKY, 2009; PERERA; ZONCU, 2016; KOUSTAS et al., 2019; GALLUZZI et al., 2017).

Os principais mecanismos de autofagia compreendem a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (KLIONSKY; EMR, 2000). Dentre esses, a macroautofagia — frequentemente referida apenas como autofagia — é o processo mais estudado e caracterizado (HOU et al., 2013).

O processo autofágico, como observado na **Figura 4**, envolve diversas etapas: iniciação e alongamento do fagóforo, formação do autofagossomo, fusão com o lisossomo e, por fim, a degradação do material intracelular pelas enzimas hidrolíticas no autolisossomo (KLIONSKY et al., 2005).

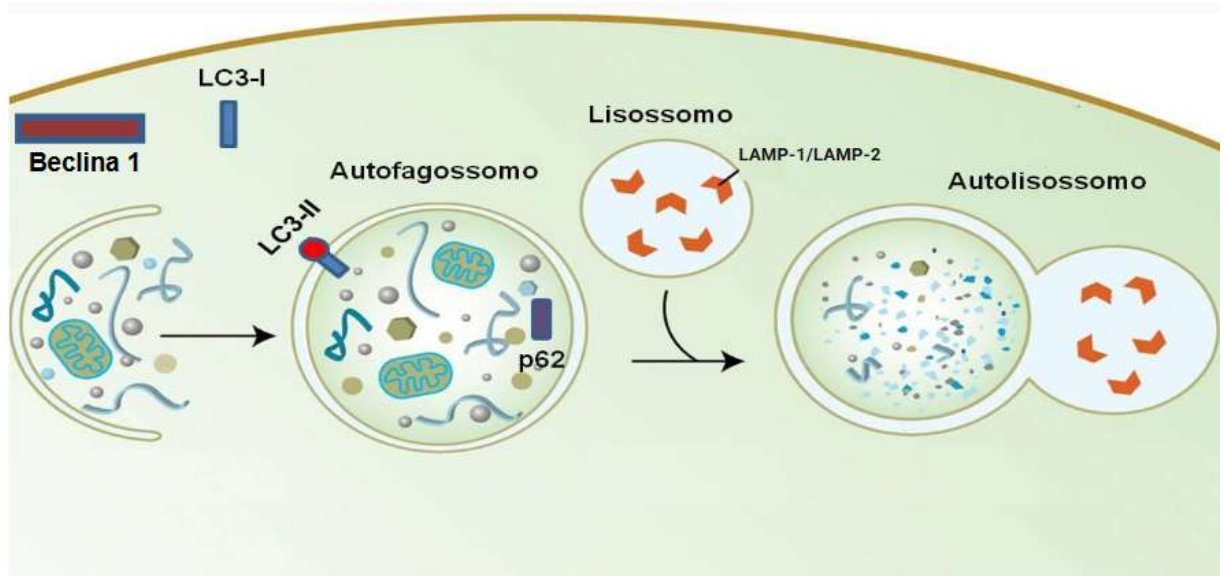


Figura 4. Fluxograma das etapas da autofagia. (Modificada a partir de: UNIVERSITY, 2013).

O alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma quinase central na regulação da proliferação celular, sobrevivência e metabolismo, além de desempenhar papel fundamental no controle da autofagia. Essa proteína forma dois complexos funcionais distintos: mTORC1 e mTORC2, sendo o mTORC1 o principal envolvido na regulação negativa da autofagia (NDOYE & WEERARATNA, 2016; YUN & LEE, 2018). A ativação do mTORC1 por vias de sinalização intracelulares, como Akt e MAPK, suprime a autofagia, enquanto sua inibição por sensores moleculares como AMPK e p53 favorece a ativação do processo autofágico. Diversas formas de estresse celular, incluindo privação de nutrientes, estresse oxidativo e exposição a agentes quimioterápicos, podem desencadear essa inibição e, consequentemente, induzir autofagia (HOU et al., 2013).

Durante a inanição, por exemplo, a inibição do mTORC1 permite a ativação da quinase ULK1 (unc-51-like kinase 1), que inicia a formação do autofagossomo por meio da ativação do complexo PI3K de classe III (HOU et al., 2013). Este complexo, essencial para a nucleação do fagóforo, é recrutado para a membrana em formação e é composto por hVps34, Beclin 1, p150 e Atg14L (também conhecida como Barkor) ou UVRAG (SIMONSEN & TOOZE, 2009). Sua atividade é fundamental para o recrutamento de proteínas da família ATG, como ATG5, ATG12 e ATG16L, necessárias para a expansão do fagóforo (ZHOU et al., 2016; WARD et al., 2016). Dentre esses componentes, os níveis de Beclin 1 destacam-se como um fator crítico na indução da autofagia (CAO & KLIONSKY, 2007). Assim, a sinalização inicial da macroautofagia envolve a atuação coordenada dos complexos ULK1 e Beclin 1, responsáveis pela geração das vesículas de dupla membrana características do processo (TANIDA, 2011).

Na etapa subsequente, a proteína LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) é clivada em sua extremidade C-terminal pela protease Atg4, gerando a forma citosólica LC3-I. Esta é então conjugada à fosfatidiletanolamina (PE), originando a forma LC3-II, que se associa à membrana do autofagossomo e é amplamente utilizada como marcador da atividade autofágica (HOU et al., 2013). Nas células de mamíferos, existem três isoformas de LC3: I, II e III, sendo o LC3-II o marcador mais amplamente utilizado na detecção de autofagossomos, especialmente em tecidos tumorais e não tumorais (LEVINE, 2006; MORTEZAVI et al., 2017).

A proteína adaptadora p62 (também conhecida como SQSTM1) reconhece proteínas ubiquitinadas destinadas à degradação e as direciona ao autofagossomo por meio de sua interação com LC3-II. Durante o processo, p62 é simultaneamente degradada, servindo também como marcador funcional de fluxo autofágico. Após a maturação, o autofagossomo funde-se ao lisossomo, originando o autolisossomo, onde o conteúdo intracelular é degradado pelas enzimas hidrolíticas lisossomais (NDOYE & WEERARATNA, 2016; YUN & LEE, 2018).

A autofagia desempenha um papel citoprotetor em situações de estresse celular, como a escassez de nutrientes e a falta de fatores de crescimento, condições que podem desencadear apoptose ou morte celular programada do tipo I (Maruyama et al., 2014; Chen et al., 2017). No entanto, em determinados contextos, o processo autofágico pode contribuir para a morte celular do tipo II, caracterizada pelo acúmulo excessivo de autofagossomos. Nesses casos, a autofagia pode atuar em conjunto com a apoptose, favorecendo a eliminação de células irrecuperáveis (Yu et al., 2017).

No processo tumoral, a autofagia desempenha um papel paradoxal, estando associada tanto à supressão quanto à promoção do tumor. Esse efeito depende não apenas do nível basal de autofagia, mas também do tipo de tumor, do estágio da doença e do histórico genético do paciente (WHITE, 2015; MUKHOPADHYAY et al., 2021; SINGH et al., 2018).

Defeitos na autofagia têm sido relacionados à maior susceptibilidade a danos no DNA, estresse metabólico e principalmente à tumorigênese (AMEISEN, 2002). A autofagia, enquanto processo fisiológico de controle celular, exerce efeito citoprotetor ao eliminar proteínas malformadas, organelas danificadas e espécies reativas de oxigênio, prevenindo danos genômicos que podem levar a mutações e, conseqüentemente, câncer (SINGH et al., 2018). Por isso, inicialmente a autofagia foi considerada um mecanismo de supressão tumoral, evidenciado pela perda monoalélica do gene essencial ATG6/BECN1 em 40% a 75%

dos cânceres de próstata, mama e ovário humanos (AITA et al., 1999; LIANG et al., 1999; CHOI; RYTER; LEVINE, 2013). A inibição da autofagia favorece o crescimento celular maligno, e camundongos heterozigotos knockout para Beclin1 foram demonstrados apresentando maior risco para tumores hepáticos, pulmonares e linfomas (QU et al., 2003; YUE et al., 2003). Além disso, a inibição da autofagia leva ao acúmulo de agregados de p62, causando citotoxicidade, estresse oxidativo e danos ao DNA, um fenômeno associado a vários tipos de câncer e prognóstico desfavorável (KIMMELMAN, 2011; MATHEW et al., 2009).

Por outro lado, conforme o câncer progride, a autofagia é cooptada pelas células tumorais para suprir suas elevadas demandas metabólicas e garantir a sobrevivência e rápida proliferação (WHITE, 2012; YANG et al., 2011). Em tumores estabelecidos, a autofagia protege as células da necrose provocada pelo estresse metabólico (LIU; RYAN, 2012). Assim, células cancerosas dependem da autofagia — muitas vezes mais que células normais — devido às deficiências do microambiente tumoral e ao aumento das necessidades metabólicas e biossintéticas geradas pela proliferação desregulada (RABINOWITZ; WHITE, 2010). Por exemplo, a autofagia basal é aumentada em áreas hipóxicas dos tumores, sendo crucial para a sobrevivência celular (DEGENHARDT et al., 2006). Também está elevada em células transformadas por RAS, favorecendo crescimento, sobrevivência, tumorigênese, invasão e metástase (GUO et al., 2011; LOCK et al., 2011; YANG et al., 2011; LOCK et al., 2014). Ademais, a inibição da autofagia, tanto por métodos genéticos quanto farmacológicos, demonstrou induzir regressão tumoral em xenoenxertos pancreáticos e modelos murinos (YANG et al., 2011; KIMMELMAN, 2011).

Convém acrescentar que, já se sabe que um dos mecanismos responsáveis pela resistência aos medicamentos é a autofagia (CUERVO, 2004; MEHRPOUR et al., 2010). Como a autofagia é um processo de sobrevivência celular, a maioria das células tratadas com quimioterápicos exibe indução de autofagia. Essa indução de autofagia é uma última tentativa de sobrevivência das células tumorais, que pode ser combatida por uma terapia combinada de inibidores de autofagia com quimioterápicos (SINGH et al., 2018).

1.8 Autofagia e RB

Como mencionado anteriormente, além de sua função clássica no controle do ciclo celular e na manutenção da estabilidade genômica, a via do RB também tem sido implicada na regulação da autofagia, sugerindo um papel mais amplo desse eixo molecular na homeostase celular. A indução da autofagia por RB em alguns trabalhos foi demonstrada

através da regulação que pRB exerce em *E2F1*. Em um estudo com células de osteosarcoma (Saos-2) deficientes em RB, a ausência dessa proteína impediu a ligação ao *E2F1*, levando à diminuição do processo autofágico. Em contrapartida, quando essas linhagens foram transfectadas com RB, foi observada uma indução da autofagia (YANG et al., 2010). Ademais, em outro trabalho, *E2F1* foi demonstrado podendo induzir a expressão de genes de autofagia como *LC3*, *ATG1* e modulador de autofagia regulado por dano (*DRAM*) (POLANGER et al. 2008).

Em outro estudo conduzido pelo nosso laboratório (BIASOLI et al., 2013), foi demonstrado que a proteína pRB está envolvida na regulação da interação entre autofagia e apoptose, contribuindo para a resistência de células de glioblastoma ao VP-16, um inibidor da topoisomerase II comumente utilizado no tratamento de diversos tipos tumorais. A supressão da expressão de RB de forma abrupta, por meio de transfecção com siRNA, levou à interrupção do processo autofágico induzido pelo VP-16. Os dados também indicam que a forma hiperfosforilada de RB, frequentemente presente em glioblastomas, está associada não apenas à elevada taxa de proliferação celular, mas também à resistência à quimioterapia. Isso porque, mesmo funcionalmente inativado quanto ao bloqueio do ciclo celular, o RB hiperfosforilado mantém a capacidade de inibir a apoptose em células tumorais de glioblastoma.

Vários quimioterápicos são reconhecidos como potentes indutores de autofagia, o que pode contribuir para a sobrevivência das células cancerosas (DELOU et al., 2016; GARBAR et al., 2017; HO & GORSKI, 2019). Um exemplo é a oxaliplatina, que demonstrou induzir autofagia em células de CCR (DELOU et al., 2016; YAN et al., 2019).

Considerando que a autofagia medeia a resistência a diversos agentes antitumorais (WANG et al., 2016; CHITTARANJAN et al., 2014), esse mecanismo se torna um alvo co-promissor para novas estratégias de combinação terapêutica no tratamento do câncer (YANG et al., 2011). Assim, a combinação de inibidores da via da pRB com quimioterápicos de primeira linha pode ser promissor, pois, além de inibir a proliferação celular, pode interferir com a autofagia, um mecanismo de resistência tumoral para esses medicamentos.

1.9. Inibidores seletivos de CDK4/6 (iCDK4/6)

Nos últimos anos, o avanço de inibidores potentes e específicos de CDK, com boa tolerabilidade, gerou um renovado interesse por essa classe de terapias direcionadas

(Dukelow, Kishan, Khasraw e Murphy, 2015). Inibidores CDK4/6 foram desenvolvidos e testados clinicamente, recebendo recentemente aprovação para uso em humanos. Entre eles estão palbociclibe (PD0332991, Pfizer, NY, EUA), ribociclibe (LEE011, Novartis, Basel, Suíça) e abemaciclibe (LY2835219, Eli Lilly, Indianápolis, EUA). Esses 3 inibidores já demonstraram atividades pré-clínicas e clínicas promissoras em vários tumores sólidos (O'LEARY et al., 2016), onde palbociclibe e abemaciclibe demonstraram ser mais eficazes na inibição da fosforilação da serina 807 e serina 780 da pRB em comparação com Ribociclibe, avaliada em diferentes linhagens de células de câncer de mama.

O aumento na atividade de CDK4/6 é esperado para conferir sensibilidade aos inibidores de CDK4/6, o que, de fato, foi demonstrado em estudos (GONG et al., 2017). Dito isso, vários tipos de câncer demonstram amplificações de *CDK6* - tal como cânceres gastrointestinais- (CERAMI et al., 2012). No CCR, há a presença de mecanismos genéticos tal como a desregulação de *p16INK4a*, dificultando a inibição endógena de CDK4/6. Ademais, também é comum a amplificação de ciclina D (KNUDSEN & KNUDSEN 2008; KNUDSEN & WITKIEWICZ et al., 2017). Além disso, considerando que esses inibidores modulam a via da pRB, é interessante testá-los em linhagens tumorais nas quais a hiperfosforilação de pRB está associada à evasão tumoral.

As células de CCR mantêm a expressão da pRB, apresentando níveis elevados de pRB em comparação com o tecido normal adjacente, sendo rara a perda ou mutações nos genes dessa proteína (GOPE et al., 1991; GOPE, 1992). Além disso, foi demonstrado que a redução de RB leva à morte dessas células tumorais, e que a presença de RB inibe a morte celular induzida por agentes anti-inflamatórios ou quimioterápicos (CHAU; BORGES et al., 2002; BORGES et al., 2005; HAN et al., 2013; BIASOLI et al., 2013). Esses achados sugerem que a função de RB é essencial para o desenvolvimento do tumor colorretal (MORRIS et al., 2008; VIATOUR; SAGE, 2011), sendo uma opção promissora para a aplicação de iCDKs.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo (Souza, 2023), investigamos o potencial sinérgico de combinações entre quimioterápicos convencionais e inibidores de CDK 4/6 na linhagem HCT116, um modelo amplamente utilizado de carcinoma colorretal humano. Nesse trabalho, células HCT116 foram cultivadas por 48 horas com doses crescentes dos quimioterápicos de primeira linha para câncer colorretal — oxaliplatina (OXA), SN-38 (forma ativa do irinotecano) e 5-fluorouracil (5-FU) — isoladamente ou em combinação com uma dose fixa dos inibidores de CDK4/6 palbociclibe (PALB) ou abemaciclibe (ABE), correspondente à inibição de 40–50% da viabilidade celular (IC40–50). A viabilidade foi

determinada com base na porcentagem de células positivas para Calceína AM, indicativa de integridade de membrana e atividade esterase. Para avaliar interações farmacológicas, foi utilizado o método do Combination Index (CI) de Chou-Talalay (Chou, 2010), que classifica combinações como sinérgicas ($CI < 1$), aditivas ($CI = 1$) ou antagonistas ($CI > 1$). Os resultados demonstraram que a oxaliplatina apresentou os menores valores de CI quando combinada com ambos os inibidores de CDK4/6, indicando sinergismo robusto, especialmente nas concentrações de 0,6–0,8 μM . Em razão desses achados, a oxaliplatina foi selecionada para as análises subsequentes de autofagia em combinação com os inibidores de CDK4/6 que descrevemos aqui. O IC_{50} de abemaciclibe determinado para a linhagem HCT116 foi de 300 nM. No entanto, nas condições em que a combinação com oxaliplatina ($IC_{30} = 0,6 \mu\text{M}$) se mostrou mais promissora, tornou-se necessário reduzir a concentração de abemaciclibe para 35 nM (IC_{20}), a fim de avaliar se, mesmo em doses mais baixas, o inibidor manteria efeito na combinação. Como a associação de 0,6 μM de oxaliplatina com 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe resultou em redução significativa da viabilidade celular em comparação aos tratamentos isolados, ambas as concentrações foram selecionadas para as análises subsequentes. Para o palbociclibe, o IC_{50} foi de 1023 nM. Contudo, esse valor se situou em um platô de resposta junto a outras duas concentrações próximas. Por isso, optou-se por utilizar a menor concentração do platô, 400 nM, nos experimentos de combinação.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais frequente no mundo (OMS, 2022), e sua sobrevida em estágios avançados é prejudicada pela formação de metástases e pela resistência a medicamentos (Guan, 2015). No Brasil, em 2020, foram registrados 20.245 óbitos por câncer de cólon e reto (BRASIL, 2022; INCA, 2020a).

Nos últimos anos, surgiram novas terapias direcionadas a enzimas reguladoras do ciclo celular, como os inibidores de CDK4/6 (iCDK4/6), palbociclibe e abemaciclibe. Esses fármacos, já utilizados no câncer de mama avançado com expressão de RB, bloqueiam sua fosforilação, levando à parada do ciclo celular, podendo também induzir senescência, morte celular e autofagia (Lynce et al., 2018; Valenzuela et al., 2017; Vijayaraghavan et al., 2017; Jost et al., 2021). Assim, tornam-se candidatos promissores para tumores com desregulação na via de RB.

Estudos proteogenômicos demonstram que, no CCR, a via de RB está frequentemente alterada: embora a expressão da proteína RB esteja preservada, sua forma hiperfosforilada é

predominante (Vasaikar et al., 2019). Essa modificação impede sua função supressora, promovendo proliferação celular e resistência terapêutica (Biasoli et al., 2013). Além disso, o CCR apresenta alterações semelhantes às observadas no câncer de mama, como amplificação de CCND1, perda de CDKN2A (p16^{INK4a}) e amplificação de RB1 (Otto & Sicinski, 2017). A perda ou mutações em RB1, por outro lado, são eventos raros nesse tumor (Gope et al., 1991; Gope, 1992).

Importante destacar que a hiperfosforilação de RB foi apontada como um possível evento "driver" funcional na tumorigênese do CCR, mesmo na ausência de mutações em RB1 (Vasaikar et al., 2019).

Com base nesses dados, levantamos a hipótese de que o RB hiperfosforilado exacerba o processo autofágico induzido pela quimioterapia de primeira linha, favorecendo a resistência. Assim, os iCDK4/6 poderiam restaurar a sensibilidade das células tumorais ao interferirem nesse eixo.

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia dos iCDK4/6, isoladamente ou em combinação com quimioterápicos, em modelo celular de CCR, analisando as alterações no processo autofágico associadas ao tratamento.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Investigar a modulação de autofagia, após tratamento com os inibidores seletivos de CDK4/6 e quimioterápicos de primeira linha usados na clínica como monoterapia e em combinação em células de CCR.

3.1. Objetivo específicos

- Analisar o acúmulo de vesículas autofágicas em resposta às combinações eficazes de quimioterápicos e inibidores nas linhagens de CCR, utilizando CYTO-ID em plataforma multiparamétrica.
- Investigar a influência das combinações efetivas de quimioterápicos e inibidores sobre os marcadores do fluxo autofágico Beclina 1, LC3 I/II e p62 nas linhagens de CCR por meio de análise com *Western blot*.

- Avaliar de forma exploratória, por microscopia eletrônica de transmissão, alterações morfológicas compatíveis com o processo autofágico em células da linhagem HCT116 tratadas com a combinação de quimioterápico e inibidores de CDK4/6.
- Avaliar de forma exploratória a dinâmica lisossomal em células HCT116 tratadas com combinações de oxaliplatina e inibidores de CDK4/6, por meio da marcação com LysoTracker Red em plataforma multiparamétrica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo das Linhagens Celulares

Serão utilizadas as linhagens tumorais HCT116 (carcinoma colorretal humano, originalmente ATCC: CCL-247) – obtidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem HCT116 é selvagem para *RBI* e apresenta mutações em *CDKN2A* (AHMED et al., 2013; ATCC, 2022).

As linhagens são mantidas congeladas em nitrogênio líquido em meio de criopreservação contendo 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Quando cultivadas, serão mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM/F12 (Gibco, 12400024) suplementado com 10% de SFB (Gibco, 12657029) e 1% de penicilina/estreptomicina. As células serão incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. A certificação das linhagens foi realizada por tipagem genética com marcadores de microssatélites, no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro, da UFRJ. Além disso, as linhagens serão testadas como livres de micoplasma por coloração com DAPI (ThermoFisher, Cat. No. D1306).

4.2. Tratamento

Os compostos palbociclibe (MedChem Express, HY-A0065) e abemaciclibe (MedChem Express, HY-16297A) são diluídos em DMSO 100% e armazenados a -80°C. O palbociclibe permanece estável por até um ano a essa temperatura, enquanto o abemaciclibe mantém sua estabilidade por até 6 meses. A oxaliplatina (Sigma-Aldrich) é diluída em água para injeção e pode ser armazenada a -20°C por até 6 meses. O controle negativo consistirá em células mantidas em meio DMEM-F12 com 10% de SFB, uma vez que a concentração máxima de DMSO nas doses utilizadas (0,02%) já foi previamente testada e não interfere na

citotoxicidade das linhagens de CCR utilizadas.

Para o tratamento, serão utilizadas as concentrações previamente identificadas como mais eficientes. Dito isso, para a linhagem HCT116, será administrada Oxaliplatina (0,6 μ M) combinada com Palbociclibe (400 nM) e Abemaciclibe (35 nM e 300 nM) e incubadas por 48 horas. Ademais, além da terapia combinada, cada composto será administrado individualmente nas mesmas concentrações para monoterapia.

4.3. Análise em plataforma multiparamétrica *Cytation-5*: *CYTO-ID Autophagy*

Foram plaqueadas 5×10^3 células da linhagem HCT116 por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação sob as condições de temperatura e CO₂ previamente informadas, será realizado o tratamento previamente mencionado. Todas as condições serão realizadas em triplicata.

Como controle negativo, foram utilizados poços contendo apenas meio suplementado e poços com a concentração de DMSO correspondente àquela usada para diluição dos inibidores de CDKs. Além disso, como controle positivo, foi empregado o inibidor da autofagia, pertencente ao kit: cloroquina (100 μ M) por 48 horas.

A análise do fluxo autofágico foi realizada utilizando o ensaio CYTO-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, ENZ-51031-K200), recomendado pelas *Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy* (KLIONSKY et al., 2020), com aquisição de imagens na plataforma multiparamétrica Cytation 5 (BioTek). Esse ensaio permite a marcação de vacúolos autofágicos, como autofagossomos e autolisossomos, por meio de um corante fluorescente específico diluído na proporção de 1:1000 em Assay Buffer 1X suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e Hoechst 33258 (1:1000), utilizado para a marcação nuclear.

Após a incubação das células com os tratamentos propostos, o meio foi removido, os poços foram lavados com tampão apropriado e, em seguida, foram adicionados 100 μ L da solução de corantes por poço. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C, protegidas da luz. Posteriormente, os poços foram novamente lavados, tamponados e preparados para aquisição das imagens. As capturas foram realizadas com objetiva de 20 $\times$, utilizando anel de correção ajustado para 0,17 mm. Como controle positivo para bloqueio do fluxo autofágico, foi utilizada cloroquina a 100 μ M, com incubação por 48 horas.

A quantificação e análise foi realizada por meio das ferramentas integradas do software Gen5, versão 3.12.08. Inicialmente, as imagens passaram por subtração de fundo e montagem. A identificação das células foi realizada com base na marcação nuclear pelo canal Hoechst, utilizando-se a definição de uma máscara primária com parâmetros de tamanho mínimo e máximo para os núcleos, a fim de excluir artefatos como bolhas, detritos e resíduos. O limiar de intensidade foi ajustado, quando necessário, para garantir a inclusão precisa da população celular total.

A partir da máscara nuclear, o canal GFP (CYTO-ID) foi selecionado, e a máscara foi expandida para o citoplasma, abrangendo a fluorescência verde associada aos vacúolos autofágicos. Também foram realizados ajustes no limiar de intensidade do canal GFP, permitindo a inclusão de células com marcações mais fracas ou intensas. Foram aplicados filtros de área para excluir objetos menores ou maiores que células individuais e eliminar eventuais agregados. Células localizadas nas bordas das imagens compostas foram excluídas da análise.

As métricas extraídas incluíram: contagem total de células (Hoechst⁺), área dos objetos, intensidade média de fluorescência em ambos os canais (Hoechst e GFP), densidade integrada do sinal GFP por célula, e área ocupada pela fluorescência GFP por célula. Os parâmetros ideais de ganho, tempo de exposição e intensidade de iluminação foram previamente ajustados para padronização das aquisições.

Com base nesses dados, foram construídos gráficos referentes à intensidade média de fluorescência e à área dos objetos por condição experimental. Para fins de comparação, ambas as métricas foram normalizadas em relação ao grupo controle, cujo valor foi definido como 1. Todas as análises foram conduzidas de forma cega quanto às condições experimentais, a fim de evitar viés na interpretação dos resultados.

4.4. *Western Blot*

Essa técnica foi utilizada para identificar de forma mais precisa as etapas do bloqueio do fluxo autofágico. Nesse contexto, foram analisadas proteínas de diferentes fases do processo autofágico, como Beclina-1, p62 e LC3 I/II.

A linhagem celular HCT116 foi cultivada em placas de Petri, conforme descrito anteriormente. Após o período de tratamento com os respectivos quimioterápicos e iCDK4/6, nas concentrações e tempos de incubação previamente estabelecidos, as células foram

submetidas ao processo de extração de proteínas.

Para a extração de proteínas, foi utilizado tampão de uréia UTB (Tris-HCl 75 mM, ureia 9 M, pH 7,4), com beta-mercaptoetanol adicionado para reduzir as proteínas. As amostras são sonicadas e armazenadas em tampão de amostra a -20°C. A quantificação proteica é realizada no NanoDrop 2000 por meio do ensaio de Bradford, com base em uma curva-padrão de BSA, onde a intensidade do azul (detectada a 595 nm) indica a concentração proteica. Assim, para cada amostra, 40 µg de proteína foram diluídos em tampão de amostra (SDS 10%, β-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 20%, Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, e azul de bromofenol 0,05%). Assim, as amostras foram então aquecidas a 95°C por 5 minutos em banho seco e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10-12% , junto com um padrão de peso molecular (10 µL, Precision Plus Protein Kaleidoscope, Bio-Rad).

Cada poço de amostra recebeu 40 µg de proteína e o tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,2%) foi diluído na concentração de uso (1X), e a corrida foi iniciada a 60 V até as amostras atingirem o gel de corrida, aumentando-se então a voltagem para 120 V até o final. Para a transferência de proteínas, a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi ativada em etanol absoluto por 20 minutos e posteriormente embebida por 30 minutos em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,2%), diluído na concentração de uso (1X) e acrescido de 20% de etanol. A transferência para membrana foi feita por 1h20min a 0,22 A, usando um equipamento de eletrotransferência semi-seca da Bio-Rad. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de 5% de Albumina de Soro Bovino (BSA, Sigma-Aldrich) em TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, Tween 20 a 0,1%), e incubadas por aproximadamente 16 horas com anticorpos primários: Beclina-1 (1:500, Abcam #ab62557), p62 (1:1000, Cell Signaling #5114S), LC3A/B (1:1000, Cell Signaling #12741S), GAPDH (1:2000, Invitrogen #MA5-12571) e Ciclofilina B (1:1000, Sigma #SAB4200201). Após lavagens com TBS-T 0,1%, as membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpos secundários conjugados à HRP: anti-coelho (1:2000, Life Technologies #A16104) e anti-camundongo (1:1000, Invitrogen #G21040). A detecção foi realizada por quimioluminescência (Luminata ou Immobilon Forte, Bio-Rad) no sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad). A análise densitométrica foi feita utilizando o software ImageLab, com normalização pelos controles de carregamento (GAPDH ou Ciclofilina B).

4.5. Caracterização Morfológica em Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi empregada para a análise morfológica de estruturas celulares associadas ao processo autofágico, como vacúolos autofágicos, corpos multilamelares e alterações em organelas. Para isso, células da linhagem HCT116 foram plaqueadas em densidade de 1×10^4 células por poço, em placas de 96 poços. Após 48 horas de incubação sob condições controladas de temperatura e CO₂, foi realizado o tratamento descrito anteriormente. Foi utilizada uma maior densidade celular e um tempo de crescimento mais prolongado em comparação à análise por Cytation, com o objetivo de garantir um número adequado de células para o processamento e aquisição das imagens. Todas as condições experimentais foram conduzidas em triplicata.

As culturas celulares foram fixadas in situ com glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich, #G5882) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (PBS), pH 7,4, por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS (5 minutos cada) e uma vez em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (Electron Microscopy Sciences, #12300), por 5 minutos. Posteriormente, foram incubadas por 1 hora e 30 minutos, protegidas da luz, em uma solução de tetróxido de ósmio 1% (Sigma-Aldrich, #201030) em tampão cacodilato 0,1 M (Sigma-Aldrich, #C4945), pH 7,4, suplementado com ferrocianeto de potássio 0,8% (Synth, #2839) e cloreto de cálcio 5 mM (Sigma-Aldrich, #C1016).

Após essa etapa, as culturas foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4 (5 minutos cada) e, em seguida, incubadas em solução aquosa de acetato de uranila 1% (Sigma, #73943) por 16 horas a 4 °C. Concluída a fixação, as amostras foram lavadas em água destilada e submetidas à desidratação gradual em banhos de etanol com concentrações crescentes: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%.

Para a inclusão, as culturas foram infiltradas com uma mistura de resina epóxi (Epon, Sigma, #45359, segundo protocolo de Luft) e etanol absoluto (1:1), diretamente na placa de 96 poços, sob agitação, durante a noite. Posteriormente, foi realizada a infiltração com Epon puro e a montagem dos blocos. A polimerização da resina foi conduzida em estufa a 60 °C por 48 horas.

Os blocos foram então seccionados em ultramicrotomo (MT 6000 – XL), obtendo-se cortes ultrafinos com espessura entre 70 e 100 nm, que foram coletados em grades de cobre. As seções foram contrastadas com acetato de uranila a 5% por 30 minutos, lavadas em água

destilada, e contrastadas com citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 5 minutos, seguidas de nova lavagem em água destilada.

Por fim, as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (modelo Hitachi HT7800), operando a 80 kV.

4.6. Análise em plataforma multiparamétrica *Cytation-5*: LysoTracker

Foram plaqueadas 5×10^3 células da linhagem HCT116 por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação sob as condições de temperatura e CO₂ previamente informadas, será realizado o tratamento previamente mencionado.

Como controle negativo, foram utilizados poços contendo apenas meio suplementado e poços com a concentração de DMSO correspondente àquela usada para diluição dos inibidores de CDKs. Além disso, como controle positivo, foi empregado o inibidor da autofagia, pertencente ao kit: cloroquina (100 μ M) por 48 horas.

A análise exploratória de alterações na dinâmica lisossomal foi realizada na plataforma Cytation 5 (BioTek), utilizando o corante LysoTracker™ Red DND-99 (Invitrogen, #L7528). Esse ensaio permite a marcação de compartimentos ácidos intracelulares, como os lisossomos, por meio de fluorescência no canal Texas Red. A solução de corantes foi preparada com o corante LysoTracker diluído na concentração final de 75 nM em Assay Buffer 1X, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), além de Hoechst 33258 (1:1000) para marcação nuclear e CYTO-ID® (1:1000) para identificação de estruturas autofágicas.

Após a incubação das células com os respectivos tratamentos, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com tampão apropriado, e 100 μ L da solução contendo os corantes foram adicionados a cada poço. As placas foram então incubadas por 30 minutos a 37 °C, protegidas da luz. Em seguida, os poços foram novamente lavados, tamponados e preparados para leitura. As imagens foram adquiridas com objetiva de 20 $\times$, utilizando como controle positivo a cloroquina (100 μ M), visando a inibição do fluxo autofágico.

A análise e quantificação das imagens foram conduzidas de forma semelhante à descrita para o ensaio com CYTO-ID. Inicialmente, foi definida a máscara primária com base na marcação nuclear pelo canal Hoechst, com ajustes nos parâmetros de tamanho e limiar de intensidade para exclusão de artefatos e detritos. A partir dessa população primária, foi aplicada uma máscara secundária, desta vez utilizando o canal Texas Red correspondente ao

LysoTracker, em substituição ao canal GFP utilizado nas análises com CYTO-ID. Foram selecionadas as mesmas métricas de interesse, como contagem de células, área do objeto e intensidade média de fluorescência no canal de interesse.

Entretanto, por se tratar de um dado exploratório obtido a partir de um único experimento ($n = 1$), não foram realizadas análises estatísticas. Dessa forma, foi construído apenas um gráfico representativo contendo a média da intensidade de fluorescência por célula no canal correspondente ao LysoTracker.

4.7. Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.4.3, usando o teste de análise de variância One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar dados múltiplos. Exceto se especificado, todos os dados são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Serão considerados significativos os resultados com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Combinações de quimioterápicos com inibidores de CDK4/6 não resultaram em acúmulo significativo de vacúolos autofágicos

A fim de avaliar o acúmulo de vesículas autofágicas em resposta às combinações terapêuticas envolvendo quimioterápicos e inibidores de CDK4/6 na linhagem de câncer colorretal HCT116, utilizou-se a sonda CYTO-ID, a qual apresenta fluorescência elevada ao se ligar a autofagossomos e autolisossomos. A **Figura 5A** apresenta imagens representativas das condições experimentais avaliadas: controle negativo (células não tratadas), controle positivo com cloroquina (CQ, inibidor da autofagia) e os tratamentos com 0,6 μ M de oxaliplatina, isoladamente ou em combinação com abemaciclibe (35 nM – IC20 ou 300 nM – IC50) ou com 400 nM de palbociclibe. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342 (azul) e as estruturas autofágicas com CYTO-ID (verde brilhante).

As **Figuras 5B** e **5C** apresentam a quantificação da média intensidade média da fluorescência verde emitida pela sonda CYTO-ID por célula nas diferentes condições experimentais, enquanto **5D** e **5E** a quantificação da média da área de fluorescência por célula. A **Figura 5B** e **5D** referem-se às condições com abemaciclibe, enquanto a **Figura 5C** e **5E** correspondem às com palbociclibe. Em todos os gráficos, os valores foram normalizados em relação à média do controle negativo.

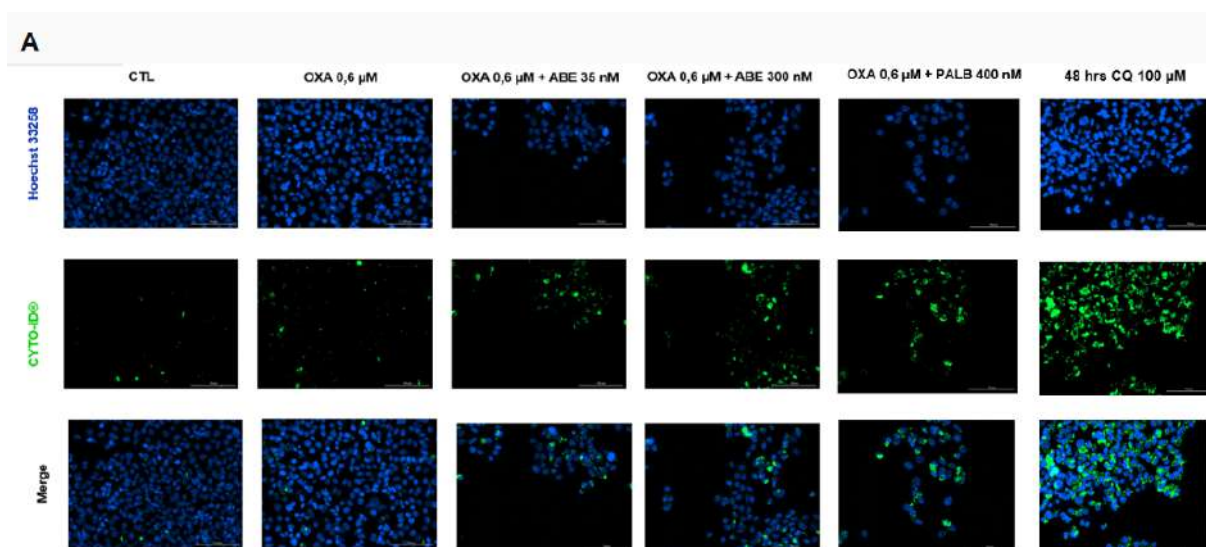
Como esperado, o tratamento com cloroquina (100 μ M por 48 horas) promoveu acúmulo significativo de autofagossomos/autolisossomos, evidenciado pelo aumento acentuado da fluorescência (**Figura 5B, 5C, 5D e 5E**), uma vez que este composto bloqueia a degradação lisossomal, interrompendo a etapa final do processo autofágico.

Nas condições com abemaciclibe (**Figuras 5B e 5D**), tanto a dose de 35 nM quanto a de 300 nM em combinação com oxaliplatina resultaram em aumento significativo na fluorescência em comparação ao tratamento isolado e ao controle negativo. Dentre essas, a dose de 300 nM promoveu um efeito mais evidente, tanto na intensidade quanto na área de fluorescência

De forma semelhante, a combinação de oxaliplatina com palbociclibe (**Figuras 5C e 5E**) também resultou em aumento do CYTO-ID (intensidade de fluorescência e área de fluorescência), ainda que em menor magnitude.

A intensidade de fluorescência está relacionada ao conteúdo autofágico presente nas vesículas; assim, valores mais elevados indicam vesículas com maior brilho, o que pode refletir o acúmulo de autofagossomos e/ou autofagolisossomos. Por sua vez, a área de fluorescência representa a extensão ocupada por essas estruturas, podendo refletir um aumento no número de vesículas, um maior diâmetro vesicular, ou ambos os fatores.

Portanto, as imagens representativas (**Figura 5A**) e os gráficos (**Figuras 5B , 5C, 5D e 5E**) indicam uma possível intensificação na formação de estruturas autofágicas nas condições combinadas.



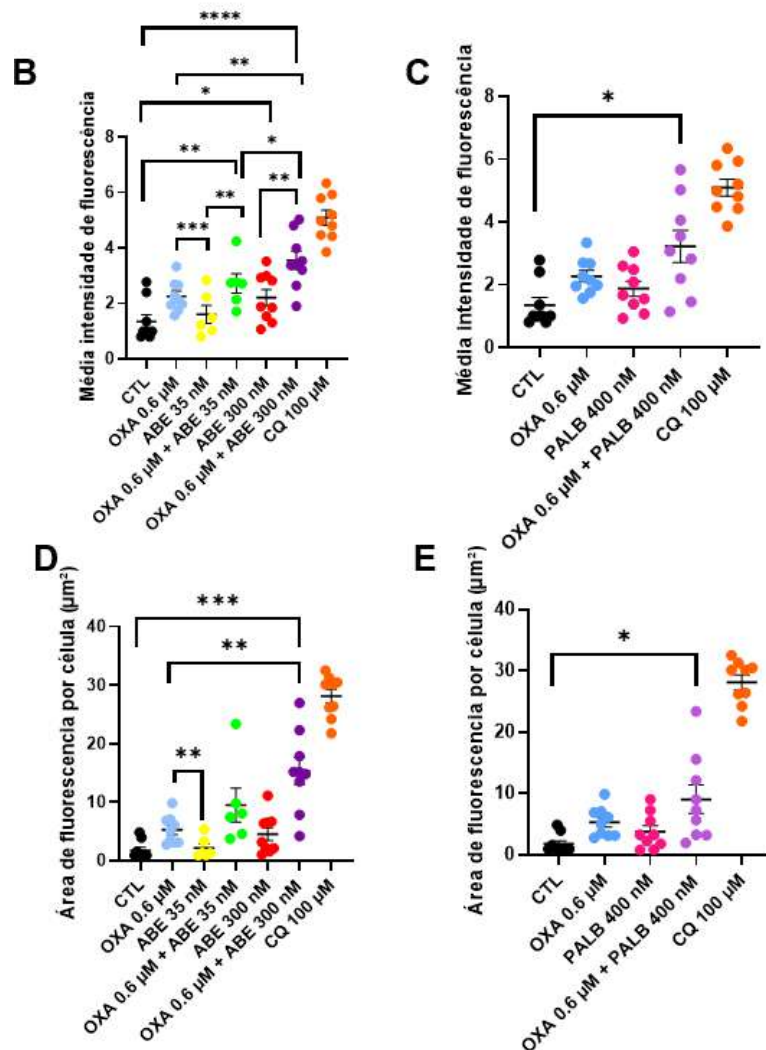


Figura 5. Avaliação da modulação de autofagia no tratamento de oxaliplatina com os inibidores de CDK4/6 na linhagem HCT116. (A) Imagens representativas obtidas na plataforma Cytation 5, com objetiva de 20 $\times$, referentes aos tratamentos com abemaciclibe (35 e 300 nM) e palbociclibe (400 nM). Os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342 (azul) e os autofagossomos/autolisossomos foram marcados com o corante CYTO-ID (verde brilhante). Barra de escala: 100 μ m. As células (5×10^3 por poço) foram tratadas por 48 horas com 100 μ M de cloroquina, 0,6 μ M de oxaliplatina (em dose única) ou com as combinações desta com palbociclibe (400 nM) ou abemaciclibe (35 ou 300 nM). (B) Intensidade média de fluorescência verde do CYTO-ID por célula, normalizada em relação ao grupo controle, nas condições com abemaciclibe e sua associação com oxaliplatina. A análise por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey, revelou diferenças significativas entre o grupo tratado com cloroquina e os grupos controle, oxaliplatina e oxaliplatina + abemaciclibe 300 nM, além de diferença entre os grupos controle e oxaliplatina ($p < 0,1$). (C) Intensidade média de fluorescência verde do CYTO-ID por célula, normalizada em relação ao grupo controle, nas condições com palbociclibe. ANOVA one-way com pós-teste de Tukey indicou diferenças significativas entre o grupo cloroquina e os grupos controle, oxaliplatina e palbociclibe, bem como entre os grupos controle e oxaliplatina ($p < 0,1$). (D) Média da área de fluorescência verde do CYTO-ID por célula (μ m²), normalizada em relação ao grupo controle, nas condições com abemaciclibe e sua combinação com oxaliplatina. A análise estatística identificou diferenças significativas entre o grupo cloroquina e os grupos controle, oxaliplatina e oxaliplatina + abemaciclibe 300 nM, além de diferença entre os grupos controle e oxaliplatina ($p < 0,1$). (E) Média da área de fluorescência verde do CYTO-ID por célula (μ m²), normalizada em relação ao grupo controle, nas condições com palbociclibe. A análise por ANOVA one-way com pós-teste de Tukey revelou diferenças significativas entre o grupo cloroquina e os grupos controle, oxaliplatina e palbociclibe, bem como entre os grupos controle e

oxaliplatina ($p < 0,1$). Os gráficos (B–E) representam a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes. Cada ponto representa uma réplica experimental, com N variando de 2 a 3 por condição. Todas as análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Diferenças significativas em relação ao grupo tratado com cloroquina foram consideradas com $p < 0,1$.

5.2. As combinações terapêuticas não modularam de forma significativa a expressão de marcadores relacionados à autofagia

Para investigar a influência das combinações eficazes de quimioterápicos e inibidores de CDK4/6 sobre marcadores do fluxo autofágico na linhagem HCT116, foi realizada análise por Western Blot. Essa técnica foi utilizada para avaliar possíveis bloqueios em diferentes etapas do processo autofágico, por meio da detecção das proteínas Beclina-1 (iniciação), p62 (fase de degradação) e LC3 (formação de autofagossomos).

Inicialmente, a proteína GAPDH foi utilizada como controle de carregamento; no entanto, devido a problemas com o anticorpo em experimentos subsequentes, a ciclofilina foi empregada como controle alternativo. As **Figuras 6A, 6D e 6G** apresentam membranas representativas da expressão de Beclina-1, p62 e LC3, respectivamente, acompanhadas de seus controles de carregamento correspondentes.

Os gráficos **6B e 6C** mostram a quantificação da expressão de Beclina-1 nas condições tratadas com oxaliplatina isolada ou combinada com 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe (6B), e com 400 nM de palbociclibe (6C). Os valores foram normalizados pelo controle de carregamento e, em seguida, pelo controle negativo (sem tratamento).

De forma análoga, os gráficos **6E e 6F** representam a quantificação da proteína p62 sob os mesmos tratamentos com abemaciclibe (6E) e palbociclibe (6F). Já os gráficos **6H e 6I** mostram a razão LC3-II/LC3-I nas condições tratadas com oxaliplatina isolada ou combinada com abemaciclibe (6H) ou palbociclibe (6I), também normalizadas em relação aos respectivos controles.

Caso houvesse bloqueio do fluxo autofágico, seria esperado observar acúmulo de p62, devido à sua degradação ser dependente do funcionamento adequado do processo, e acúmulo de LC3-II, que se associa à membrana dos autofagossomos, indicando formação sem posterior degradação. Por outro lado, caso houvesse indução de autofagia funcional, esperaria-se aumento de LC3-II associado à redução de p62, padrão compatível com um fluxo autofágico ativo e completo. A proteína Beclina-1, por estar envolvida na fase inicial da autofagia, pode apresentar aumento de expressão em casos de indução, embora sua variação seja menos sensível para avaliação do fluxo global.

No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de

nenhuma das proteínas analisadas, em nenhuma das condições testadas. Apesar disso, é importante considerar que a oxaliplatina, isoladamente, já foi descrita como indutora de autofagia em diversos modelos celulares (DELOU et al., 2016; YAN et al., 2019). Dessa forma, embora os dados obtidos não demonstrem evidências robustas de bloqueio do fluxo autofágico pelas combinações testadas, a ausência de significância estatística, aliada à variabilidade observada — especialmente na análise da razão LC3-II/LC3-I (**Figura 6I**) —, limita a interpretação conclusiva. Além disso, o fato de o Western Blot ser uma técnica suscetível a variáveis experimentais reforça a necessidade de cautela na interpretação dos resultados, não sendo possível descartar completamente a ocorrência de alterações no processo autofágico com a quantidade atual de experimentos.

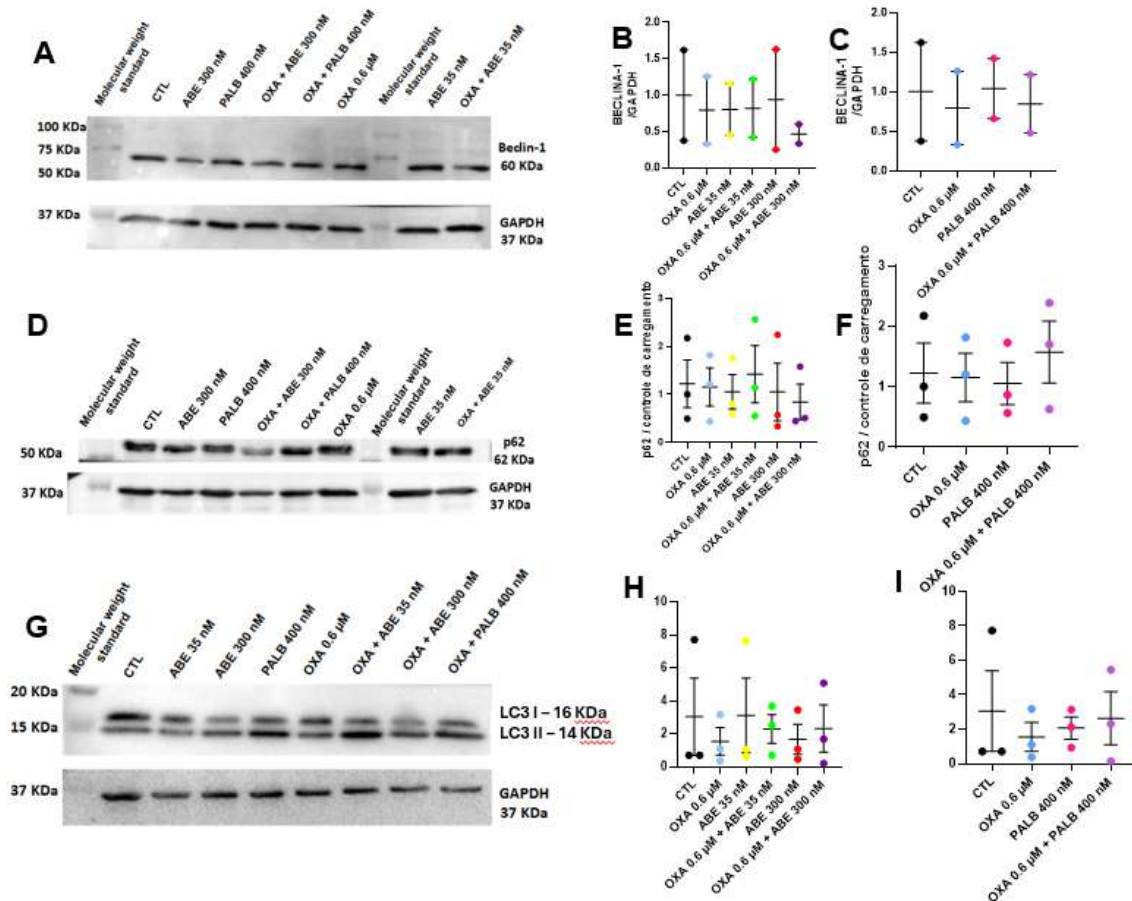


Figura 6. Análise da expressão de marcadores relacionados à autofagia por Western Blot após tratamentos com oxaliplatina e inibidores de CDK4/6 na linhagem HCT116. (A) Membrana representativa da expressão de Beclina-1 e do controle de carregamento GAPDH nas diferentes condições de tratamento com abemaciclibe. (B) Quantificação da expressão de Beclina-1 nos tratamentos com oxaliplatina isolada ou combinada com 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe. (C) Quantificação da expressão de Beclina-1 nos tratamentos com oxaliplatina isolada ou combinada com 400 nM de palbociclibe. (D) Membrana representativa da expressão de p62 e do controle de carregamento GAPDH nas diferentes condições com abemaciclibe e palbociclibe. (E) Quantificação da expressão de p62 nos tratamentos com oxaliplatina isolada ou combinada com abemaciclibe (35 nM ou 300 nM). (F) Quantificação da expressão de p62 nos tratamentos com oxaliplatina isolada ou combinada com palbociclibe (400 nM). (G) Membrana representativa da expressão de LC3-I e LC3-II, além do controle de carregamento GAPDH. (H) Quantificação da razão LC3-II/LC3-I nas condições com oxaliplatina isolada ou combinada com abemaciclibe. (I) Quantificação da razão LC3-II/LC3-I nas condições com oxaliplatina isolada ou combinada com palbociclibe. Cada ponto representa um experimento

independente ($n = 2$ ou 3). As análises de densitometria das bandas foram realizadas no software ImageJ, com normalização em relação aos respectivos controles de carregamento (GAPDH). Os gráficos representam a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes, com exceção da Beclina-1, cuja análise foi realizada em dois experimentos. Foi utilizado o teste One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças com $p < 0,1$ foram consideradas estatisticamente significativas.

5.3. Não foi identificado acúmulo de vacúolos com conteúdo em células HCT116 tratadas com as combinações terapêuticas

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi demonstrado que a proteína RB, quando hiperfosforilada em células de glioblastoma, desempenhava um papel antiapoptótico ao favorecer a autofagia induzida por quimioterápicos. Nesse contexto, foi observada, por microscopia eletrônica de transmissão, a presença de vacúolos autofágicos contendo material intracelular preservado, indicando um bloqueio no processo autofágico (BIASOLI et al., 2013).

Com base nesses achados, buscamos avaliar, de forma exploratória, alterações morfológicas compatíveis com a modulação da autofagia em células da linhagem HCT116 tratadas com as combinações de oxaliplatina e inibidores de CDK4/6. Para isso, células HCT116 (1×10^4 por poço) foram plaqueadas e, após 48 horas, tratadas com $0,6 \mu\text{M}$ de oxaliplatina combinada com 400 nM de palbociclibe, 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas e processadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão.

Em todas as condições analisadas, foram observadas estruturas compatíveis com vacúolos autofágicos, com acúmulo mais evidente nas condições de tratamento combinado, especialmente na associação com palbociclibe. Diferenças morfológicas sutis foram identificadas entre os tratamentos: nas células tratadas com abemaciclibe, os vacúolos apresentavam membranas mais espessas, enquanto nas tratadas com palbociclibe, predominavam vacúolos de membranas mais delgadas. Adicionalmente, nas combinações contendo abemaciclibe, foi identificada uma estrutura distinta (indicada por setas), cuja natureza ainda está sendo investigada.

Apesar dessas observações, não foram identificados vacúolos contendo material intracelular preservado, como descrito por Biasoli et al. (2013), o que caracterizaria um bloqueio do fluxo autofágico. Dessa forma, os dados morfológicos obtidos não sustentam a hipótese de que a morte celular induzida pelas combinações terapêuticas esteja associada à interrupção do fluxo autofágico, corroborando os resultados obtidos nas análises anteriores.

Além disso, nas combinações testadas em concentrações mais elevadas, foram observadas invaginações nucleares e estruturas intranucleares atípicas, que podem estar relacionadas a mecanismos alternativos de morte celular. Esses achados, contudo, requerem análises aprofundadas e complementares para elucidação de sua natureza e relevância funcional.

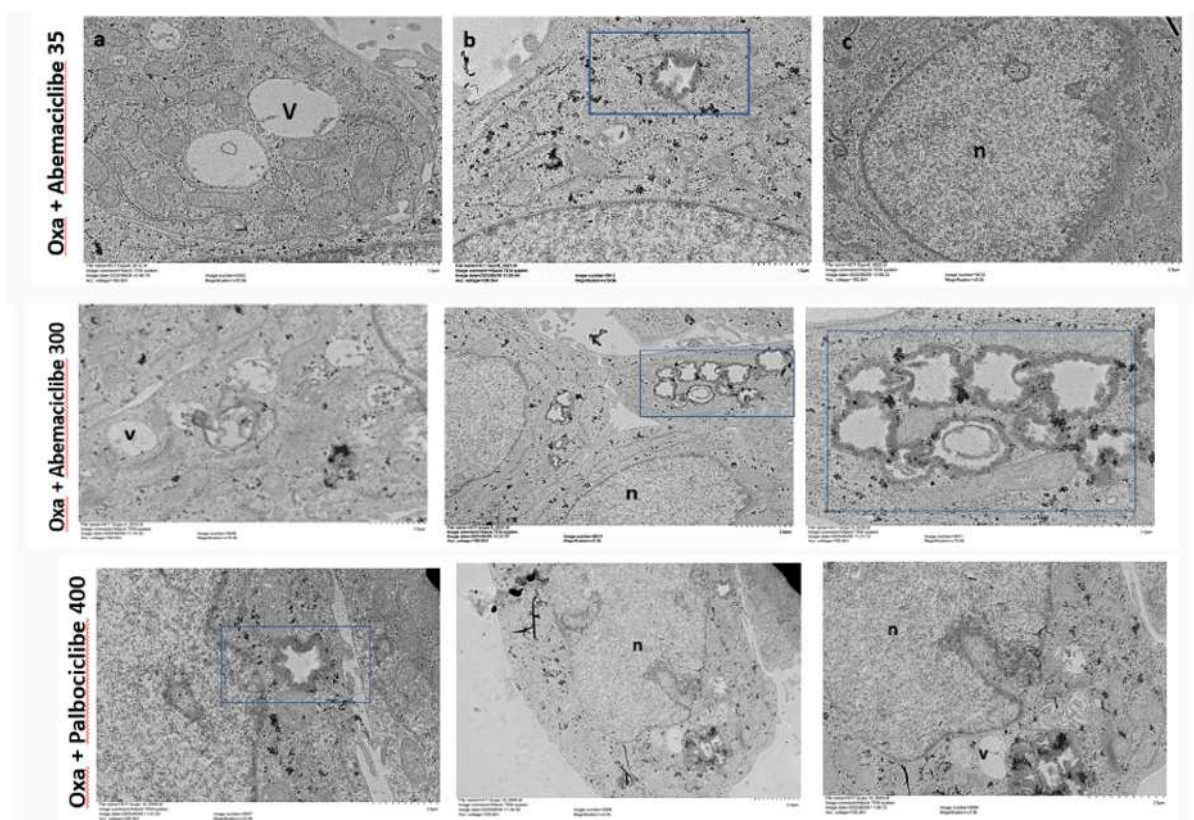


Figura 7. Análise ultraestrutural de células HCT116 por microscopia eletrônica de transmissão. Células HCT116 (1×10^4 por poço) foram plaqueadas e, após 48 horas, tratadas com $0,6 \mu\text{M}$ de oxaliplatina em combinação com 400 nM de palbociclibe, 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe. Após o período de incubação, as células foram fixadas e processadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens revelam estruturas celulares como núcleo (N) e vacúolos (V).

5.4. Dados exploratórios sugerem aumento de lisossomos nas combinações terapêuticas

Uma vez que os achados obtidos nas análises anteriores não sustentam a hipótese de que a morte celular induzida pelas combinações terapêuticas esteja relacionada à interrupção do fluxo autofágico, foi realizada uma análise exploratória com o objetivo de investigar possíveis alterações na dinâmica lisossomal induzidas pelos tratamentos. Para isso, utilizou-se o corante LysoTracker Red DND-99 (Texas Red), um marcador fluorescente vermelho, permeável à membrana plasmática, que se acumula em compartimentos ácidos intracelulares, como os lisossomos. Diferentemente do CYTO-ID, que marca predominantemente autofagossomos e autolisossomos — estruturas diretamente envolvidas na via autofágica —, o

LysoTracker permite a visualização mais ampla do compartimento lisossomal, incluindo lisossomos não diretamente associados à autofagia.

A análise foi conduzida na plataforma multiparamétrica Cytation-5, a mesma utilizada nos experimentos com CYTO-ID. A **Figura 8A** apresenta imagens representativas das condições experimentais avaliadas: controle negativo (células não tratadas), controle positivo com cloroquina (CQ, inibidor tardio do processo autofágico), além dos grupos tratados com 0,6 μ M de oxaliplatina isoladamente ou em combinação com 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe, ou com 400 nM de palbociclibe. As imagens sugerem uma possível tendência de aumento na intensidade do sinal lisossomal nas condições combinadas com os inibidores de CDK4/6, em comparação aos tratamentos isolados, com um sinal visivelmente mais intenso do que o observado nas análises com CYTO-ID.

As **Figuras 8B e 8C** apresentam a quantificação da intensidade média de fluorescência no canal Texas Red, normalizada em relação ao controle negativo. Embora os dados se refiram a um único experimento biológico (N=1), cada condição foi analisada em triplicata técnica (n=3), o que permitiu avaliar a variabilidade intraexperimental. Observou-se uma tendência de aumento da sinalização lisossomal nas combinações terapêuticas, sendo mostrado de forma significativa as combinações envolvendo abemaciclibe. Além disso, foi detectado um desvio padrão elevado entre os poços de uma mesma condição experimental, indicando variações técnicas que podem ter interferido na robustez da análise.

Esses achados preliminares podem refletir um acúmulo de lisossomos não necessariamente vinculados ao processo autofágico. Entretanto, é necessário também investigar o motivo dessa variabilidade intraexperimental. Ensaio adicionais com replicatas biológicas independentes serão essenciais para confirmar essa observação e aprofundar a compreensão do papel do compartimento lisossomal nos efeitos celulares induzidos pelas combinações terapêuticas.

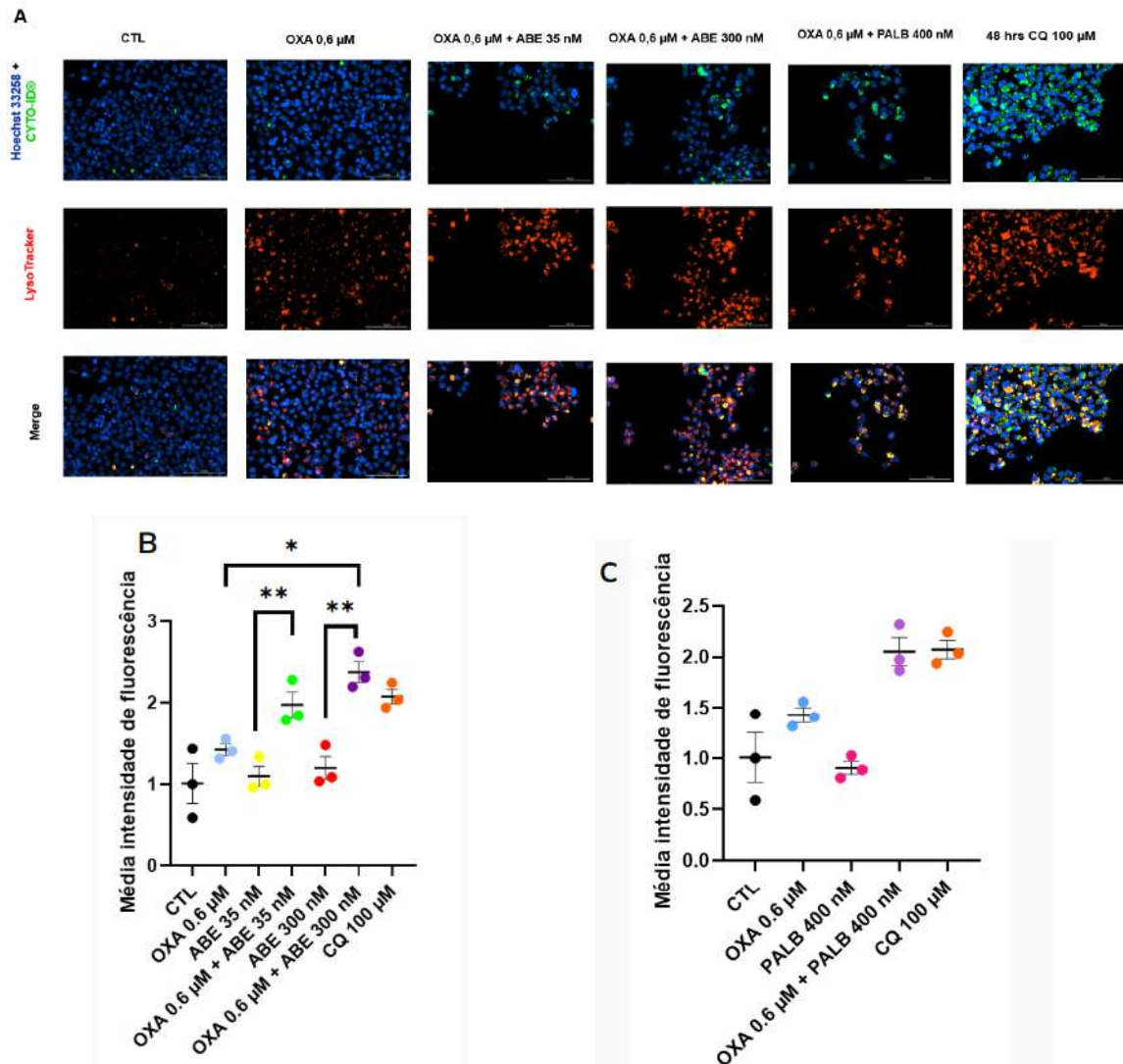


Figura 8. Avaliação exploratória da dinâmica lisossomal em HCT116 tratadas com oxaliplatina e inibidores de CDK4/6 (LysoTracker, N=1). (A) Imagens representativas obtidas na plataforma Cytation-5 com objetiva de 20X, referentes às diferentes condições experimentais. Os núcleos celulares foram corados com Hoechst 33342 (azul); os autofagossomos/autolisossomos, com o corante CYTO-ID (verde brilhante); e os lisossomos, com LysoTracker Red DND-99 (Texas Red, vermelho). Barra de escala: 100 μ m. As células (5×10^3 por poço) foram tratadas por 48 horas com 100 μ M de cloroquina (controle positivo), 0,6 μ M de oxaliplatina (isoladamente ou em combinação com 400 nM de palbociclibe, 35 nM ou 300 nM de abemaciclibe). (B-C) Intensidade média de fluorescência no canal Texas Red, marcando lisossomos com LysoTracker, normalizada em relação ao grupo controle negativo. (B) Condições com abemaciclibe e seus respectivos controles. (C) Condições com palbociclibe e seus respectivos controles. O experimento representa um único ensaio biológico (N = 1), com triplicatas técnicas por condição (n = 3 poços). Cada ponto representa uma replicata experimental. Foi observada diferença significativa entre o grupo tratado com cloroquina e as demais condições.

6. DISCUSSÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais incidente e a segunda principal causa de mortalidade por câncer no mundo, atrás apenas do câncer de pulmão (WHO, 2023). Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas, com estimativas indicando que, até 2030, haverá um aumento global de 60% nos casos de CCR, atingindo 2,2 milhões de novos casos e um milhão de mortes anuais (DOUAIHER et al., 2017). A taxa geral de sobrevida em cinco anos é de aproximadamente 60% a 65%; entretanto, entre pacientes em estágio IV, essa taxa varia entre 10% e 15%, sendo que cerca de 60% desses pacientes desenvolvem metástases hepáticas (OKI et al., 2018; SIEGEL et al., 2023).

O tratamento do CCR depende do estágio da doença, sendo a ressecção cirúrgica o principal recurso terapêutico nos casos não metastáticos (FADLALLAH et al., 2024). Além disso, modalidades como quimioterapia, radioterapia e terapias-alvo são amplamente utilizadas. A quimioterapia é indicada especialmente em estágios avançados ou na presença de metástases. Entre os quimioterápicos de primeira linha mais utilizados estão a oxaliplatina, o irinotecano e o 5-fluorouracil (5-FU), comumente empregados em esquemas combinados (LOTFOLLAHZADEH et al., 2022). A oxaliplatina, um agente alquilante à base de platina, forma ligações cruzadas com o DNA, promovendo danos citotóxicos que levam à inibição das sínteses de DNA e RNA mensageiro, à parada do ciclo celular e, por fim, à morte celular (DEVANABANDA & KASI, 2022). Contudo, como droga citotóxica, apresenta efeitos adversos frequentes, como toxicidade hematológica, gastrointestinal (diarreia e vômitos) e neuropatia periférica (CASSIDY & MISSET, 2002).

No contexto metastático, o uso combinado de quimioterápicos com anticorpos monoclonais anti-EGFR ou anti-VEGF é prática padrão, resultando em melhora dos desfechos clínicos e aumentando a sobrevida global mediana para 29 a 36 meses em pacientes com tumores RAS selvagem (STINTZING et al., 2016; VENOOK et al., 2017). Ainda assim, mais de 50% dos pacientes evoluem com recidiva, e as opções terapêuticas subsequentes apresentam impacto clínico limitado, sobretudo em portadores de mutações em RAS (André et al., 2013).

A complexidade do tratamento do CCR é agravada pela resistência à terapia, que pode ser intrínseca ou adquirida. Mecanismos como a interferência entre as vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK — fortemente associadas à patogênese do CCR com

mutações em RAS, BRAF e PIK3CA — constituem um dos principais fatores de resistência terapêutica (Senft et al., 2017; Lee et al., 2023).

A resistência à terapia pode surgir dentro de 6 a 12 meses após o início do tratamento. Nesse cenário, estratégias com terapias combinadas têm se mostrado promissoras para superar a resistência (SENFT et al., 2017; FORERO et al., 2018; FORERO-TORRES et al., 2018; SCHETTINI et al., 2018; WAINBERG et al., 2015; GOODWIN et al., 2020; TABERNERO et al., 2016). A combinação de tratamentos permite a inibição sinérgica de múltiplas vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral, com maior segurança e eficácia do que a monoterapia. Essa abordagem pode envolver combinações entre quimioterapia, imunoterapia, radioterapia e agentes direcionados, com o intuito de potencializar a eficácia clínica, reduzir doses e minimizar efeitos adversos.

A proliferação celular descontrolada, característica comum a diversos tumores sólidos, decorre frequentemente de desregulações do ciclo celular e de alterações genéticas em proteínas reguladoras (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). As CDKs (ciclina-dependentes quinases), em especial as CDK4 e CDK6, são alvos terapêuticos relevantes por regularem a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A desregulação dessas enzimas é observada em muitos cânceres, sendo considerada um marcador tumoral (Malumbres, 2014). Eventos oncogênicos frequentemente resultam em ativação dos complexos ciclina D–CDK4/6, promovendo a progressão celular em G1 (Asghar et al., 2015). Com isso, surgiram os inibidores de CDK4/6 (iCDK4/6) como uma nova classe terapêutica (GOEL et al., 2018).

A atividade de CDK4/6 é regulada positivamente pelas ciclinas D (D1, D2, D3) e negativamente pelos inibidores da família INK4, como o p16^{INK4a}. A ativação exacerbada desse eixo é comum em tumores devido à amplificação de ciclinas ou perda de seus inibidores, tornando o complexo ciclina D–CDK4/6 um alvo relevante (Malumbres & Barbacid, 2001; Knudsen & Knudsen, 2008; Knudsen & Witkiewicz et al., 2017; Schettini et al., 2018). Os iCDK4/6 atuam impedindo a fosforilação de Rb, o que leva ao sequestro do fator E2F e ao bloqueio da progressão do ciclo celular (PERNAS et al., 2018; ABRAHAM et al., 2018; JOHNSON et al., 2016).

Palbociclib e Abemaciclib, aprovados pela FDA em 2015 e 2017 para câncer de mama HR-positivo e HER2-negativo, atuam reduzindo a fosforilação da pRB, provocando parada do ciclo em G1 (PATNAIK et al., 2016; KIM & SCOTT, 2017; TRIPATHY et al.,

2017). Ensaios pré-clínicos demonstraram eficácia desses fármacos isoladamente em modelos de CCR (FRY et al., 2004; TATE et al., 2014) e também em outros tipos tumorais como glioblastoma (MICHAUD et al., 2010; RAUB et al., 2015), pâncreas (CHOU et al., 2018) e esôfago (KOSOVEC et al., 2017). Estudos adicionais mostraram efeitos sinérgicos ao combiná-los com quimioterápicos em modelos de câncer gástrico (WANG et al., 2018), pâncreas (CHOU et al., 2018), sarcoma de Ewing (DOWLESS et al., 2018) e CCR (ZHANG et al., 2017).

Em cerca de 90% dos cânceres, a via ciclina-CDK4/6-Rb-E2F encontra-se desregulada, frequentemente pela superexpressão de ciclina D (Shi et al., 2019). Os componentes canônicos dessa via incluem CDK4, CDK6, CCND1 (ciclina D1), CDKN2A (p16) e RB1, além das proteínas relacionadas p107 e p130 (BURKHART & SAGE, 2008; KNUDSEN & KNUDSEN, 2008; KNUDSEN et al., 2020). O CCR apresenta perfil molecular compatível com sensibilidade a iCDKs, devido à frequência de alterações como perda da função de p16^{INK4a} e amplificação de ciclina D (KNUDSEN & KNUDSEN, 2008; KNUDSEN & WITKIEWICZ et al., 2017). Embora mutações ou perdas em RB1 ocorram em apenas 10%–15% dos casos, a maioria dos tumores de CCR retém RB funcional, elemento essencial para a eficácia dos iCDKs (Otto & Sicinski, 2017). Além disso, alterações em APC e KRAS — comuns no CCR — podem ativar indiretamente a via CDK4/6, mantendo a integridade do ponto de checagem mediado por RB (Armaghany et al., 2012).

A proteína RB regula diversos processos associados à tumorigênese, como diferenciação celular (SKAPEK et al., 2006), senescência, estabilidade genômica (Burkhart & SAGE, 2008) e morte celular (FATTMAN et al., 2001; Chau et al., 2002; DICK & RUBIN, 2013; Delou et al., 2016). Além de controlar a progressão do ciclo celular (JANOSTIACK et al., 2022), a RB também promove a sobrevivência celular pela ativação da autofagia (BIASOLI et al., 2013; DELOU et al., 2016).

A autofagia apresenta papel dual no câncer: atua tanto na supressão quanto na promoção tumoral, dependendo do contexto e estágio da doença (White, 2012). Em tumores estabelecidos, funciona como mecanismo adaptativo de resistência ao estresse, incluindo o induzido por quimioterapia (Singh et al., 2018). A maioria das células tumorais tratadas com quimioterápicos ativa a autofagia como estratégia de sobrevivência. Assim, a inibição da autofagia tem sido proposta como abordagem para sensibilização tumoral (Singh et al., 2018), com estudos mostrando que sua inibição genética ou farmacológica aumenta a eficácia terapêutica (Hu et al., 2012; Kenific & Debnath, 2015).

Nesse contexto, a pRB emerge como um elo funcional entre proliferação celular, autofagia e resistência terapêutica. Evidências de que o silenciamento de RB interrompe o fluxo autofágico induzido por quimioterapia (Biasoli et al., 2013), além do fato de que o RB hiperfosforilado retém atividade antiapoptótica mesmo inativo no controle do ciclo, indicam que a inibição dessa via pode representar uma vulnerabilidade terapêutica. Dessa forma, os iCDK4/6 se mostram promissores ao atuarem simultaneamente na modulação da proliferação e da autofagia.

Nos estudos conduzidos pelo nosso grupo, os iCDKs palbociclibe e abemaciclibe foram avaliados em combinação com quimioterápicos de primeira linha no CCR, incluindo oxaliplatina, 5-FU e SN-38 (metabólito ativo do irinotecano). As combinações demonstraram aumento significativo da citotoxicidade tumoral, com destaque para a oxaliplatina, que apresentou o efeito sinérgico mais expressivo (Souza, 2023). Diante desses achados e dos mecanismos discutidos, este trabalho teve como objetivo investigar se tal sinergismo estaria associado à modulação da autofagia pelas combinações terapêuticas.

Embora os dados do Cyto-ID sugeressem um acúmulo significativo das vesículas autofágicas, os demais resultados obtidos sugerem que a morte celular induzida pela combinação do quimioterápico oxaliplatina com os inibidores de CDK4/6, abemaciclibe e palbociclibe, não está significativamente associada, ao menos nas condições experimentais analisadas, à inibição do processo autofágico. Essa interpretação é sustentada pelo fato de que as análises por Western blot não demonstraram aumentos significativos nos níveis de LC3-II e p62, proteínas cujos acúmulos seriam esperados em caso de inibição da via autofágica. Ademais, em relação a Microscopia Eletrônica de Fluorescência, não foi possível encontrar vesículas associadas ao bloqueio autofágico.

Contudo, os dados obtidos por Western blot apresentaram variabilidade considerável. Em diferentes experimentos, observaram-se resultados divergentes para a razão LC3-II/LC3-I: aumento em um, redução em outro e manutenção dos níveis em um terceiro, resultando em um desvio padrão elevado que comprometeu a significância estatística da análise. Adicionalmente, considerando que a oxaliplatina é descrita na literatura como indutora de autofagia (DELOU et al., 2016; YAN et al., 2019), era esperado um padrão de redução nos níveis de p62 nessa condição, o que não foi observado, reforçando a limitação e baixa confiabilidade dos dados obtidos.

Dessa forma, embora os achados atuais não fornecendo evidências consistentes de bloqueio do fluxo autofágico pelas combinações testadas, a ausência de significância estatística, aliada à alta variabilidade observada — especialmente na razão LC3-II/LC3-I —, limita a possibilidade de interpretações conclusivas. Ressalta-se ainda que o Western blot é uma técnica suscetível a variações experimentais, o que reforça a necessidade de cautela na análise dos resultados. Com a quantidade atual de experimentos, não é possível descartar completamente a ocorrência de alterações no processo autofágico, o que indica a necessidade de estudos adicionais que aumentem a robustez e reprodutibilidade dos dados, bem como estratégias para minimizar a variabilidade observada. Uma das propostas consideradas é a troca diária do meio de cultivo durante as 48 horas de tratamento, com reposição das combinações terapêuticas, visando reduzir o estresse celular e, consequentemente, evitar a ativação da autofagia em grupos controle por depleção de nutrientes.

Adicionalmente, vale destacar que, em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo (SOUZA, 2023), utilizando as mesmas condições de tratamento (abemaciclibe a 35 nM e palbociclibe a 400 nM), observou-se que a redução da fosforilação de RB induzida por abemaciclibe parecia interromper o fluxo autofágico estimulado pela oxaliplatina em células HCT116 de câncer colorretal, o que poderia ter contribuído para a indução de morte celular. Tal conclusão foi baseada no aumento significativo da fluorescência com o corante Cyto-ID — cerca de 2,5 vezes em relação ao uso de oxaliplatina isolada e 5,5 vezes em relação ao abemaciclibe isolado — resultado que contrasta com os dados obtidos no presente estudo. Essa discrepância reforça a necessidade de investigação aprofundada para elucidar as possíveis causas dessas diferenças. Observou-se, por exemplo, que a média de intensidade de fluorescência da cloroquina no experimento anterior (SOUZA, 2023) foi aproximadamente dez vezes maior que a registrada nos experimentos atuais, o que pode estar relacionado a diferenças no ajuste da intensidade de detecção, bem como ao uso de equipamentos distintos — enquanto no experimento anterior foi utilizado o Cytation 1, no atual utilizou-se o Cytation 5. Com base em trabalhos prévios, como o de Hochecker et al. (2024), o método mais comumente utilizado para quantificação do sinal de CYTO-ID® no sistema Cytation é por meio do parâmetro “count spot”, que permite a identificação e contagem de estruturas puntiformes associadas a autofagossomos. No entanto, como essa funcionalidade não estava disponível na versão do software utilizada, a análise foi adaptada utilizando a média da intensidade de fluorescência por célula no canal CYTO-ID, bem como a área de fluorescência por célula, com o objetivo de avaliar se os dados sustentariam a continuidade dessa linha de investigação.

Apesar da necessidade de experimentos adicionais para confirmar se a ausência de significância estatística decorre da variabilidade experimental, os dados preliminares sugerem a importância de expandir a investigação para além da via autofágica. Outras vias moleculares podem estar envolvidas na sinergia observada com as combinações terapêuticas testadas. A identificação de mecanismos alternativos ou complementares modulados pelos tratamentos poderá contribuir para uma compreensão mais abrangente da citotoxicidade induzida e fornecer novas perspectivas sobre os alvos celulares impactados por essas combinações.

Estudos identificaram um fármaco, AT7519, com potencial de atividade antitumoral, que atua diretamente sobre CDKs para interromper o ciclo celular nas fases G1 e G2 e inibir a proliferação de células de glioblastoma (GBM); induzindo apoptose pela via intrínseca, bem como piroptose por meio da ativação de GSDME mediada por caspase-3 (Zhao et al., 2023). A apoptose e a piroptose têm sido reconhecidas como mecanismos importantes de morte induzida por quimioterápicos (Jaaks et al., 2022; Carneiro & El-Deiry, 2020; Hsu et al., 2021; Yu et al., 2019).

A piroptose é uma forma de morte celular lítica pró-inflamatória, caracterizada pela formação de poros na membrana plasmática mediados por proteínas da família gasdermina, resultando em inchaço celular e liberação de conteúdo intracelular (Broz; Pelegrín; Shao, 2020; Zhao et al., 2023). A ativação de GSDME pela caspase-3 pode levar à piroptose robusta em células tumorais (Zhang et al., 2020; Wang et al., 2017; Yu et al., 2019). Assim, análises adicionais específicas para clivagem de GSDME e liberação de marcadores inflamatórios são necessárias para avaliar a possível contribuição dessa via.

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo ordenado caracterizado por alterações morfológicas como encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Bioquimicamente, envolve a ativação de caspases — proteases cisteínicas que clivam resíduos aspárticos — responsáveis pela execução final da morte celular (Saelens et al., 2004; Xu et al., 2015). A ativação das caspases pode ocorrer por três vias principais: intrínseca mitocondrial, intrínseca do retículo endoplasmático e extrínseca. A via mitocondrial é ativada por estressores como toxinas, hipóxia ou radiação, levando à liberação de citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas no citosol, com formação do apoptossomo (Apaf-1, citocromo c e caspase-9), e inibição dos IAPs por SMAC/DIABLO e Ht-A2/Omi, regulados pela família BCL-2 (Kroemer et al., 2007; Hassan

et al., 2014). Já a via do retículo endoplasmático é ativada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas e falha na resposta de proteína desenovelada (RPU), podendo culminar em apoptose. A via extrínseca, por sua vez, é desencadeada pela ligação de ligantes de morte (como FasL, TNF e TRAIL) a seus respectivos receptores, ativando proteínas adaptadoras como FADD e TRADD e iniciando a cascata de caspases (Goldar et al., 2015; Liu et al., 2017; Shlyakhtina et al., 2017).

Para os cânceres que não sucumbem à morte celular por apoptose, uma forma alternativa de morte celular, a morte celular autofágica, foi sugerida. Esse tipo de morte celular devido ao excesso de autofagia é independente de caspase e é distinto da apoptose (Levine & Yuan, 2005). No entanto, com base nos dados obtidos por Western Blot, também não seriam observadas alterações compatíveis com indução significativa de morte celular mediada por autofagia nas condições testadas.

Evidências acumuladas indicam que as CDKs 4 e 6 fosforilam diretamente diversas proteínas, possivelmente dezenas ou até centenas, expandindo seu papel além da regulação do ciclo celular mediada por pRB (Jirawatnotai et al., 2014; Anders et al., 2011). Dessa forma, a inibição de CDK4/6 pode impactar a biologia tumoral por mecanismos independentes de RB. Entre os alvos já identificados, destacam-se o fator de transcrição FOXM1 (Anders et al., 2011); enzimas-chave do metabolismo, como a 6-fosfofrutoquinase e a piruvato quinase M2 (Wang et al., 2017); a proteína de sinalização IRS2 (Lagarrigue et al., 2016); a deubiquitinase DUB3 (Liu et al., 2017); e o adaptador da ubiquitina ligase SPOP (Zhang et al., 2018). Ademais, a inibição de CDK4/6 pode afetar vias de sinalização críticas para o crescimento e a sobrevivência celular, como a via PI3K-AKT-mTOR. Essa via, quando ativada, promove o aumento da expressão de ciclina D1 e a ativação do mTORC1, favorecendo a progressão tumoral (Goel et al., 2018). A inibição de CDK4 também tem sido associada à disfunção lisossomal, resultando no acúmulo de material não degradado e indução de senescência celular (Martinez-Carreres et al., 2019).

Apesar de exploratórios, os dados obtidos com LysoTracker poderiam sugerir uma possível tendência de alteração na dinâmica lisossomal nas condições de combinação de oxaliplatina com iCDK4/6, o que poderia indicar acúmulo de lisossomos não associados à autofagia. Novos experimentos com réplicas adicionais são necessários para confirmar essa observação.

No estudo conduzido por Hino et al. (2020), foi demonstrado que tanto o abemaciclibe quanto o palbociclibe apresentam atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares tumorais, sendo o abemaciclibe o mais potente entre os dois. Notavelmente, o abemaciclibe induziu uma forma atípica de morte celular, cujas características morfológicas não se enquadram nos padrões clássicos de apoptose, necroptose, morte celular autofágica ou metuose. As células tratadas não apresentaram condensação de cromatina, fragmentação nuclear nem formação de corpos apoptóticos, indicando um mecanismo de morte celular distinto. Segundo os autores, o tratamento com abemaciclibe levou à formação de lisossomos inchados e à indução de vacúolos contendo restos celulares não digeridos e fragmentos de organelas, sugerindo que esses vacúolos derivam de lisossomos disfuncionais. Esse fenótipo foi descrito como semelhante à metuose — processo caracterizado pela formação de vacúolos citoplasmáticos originados de endossomos via macropinocitose (Overmeyer et al., 2011; Maltese & Overmeyer, 2014, 2015). No entanto, diferentemente da metuose, a dextrana fluorescente internalizada por macropinocitose não co-localizou significativamente com os vacúolos marcados com LAMP1-mCherry induzidos por abemaciclibe, reforçando que se trata de um processo de morte celular distinto (Hino et al., 2020).

Em outro estudo, o tratamento com abemaciclibe também levou ao acúmulo de um grande número de vacúolos no citoplasma, não associado à morte celular relacionada à autofagia (Ozaman, Eskiler & Sekeroglu, 2023). Também foi observado que abemaciclibe induz morte celular em linhagens deficientes em RB, associada a um fenótipo multivacuolar sugestivo de permeabilização lisossomal, o qual pôde ser atenuado por cloroquina. Esse efeito, aparentemente independente da inibição de CDKs, foi reproduzido com CBX4945, um inibidor das quinases caseína e DYRK/HIPK, sugerindo efeitos off-target do abemaciclibe (Knudsen et al., 2017). Além disso, o abemaciclibe inibe outras quinases, como CDK9 e PIM1, embora com menor potência (Gelbert et al., 2014).

Os efeitos antitumorais do palbociclib também podem envolver mecanismos adicionais. Zhang et al. (2017) mostraram que o fármaco desestabiliza o fator HIF-1 α em células de câncer colorretal, tanto em condições normóxicas quanto hipóxicas, promovendo apoptose mesmo na ausência de hipóxia. O tratamento com palbociclib também induziu a ativação das vias ERK1/2 e modulou negativamente a forma fosforilada inibitória da GSK-3, o que pode contribuir para o aumento da morte celular observada.

Em conjunto, os dados apresentados não fornecem evidências consistentes de que o aumento da citotoxicidade observado com a combinação de oxaliplatina e inibidores de

CDK4/6 esteja associado à inibição do fluxo autofágico. No entanto, devido à variabilidade experimental e à ausência de significância estatística em algumas análises, não é possível excluir completamente a participação da via autofágica nesse contexto. Diante disso, os achados reforçam a importância de aprofundar a investigação sobre os mecanismos envolvidos na resposta celular às combinações terapêuticas testadas. É plausível que outras vias de morte celular ou alterações funcionais relacionadas à sinalização celular estejam sendo moduladas, incluindo processos como disfunção lisossomal, morte celular não canônica, e até mesmo efeitos off-target dos inibidores de CDK4/6. Considerando também as funções pleiotrópicas das CDKs para além do controle do ciclo celular, uma abordagem mais integrativa será essencial para elucidar os eventos moleculares que contribuem para a citotoxicidade induzida. Estudos adicionais poderão ampliar a compreensão sobre as interações entre essas vias e revelar novos alvos terapêuticos relevantes no contexto do câncer colorretal.

7. CONCLUSÃO

Este estudo investigou a possível participação da autofagia na morte celular induzida pela combinação do quimioterápico oxaliplatina com os inibidores de CDK4/6, palbociclib e abemaciclib, em células tumorais de câncer colorretal. Os resultados obtidos não indicaram associação clara entre a citotoxicidade observada e a interrupção do fluxo autofágico, uma vez que não foram detectados acúmulo de vacúolos autofágicos nem alterações significativas nos níveis de LC3-II, p62 ou beclina-1 nas condições analisadas.

Diante disso, os achados sugerem a necessidade de ampliar a investigação para além da via autofágica, considerando que outros processos celulares podem estar contribuindo para a resposta observada. Ainda que os dados atuais não sustentem um papel central da inibição da autofagia, não é possível descartar completamente sua participação, especialmente diante das limitações técnicas e da variabilidade experimental. Estudos futuros serão fundamentais para esclarecer os mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida por essas combinações terapêuticas, bem como para explorar outras vias potencialmente moduladas pelos inibidores de CDK4/6, contribuindo para uma compreensão mais abrangente de seus efeitos celulares no contexto do câncer colorretal.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. et al. Use of cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitors for hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, metastatic breast cancer: a roundtable discussion by The Breast Cancer Therapy Expert Group (BCTEG). *Breast Cancer Res Treat.*, v. 171, n. 1, p. 11–20, 2018.

AHMED, D.; EIDE, P. W.; EILERTSEN, I. A.; DANIELSEN, S. A.; EKNÆS, M.; HEKTOEN, M.; LIND, G. E.; LOTHE, R. A. Epigenetic and Genetic Features of 24 Colon Cancer Cell Lines. *Oncogenesis*, v. 2, n. 9, e71, 2013. doi: 10.1038/oncsis.2013.35.

AITA, V. M. et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, v. 59, n. 1, p. 59–65, 1999.

ALVES, T. R., LIMA, F. R. S., KAHN, S. A., LOBO, D., DUBOIS, L. G. F., SOLETTI, R., NETO, V. M. (2011). Glioblastoma cells: A heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sciences*, 89(15-16), 532–539. doi:10.1016/j.lfs.2011.04.022.

AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation*, v. 9, p. 367–393, 2002.

ANDERS, L. et al. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell*, v. 20, n. 5, p. 620–634, 2011.

ANDRE, T. An overview of adjuvant systemic chemotherapy for colon cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, v. 4, n. 1, p. 22–28, 2004.

ANDRÉ, T. et al. Panitumumab combined with irinotecan for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Annals of Oncology*, v. 24, n. 2, p. 412–419, 2013. DOI: 10.1093/annonc/mds465.

ARMAGHANY, T. et al. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*, v. 5, p. 19-27, 10 jan. 2012.

ASGHAR, U.; WITKIEWICZ, A. K.; TURNER, N. C.; KNUDSEN, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, p. 130–146, 2015.

BIASOLI, D.; KAHN, S.A.; CORNELIO, T.A.; FURTADO, M.; CAMPANATI, L.; CHNEIWEISS, H.; MOURA-NETO, V.; BORGES, H.L. Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. *Cell Death & Disease*, v. 4, n. 8, p. e767, 15 ago. 2013.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science*, v. 235, n. 4786, p. 305-311, jan. 1987. DOI: 10.1126/science.3541204.

BORGES, H.L.; BIRD, J.; WASSON, K.; CARDIFF, R.D.; VARKI, N.; ECKMANN, L.; WANG, J.Y.J. Tumor promotion by caspase-resistant retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 43, p. 15587–15592, 25 out. 2005.

BORGES, H. L.; HUNTON, I. C.; WANG, J. Y. J. Reduction of apoptosis in Rb-deficient embryos via Abl knockout. *Oncogene*, v. 26, n. 26, p. 3868–3877. 31 maio, 2007.

BROZ, P.; PELEGRÍN, P.; SHAO, F. The Gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 3, p. 143–157, 2020. DOI: 10.1038/s41577-019-0228-2.

BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, v. 8, p. 671-682, set. 2008. DOI: 10.1038/nrc2399.

CAO, Y.; KLIONSKY, D. J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Research*, v. 17, n. 10, p. 839-849, 2007.

CARDOSO, A. L.; FERNANDES, A.; AGUILAR-PIMENTEL, J. A.; HRABĚ DE ANGELIS, M.; GUEDES, J. R.; BRITO, M. A.; ORTOLANO, S.; PANI, G.; ATHANASOPOULOU, S.; GONOS, E. S.; SCHOSSERER, M.; GRILLARI, J.; PETERSON, P.; GUVENC TUNA, B.; DOGAN, S.; MEYER, A.; VAN OS, R.; TRENDENBURG, A.-U. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, v. 47, p. 214-277, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.arr.2018.07.004. Epub 2018 Jul 30.

CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 17, p. 395–417, 2020.

CASSIDY, J.; MISSET, J.-L. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Seminars in oncology*, v. 29, n. 5 Suppl 15, p. 11–20, oct. 2002.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

CERAMI, Ethan et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*, v. 2, p. 401-404, 2012. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.

CHAU, B. N.; WANG, J. Y. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 2, p. 130-138, fev. 2003. DOI: 10.1038/nrc993.

CHAU, B.B.; BORGES, H.L.; CHEN, T.; MASSELLI, A.; HUNTON, I.C.; WANG, J.Y.J. Signal-dependent protection from apoptosis in mice expressing caspase-resistant Rb. *Nature Cell Biology*, v. 4, n. 10, p. 757–765, out. 2002.

CHEN, Y. et al. Autophagy is a regulator of TRAIL-induced apoptosis in NSCLC A549 cells. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 11, n. 3, p. 219-226, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-016-0364-4>.

CHITTARANJAN, Suganthi; BORTNIK, Svetlana; DRAGOWSKA, Wieslawa; XU, Jing; ABEYSUNDARA, Namal; LEUNG, Amy; GO, Nancy; DEVORKIN, Lindsay; WEPPLER, Sherry; GELMON, Karen; YAPP, Donald; BALLY, Marcel; GORSKI, Sharon. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 20, 10 abr. 2014. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2060.

CHOI, A. M.; RYTER, S. W.; LEVINE, B. Autophagy in human health and disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 368, n. 7, p. 651–662, 2013.

CHOU, A. et al. Tailored first-line and second-line CDK4-targeting treatment combinations in mouse models of pancreatic cancer. *Gut*, v. 67, n. 12, p. 2142–2155, dec. 2018.

CICENAS, J.; VALIUS, M. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 137, p. 1409–1418, 2011.

COLLARD, T. J. et al. The retinoblastoma protein (Rb) as an anti-apoptotic factor: expression of Rb is required for the anti-apoptotic function of BAG-1 protein in colorectal tumour cells. *Cell death & disease*, v. 3, n. 10, p. e408, 11 out. 2012.

CUERVO, A. M. Autophagy, sickness and in health. *Trends in Cell Biology*, v. 14, p. 70–77, 2004.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, v. 10, n. 1, p. 51–64, 2006.

DELOU, J. M. A.; BIASOLI, D.; BORGES, H. L. The complex link between apoptosis and autophagy: a promising new role for RB. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, n. 4, p. 2257–2275, dez. 2016.

DELOU, J. M. A.; SOUZA, A. S. O.; SOUZA, L. C. M.; BORGES, H. L. Highlights in resistance mechanism pathways for combination therapy. *Cells*, v. 8, n.9, p. 1013, set. 2019.

DEVANABANDA, B.; KASI, A. Oxaliplatin. Em: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

DICK, F. A. et al. Non-canonical functions of the RB protein in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, n. 7, p. 442–451, jul. 2018. Disponível em: <https://vertexaisearch.cloud.google.com/grounding-api-redirect/AUZIYQEhx2IhMuMfWIRo yMKusycRUvYOHaxSo7LzNW3kRd6M5n2ElkXH64uaUfp-etINWwgXrivVCV4ZwIGzirH0g5Ro3RJi68xNoiAiUYOH4TgYMrRXtBwBmcuP4fVDwhhtTYBviwer>. Acesso em: 18 jun. 2025.

DICK, F. A.; RUBIN, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 14, n. 5, p. 297–306, may 2013.

DOUAIHER, J.; RAVIPATI, A.; GRAMS, B.; CHOWDHURY, S.; ALATISE, O.; ARE, C. Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. *Journal of Surgical Oncology*, v. 115, n. 5, p. 619–630, 2017. DOI: 10.1002/jso.24578.

DOWLESS, M. et al. Abemaciclib Is Active in Preclinical Models of Ewing Sarcoma via Multipronged Regulation of Cell Cycle, DNA Methylation, and Interferon Pathway Signaling. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 24, n. 23, p. 6028–6039, dec. 2018.

DUKELOW, T.; KISHAN, D.; KHASRAW, M.; MURPHY, C. G. CDK4/6 inhibitors in breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*, v. 26, n. 8, p. 797-806, set. 2015. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000249.

FADLALLAH, H. et al. Colorectal cancer: Recent advances in management and treatment. *World Journal of Clinical Oncology*, [S.l.], v. 15, n. 9, p. 1136–1156, 2024. DOI: FORERO, A. et al. Abstract OT2-07-06: phase Ib study to assess the safety, tolerability, and clinical activity of gedatolisib in combination with palbociclib and either letrozole or fulvestrant in women with metastatic or locally advanced/recurrent breast cancer (B2151009). *Cancer Research*, v. 78, n. 4_Supplement, p. OT2-07-06-OT2-07-06, 2018. doi:10.1158/1538-7445.SABCS17-OT2-07-06.

FATTMAN, C. L. et al. Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase-3/-7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*, v. 20, p. 2918-2926, 04 may 2001.

FORERO-TORRES, A. et al. Phase Ib study of gedatolisib in combination with palbociclib and endocrine therapy (ET) in women with estrogen receptor (ER) positive (+) metastatic breast cancer (MBC) (B2151009). *J Clin Oncol.*, v. 36, n. 15_suppl, p. 1040–1040, 2018. doi:10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.1040. <https://doi.org/10.5306/wjco.v15.i9.1136>. Acesso em: 15 jun. 2025.

FRIEND, S. H.; BERNARDS, R.; ROGELJ, S.; WEINBERG, R. A.; RAPAPORT, J. M.; ALBERT, D. M.; DRYJA, T. P. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, v. 323, n. 6089, p. 643–646, out. 1986.

FRY, D. W. et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapy*, v. 3, n.11, p. 1427-38, nov. 2004.

GARBAR, C.; CURÉ, H.; VASSALLO, J.; GUENEL, A.; PÉTRÉ, J.; MERIGUET, J.; FOULETIER, A.; GUENEL, A.; GOSSET, P.; GALANT, C.; PAULE, B. Chemotherapy treatment induces an increase of autophagy in the luminal breast cancer cell MCF7, but not in the triple-negative MDA-MB231. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 7201, 3 ago. 2017.

GALLUZZI, L.; GREEN, D. R.; RUBINSZTEIN, D. C.; DIXON, S. J.; KROEMER, G. Definições moleculares de autofagia e processos relacionados. *EMBO Journal*, v. 36, p. 1811–1836, 2017.

GELBERT, L. M. et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs*, v. 32, p. 825–837, 2014.

GOEL, S.; DECRISTO, M. J.; MCALLISTER, S. S.; ZHAO, J. J. CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 11, p. 911–925, nov. 2018.

GOODWIN, R. et al. A phase Ib study of a PI3Kinase inhibitor BKM120 in combination with panitumumab in patients with KRAS wild-type advanced colorectal cancer. *Invest New Drugs*, v. 38, n. 4, p. 1077–1084, 2020. doi:10.1007/s10637-019-00814-3.

GOLDAR, S., KHANIANI, M.S., DERAKHSHAN, S.M. and BARADARN, B., 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 16, no. 6, pp. 2129-2144. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2129>.

GONG, X.; DUFFY, S. L.; ZHAO, H.; WU, C.; KUCZYNSKI, B. W.; REED, S. E.; SAHIN, A.; SHEHAB, H.; SHEN, Y. Genomic aberrations that activate D-type cyclins are associated with enhanced sensitivity to the CDK4 and CDK6 inhibitor abemaciclib. *Cancer Cell*, v. 32, n. 6, p. 761-776.e6, dez. 2017. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.11.006.

GOPE, R.; GOPE, M. L. Abundance and state of phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in human colon cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 110, p. 123-133, 1992.

GOPE, M. L.; CHUN, M.; GOPE, R. Comparative study of the expression Rb and p53 genes in human colorectal cancers, color carcinoma cell lines and synchronized human fibroblast. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 110, p. 101, 1992. DOI: 10.1007/BF02385011.

GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 5, n. 5, p. 402–418, 2015.

GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.3967>.

GUO, J. Y. et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Development*, v. 25, n. 5, p. 460–470, 2011.

HARPER, J. W.; ADAMI, G. R.; WEI, N.; KEYOMARSI, K.; ELLEDGE, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, v. 75, n. 4, p. 805–816, 19 nov. 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90499-g.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, jan. 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

HAN, J.; SOLETTI, R. C.; SADARANGANI, A.; SRIDEVI, P.; RAMIREZ, M. E.; ECKMANN, L.; BORGES, H. L.; WANG, J. Y. Nuclear expression of β -catenin promotes RB stability and resistance to TNF-induced apoptosis in colon cancer cells. *Molecular Cancer Research*, v. 11, n. 3, p. 207–218, mar. 2013.

HCS PHARMA. What is high content screening (HCS)? Disponível em: <https://hcs-pharma.com/what-is-high-content-screening-hcs/>. Acesso em: 22 nov. 2024.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, v. 43, p. 67–93, 2009. DOI: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.

HINO, H.; IRIYAMA, N.; KOKUBA, H. et al. Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes. *Cancer Science*, v. 111, p. 2132–2145, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cas.14419>. Acesso em: 10 jun. 2025.

HO, C. J.; GORSKI, S. M. Molecular mechanisms underlying autophagy-mediated treatment resistance in cancer. *Cancers*, v. 11, n. 11, 11 nov. 2019.

HOCHECKER, B. et al. Quantification of autophagosomes in human fibroblasts using Cyto-ID® staining and Cytation imaging. *Bio-protocol*, [S.l.], v. 14, n. 13, e5025, 5 jul. 2024. DOI: 10.21769/BioProtoc.5025. PMID: 39011370; PMCID: PMC11247374.

HOU, W.; ZHANG, Q.; YAN, Z.; CHEN, R.; ZEH III, H. J.; KANG, R.; LOTZE, M. T.; TANG, D. Autophagic release of HMGB1 from cancer cells modulates anticancer immunity. *Cell Death and Disease*, [S.l.], v. 4, e966, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.493>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/cddis2013493>. Acesso em: 8 maio 2025.

HSU, S. K. et al. Inflammation-related pyroptosis, a novel programmed cell death pathway, and its crosstalk with immune therapy in cancer treatment. *Theranostics*, v. 11, p. 8813–8835, 2021.

INDOVINA, P.; MARIGGIÒ, M. A.; SANTORO, R.; TARTAGLIA, N.; RANUCCI, L.; TANNOCK, I. F. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*, v. 6, n. 20, p. 17873–17890, 20 jul. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2021b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 17 out. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Ensino, Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica, Área de Edição e Produção de Materiais Técnico-Científicos, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 16 out. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. O que é câncer? Ministério da Saúde, 14 jul. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 15 out. 2024.

JAAKS, P. et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature*, v. 603, p. 166–173, 2022.

JANOSTIAK, R.; TORRES-SANCHEZ, A.; POSAS, F.; DE NADAL, E. Understanding Retinoblastoma Post-Translational Regulation for the Design of Targeted Cancer Therapies. *Cancers*, v. 14, n. 5, 28 fev. 2022.

JIRAWATNOTAI, S. et al. The cyclin D1–CDK4 oncogenic interactome enables identification of potential novel oncogenes and clinical prognosis. *Cell Cycle*, v. 13, n. 18, p. 2889–2900, 2014.

JOHNSON, J. et al. Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*, v. 35, n. 37, p. 4829–4835, 2016.

JOST, T. et al. Palbociclib Induces Senescence in Melanoma and Breast Cancer Cells and Leads to Additive Growth Arrest in Combination With Irradiation. *Frontiers in Oncology*, v. 11, p. 740002, 2021.

KENIFIC, C. M.; DEBNATH, J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. *Trends in Cell Biology*, v. 25, p. 37–45, 2015.

KIM, E. S.; SCOTT, L. J. Palbociclib: A Review in HR-Positive, HER2-Negative, Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Targeted Oncology*, v. 12, p. 373-383, 9 may. 2017.

KIMMELMAN, A. C. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes & Development*, v. 25, p. 1999–2010, 2011.

KLIONSKY, D. J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*, 14 jul. 2020.

KOLUPAEVA, V.; DAEMPFLING, L.; BASILICO, C. The B55alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A mediates fibroblast growth factor-induced p107 dephosphorylation and growth arrest in chondrocytes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 33, p. 2865–2878, 2013.

KOSOVEC, J. E. et al. CDK4/6 dual inhibitor abemaciclib demonstrates compelling preclinical activity against esophageal adenocarcinoma: a novel therapeutic option for a deadly disease. *Oncotarget*, v. 8, n.59, p. 100421-100432, 1 nov. 2017.

KNUDSEN, E. S.; WITKIEWICZ, A. K. The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. *Trends in Cancer*, v. 3, n. 1, p. 39–55, jan. 2017.

KNUDSEN, E. S.; KNUDSEN, K. E. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. *Nature Reviews Cancer*, v. 8, n. 9, p. 714-724, set. 2008.

KOUSTAS, E.; SARANTIS, P.; KYRIAKOPOULOU, G.; PAPAVALASSILIOU, A. G.; KARAMOOUZIS, M. V. The interplay of autophagy and tumor microenvironment in colorectal cancer—ways of enhancing immunotherapy action. *Cancers*, v. 11, p. 533, 2019.

LAGARRIGUE, S. et al. CDK4 is an essential insulin effector in adipocytes. *Journal of Clinical Investigation*, v. 126, n. 1, p. 335–348, 2016

LEE, C. L. et al. Preclinical evaluation of the CDK4/6 inhibitor palbociclib in combination with a PI3K or MEK inhibitor in colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, v. 24, n. 1, p. 2223388, 2023. DOI: 10.1080/15384047.2023.2223388.

LEVINE, B. Unraveling the role of autophagy in cancer. *Autophagy*, v. 2, n. 2, p. 65-66, 2006.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p. 2679–2688, 2005.

LIMA, F. R. S.; KAHN, S. A.; SOLETTI, R. C.; BIASOLI, D.; ALVES, T.; DA FONSECA, A. C. C.; GARCIA, C.; ROMÃO, L.; BRITO, J.; HOLANDA-AFONSO, R.; FARIA, J.; BORGES, H.; MOURA-NETO, V. Glioblastoma: Therapeutic Challenges, What Lies Ahead. *Biomarkers in Cancer*, v. 4, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.05.004.

LIANG, X. H. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, v. 402, n. 6762, p. 672–676, 1999.

LIU, E. Y.; RYAN, K. M. Autophagy and cancer – issues we need to digest. *Journal of Cell Science*, v. 125, p. 2349–2358, 2012.

LIU, H., SU, D., ZHANG, J., GE, S., LI, Y., WANG, F., GRAVEL, M., ROULSTON, A., SONG, Q., XU, W., LIANG, J.G., SHORE, G., WANG, X. and LIANG, P., 2017. Improvement of pharmacokinetic profile of TRAIL via trimer-tage enhances its antitumor

activity in vivo. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 8953. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09518-1>.

LIU, T. et al. CDK4/6-dependent activation of DUB3 regulates cancer metastasis through SNAIL1. *Nature Communications*, v. 8, p. 13923, 2017.

LIU, X. et al. Knockdown of retinoblastoma protein may sensitize glioma cells to cisplatin through inhibition of autophagy. *Neuroscience Letters*, v. 620, p. 137–142, 4 maio 2016.

LOCK, R. et al. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular Biology of the Cell*, v. 22, n. 2, p. 165–178, 2011.

LOCK, R.; KENIFIC, C. M.; LEIDAL, A. M.; SALAS, E.; DEBNATH, J. Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discovery*, v. 4, n. 4, p. 466–479, 2014

LOTFOLLAHZADEH, S.; RECIO-BOILES, A.; CAGIR, B. *Colon Cancer*. Em: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, v. 114, n. 2, p. 97–109, ago. 2007.

LYNCE, F.; SHAJAHAN-HAQ, A. N.; SWAIN, S. M. CDK4/6 inhibitors in breast cancer therapy: Current practice and future opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 191, p. 65–73, nov. 2018.

MALTESE, W. A.; OVERMEYER, J. H. Non-apoptotic cell death associated with perturbations of macropinocytosis. *Frontiers in Physiology*, v. 6, p. 38, 2015.

MALUMBRE, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p. 153-166, abr. 2009. DOI: 10.1038/nrc2602.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 1, p. 222–231, 2001.

MARTÍNEZ-CARRERES, L. et al. CDK4 regulates lysosomal function and mTORC1 activation to promote cancer cell survival. *Cancer research*, v. 79, n. 20, p. 5245–5259, 2019.

MARUYAMA, Y. et al. LC3B is indispensable for selective autophagy of p62 but not basal autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 446, n. 1, p. 309-315, 2014.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, v. 432, n. 7015, p. 298-306, 2004. DOI: 10.1038/nature03094.

MATHEW, R. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*, v. 137, p. 1062–1075, 2009.

MATIKAS, A.; FOUKAKIS, T.; BERGH, J. Tackling endocrine resistance in ER-positive HER2-negative advanced breast cancer: A tale of imprecision medicine. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 114, p. 91-101, jun. 2017. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.04.002.

MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; DE BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 1, p. 74–88, jan. 2022.

MCLAENDON, R.; FRIEDMAN, A.; BIGNER, D.; VAN MEIR, E. G.; BRAT, D. J.; MASTROGIANAKIS, G. M.; et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, v. 455, p. 1061–1068, 2008. DOI: 10.1038/nature07385. PMID: 18772890; PMCID: PMC2671642.

MEGÍAS, M. Regulação do ciclo celular. Disponível em: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/ampliacoes/8-regulacion.php>. Acesso em: 15 de outubro de 2024.

MEHRPOUR, M.; BEAU, I.; et al. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, v. 20, p. 748–762, 2010.

MICHAUD, K. et al. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Research*, v. 70, n. 8, p. 3228-38, abr. 2010.

MORRIS, E. J.; JI, J. Y.; YANG, F.; et al. E2F1 represses beta-catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature*, v. 455, n. 7212, p. 552-556, set. 2008. DOI: 10.1038/nature07310. PMID: 18794899; PMCID: PMC3148807.

MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*, v. 121, n. 9, p. 1357–1368, maio de 2015.

MORTEZAVI, A. et al. Negative LC3b immunoreactivity in cancer cells is an independent prognostic predictor of prostate cancer specific death. *Oncotarget*, v. 8, n. 19, p. 31765, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.15986>.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Autophagy is required for proper cysteine homeostasis in pancreatic cancer through regulation of SLC7A11. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 118, p. e2021475118, 2021.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals: a review. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 82, n. e228437, p. 1-10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437>. Acesso em: 19 jun. 2025.

OKI, E. et al. Recent advances in treatment for colorectal liver metastasis. *Annals of gastroenterological surgery*, v. 2, n. 3, p. 167–175, may 2018.

O'LEARY, B.; FINN, R.; TURNER, N. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 13, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.26.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 17, n. 2, p. 93–115, 27 jan. 2017.

OVERMEYER, J. H.; YOUNG, A. M.; BHANOT, H.; MALTESE, W. A. A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. *Molecular Cancer*, v. 10, p. 69, 2011.

OZAMAN, Zeyep; ESKILER, Gamze Guney; SEKER OGLU, Mehmet R. In vitro therapeutic effects of abemaciclib on triple-negative breast cancer cells. *Journal of Biomedical Technology*, Wiley, 2023. DOI: 10.1002/jbt.22858.

PANDEY, N.; ANASTASIADIS, P.; CARNEY, C. P.; KANVINDE, P. P.; WOODWORTH, G. F.; WINKLES, J. A.; KIM, A. J. Nanotherapeutic treatment of the invasive glioblastoma tumor microenvironment. *Advances in Drug Delivery Reviews*, v. 188, p. 114415, set. 2022. doi: 10.1016/j.addr.2022.114415. Epub 2022 Jul 3. PMID: 35787387.

PARAMIO, J.; NAVARRO, M.; SEGRELLES, C.; GÓMEZ-CASERO, E.; JORCANO, J. Tumor suppressor PTEN is linked to the cell cycle control through the retinoblastoma protein. *Oncogene*, v. 18, p. 7462-7468, 2000. DOI: 10.1038/sj.onc.1203151.

PATNAIK, A. et al. Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *Cancer Discovery*, v. 6, n. 7, p. 740-53, jul. 2016.

PERNAS, S.; TOLANEY, S. M.; WINER, E. P.; GOEL, S. CDK4/6 inhibition in breast cancer: current practice and future directions. *Ther Adv Med Oncol.*, v. 10, 2018. DOI: 10.1177/1758835918786451.

PERERA, R. M.; ZONCU, R. The lysosome as a regulatory hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 32, p. 223–253, 2016.

POLAGER, S.; GINSBERG, D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends in Cell Biology*, v. 18, n. 11, p. 528-535, nov. 2008. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.08.003.

POLLARD, S. M.; YOSHIKAWA, K.; CLARKE, I. D.; DANOVI, D.; STRICKER, S.; RUSSELL, R.; BAYANI, J.; HEAD, R.; LEE, M.; BERNSTEIN, M. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell*, v. 4, p. 568–580, 2009. [PubMed: 19497285].

POON, M. T. C.; SUDLOW, C. L. M.; FIGUEROA, J. D.; et al. Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, v. 10, p. 11622, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68011-4>.

QU, X. et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 12, p. 1809–1820, 2003.

RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and metabolism. *Science*, v. 330, n. 6009, p. 1344–1348, 2010.

RAUB, T. J. et al. Brain exposure of two selective dual CDK4 and CDK6 inhibitors and the antitumor activity of CDK4 and CDK6 inhibition in combination with temozolomide in a intracranial glioblastoma xenograft. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 43, n. 9, p. 1360-71, 6 jul. 2015.

REN, B.; CAM, H.; TAKAHASHI, Y.; VOLKERT, T.; TERRAGNI, J.; YOUNG, R. A.; DYNLAHCT, B. D. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes & Development*, v. 16, n. 2, p. 245-256, 15 jan. 2002. DOI: 10.1101/gad.949802.

REN, D.; YANG, H.; ZHANG, S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 42, p. 39833-39840, out. 2001. DOI: 10.1074/jbc.M109495200.

RUEFF, J.; RODRIGUES, A. S. Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint. *Methods in Molecular Biology*, v. 1395, p. 1-18, 2016. DOI: 10.1007/978-1-4939-3347-1_1.

SAELEN X., FESTJENS, N., VANDE WALLE, L., VAN GURP, M., VAN LOO, G. and VANDENABEELE, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, vol. 23, no. 16, pp. 2861-74.

SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology*, v. 35, n. 6, p. 461–478, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>.

SCHETTINI, F. et al. CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors. *Frontiers in oncology*, v. 8, p. 608, 2018.

SCHMIDT, E. E.; ICHIMURA, K.; REIFENBERGER, G.; COLLINS, V. P. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Research*, v. 54, n. 24, p. 6321–6324, 1994.

SENFT, D.; LEISERSON, M. D. M.; RUPPIN, E.; RONAI, Z. A. Precision oncology: the road ahead. *Trends Mol Med.*, v. 23, n. 10, p. 874–898, 2017.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, v. 2, n. 2, p. 103–112, ago. 2002.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, v. 13, n. 12, p. 1501-1512, 15 jun. 1999. DOI: 10.1101/gad.13.12.1501.

SHERR, C. J. Cancer Cell Cycles. Science, v. 274, n. 5293, p. 1672–1677, 1996. DOI: 10.1126/science.274.5293.

SHI, C.; WANG, Q.; LIAO, X.; et al. Discovery of 6-(2-(dimethylamino)ethyl)-N-(5-fluoro-4-(4-fluoro-1-isopropyl-2-methyl-1H-benzo[d]imidazole-6-yl)pyrimidin-2-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-1,6-naphthyridin-2-amine as a highly potent cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor for treatment of cancer. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 178, p. 352–364, 2019. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.005.

SHLYAKHTINA, Y., PAVET, V. and GRONEMEYER, H., 2017. Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. Cell Death & Disease, vol. 8, no. 8, pp.e3025. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2017.423>.

SIEGEL, R. L. et al. Colorectal cancer statistics, 2023. CA: a cancer journal for clinicians, v. 73, n. 1, p. 17–48, jan. 2023.

SIMONSEN, A.; TOOZE, S. A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III P13-kinase complexes. J Cell Biol, 186, n. 6, p. 773-782, Sep 21 2009.

SINGH, S. S. et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. Oncogene, v. 37, p. 1142–1158, 2018.

SOLETTI, R. C. et al. Inhibition of pRB Pathway Differentially Modulates Apoptosis in Esophageal Cancer Cells. Translational Oncology, v. 10, n. 5, p. 726–733, out. 2017.

SOCIEDADE AMERICANA DE CÂNCER. Chemotherapy for Colorectal Cancer. American Cancer Society, 29 jun. 2020b. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/chemotherapy.html>. Acesso em: 17 out. 2024.

SOUZA, Alana Silva Oliveira. Avaliação de eficácia das combinações de quimioterápicos de primeira linha com inibidores de cinases dependentes de ciclina (CDK4/6) em linhagens de câncer colorretal in vitro. 2023. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

STINTZING, S. et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final

RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncology*, v. 17, n. 10, p. 1426–1434, 2016. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30269-8.

SULLIVAN, B. A.; NOUJAIM, M.; ROPER, J. Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, v. 32, n. 2, p. 177-194, abr. 2022. DOI: 10.1016/j.giec.2021.12.001.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

TABERNERO, J. et al. Phase 2 results: encorafenib (ENCO) and cetuximab (CETUX) with or without alpelisib (ALP) in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer (BRAFM CRC). *J Clin Oncol.*, v. 34, n. 15_suppl, p. 3544–3544, 2016. doi:10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.3544.

TANIDA, I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 14, n. 11, p. 2201-2214, Jun 2011.

TATE, S. C. et al. Semi-mechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of antitumor activity of LY2835219, a new cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in mice bearing human tumor xenografts. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 14, p. 3763-74, 21 may. 2014.

THANGAVELU, P. U.; LIN, C. Y.; FOROUZ, F.; TANAKA, K.; DRAY, E.; DUIJF, P. H. G. The RB protein: more than a sentry of cell cycle entry. *Trends in Molecular Medicine*, v. 31, p. S1471-4914(25)00086-3, 29 abr. 2025. DOI: 10.1016/j.molmed.2025.04.001. Acesso em: 19 jun. 2025.

TRIPATHY, D.; BARDIA, A.; SELLERS, W. R. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 23, n. 13, p. 3251–3262, 1 jul. 2017.

VALENZUELA, C. A. et al. Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Experimental Cell Research*, v. 360, n. 2, p. 390–396, 15 nov. 2017.

VENOOK, A. P. et al. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical trial. *JAMA*, v. 317, n. 23, p. 2392, 2017. DOI: 10.1001/jama.2017.7105.

VIATOUR, P.; SAGE, J. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Disease Models & Mechanisms*, v. 4, n. 5, p. 581-585, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, S. et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers. *Nature Communications*, v. 8, p. 15916, 27 jun. 2017.

WAINBERG, Z. A. et al. Phase I study of the PI3K/mTOR inhibitor PF-05212384 in combination with other antitumor agents. *J Clin Oncol.*, v. 33, n. 15_suppl, p. 2590–2590, 2015. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.2590.

WANG, D. et al. Antiproliferative effects of the CDK6 inhibitor PD0332991 and its effect on signaling networks in gastric cancer cells. *International journal of molecular medicine*, v. 41, n. 5, p. 2473–2484, may 2018.

WANG, Ran; ZHANG, Qian; PENG, Xin; ZHOU, Chang; ZHONG, Yuxu; CHEN, Xi; QIU, Yuling; JIN, Meihua; GONG, Min; KONG, Dexin. Stelletin B induces G1 arrest, apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer A549 cells via blocking PI3K/Akt/mTOR pathway. *Scientific Reports*, v. 6, p. 27071, 31 maio 2016. DOI: 10.1038/srep27071.

WANG, Y. et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, v. 547, n. 7661, p. 99–103, 2017. DOI: 10.1038/nature22393.

WEIDERPASS, E.; WILD, C. P.; STEWART, B. W. *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. 2020. ISBN 978-92-832-0447-3; ISBN 978-92-832-0448-0.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, v. 81, n. 3, p. 323-330, 5 maio 1995. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90385-2.

WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, p. 401–410, 2012.

WHITE, E. The role for autophagy in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, p. 42–46, 2015.

XU, W., JING, L., WANG, Q., LIN, C.-C., CHEN, X., DIAO, J., LIU, Y. and SUN, X., 2015. Bas-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*, vol. 6, no. 30, pp. 30017-30034. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5013>

YAN, S. et al. PFKFB3 Inhibition Attenuates Oxaliplatin-Induced Autophagy and Enhances Its Cytotoxicity in Colon Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 21, 30 out. 2019.

YANG, C.; ZHOU, Q.; LI, M.; TONG, X.; SUN, J.; QING, Y.; SUN, L.; YANG, X.; HU, X.; JIANG, J.; YAN, X.; HE, L.; WAN, C. Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines. *Nature Scientific Reports*, v. 6, p. 33078, set., 2016.

YANG, Zhineng J.; CHEE, Cheng E.; HUANG, Shengbing; SINICROPE, Frank A. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 10, n. 9, p. 1533-1541, 1 set. 2011. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0047.

YUE, Z. et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 25, p. 15077–15082, 2003.

YU, J. et al. Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells. *Cell Death & Disease*, v. 10, p. 193, 2019.

ZARDAVAS, D.; BASELGA, J.; PICCART, M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 10, n. 4, p. 191-210, abr. 2013. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.29. Epub 2013 Mar 5.

ZHAO, H.; PIWNICA-WORMS, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, p. 4129–4139, 2001.

ZHANG, Jun; ZHOU, Lanlan; ZHAO, Shuai; DICKER, David T.; EL-DEIRY, Wafik S. The CDK4/6 inhibitor palbociclib synergizes with irinotecan to promote colorectal cancer cell

death under hypoxia. *Cell Cycle*, v. 16, n. 12, p. 1193–1200, 2017. DOI: 10.1080/15384101.2017.1320005.

ZHANG, X. et al. Miltirone induces cell death in hepatocellular carcinoma cell through GSDME-dependent pyroptosis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 10, n. 8, p. 1397–1413, 2020. DOI: 10.1016/j.apsb.2020.06.015.

ZHOU, Y.; RUCKER, E. B.; ZHOU, B. P. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, v. 48, n. 1, p. 60-74, 2016.

ZOU, T.; LIN, Z. The involvement of ubiquitination machinery in cell cycle regulation and cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, [S.l.], v. 22, n. 11, p. 5754, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22115754>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5754>. Acesso em: 8 maio 2025.