

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PEDRO VARGAS

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2Y<sub>12</sub> PELO  
CLOPIDOGREL NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE GLIOMA**

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

## Ficha Catalográfica

V297 Vargas, Pedro

Avaliação da Modulação do Receptor Purinérgico P2Y<sub>12</sub> pelo Clopidogrel no crescimento de Células de Glioma / Pedro Vargas . – 2017.

72 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone.

Co-orientadora: Profa. Dra. Angélica Regina Cappellari.

1. sistema purinérgico. 2. glioblastoma multiforme. 3. P2Y<sub>12</sub>. 4. bissulfato de clopidogrel. I. Morrone, Fernanda Bueno. II. Cappellari, Angélica Regina. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia e Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Fernanda Bueno Morrone

Co-Orientadora: Dra. Angélica Regina Cappellari

Aprovada em: 10 de Março de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup>. Márcia Wink- UFCSPA

Prof. Pablo Machado- PUCRS

Dr<sup>a</sup>. Leticia Bergamin- USP

**Porto Alegre**

**2017**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Dra. Fernanda Bueno Morrone, por ter me acolhido como seu orientado de mestrado e ter me confiado a capacidade de desenvolver este que foi um projeto e que agora se torna uma dissertação. Ademais, tenho que agradecer pelos ensinamentos éticos e morais que me foram apresentados durante meu trajeto e por compartilhar seus conhecimentos adquiridos durante sua trajetória.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Angélica Regina Cappellari, por me ensinar tudo que sei sobre as práticas com cultura de células, as análises dos resultados e na formação de um olhar crítico sob a ciência.

Agradeço a minha estimada amiga Dra. Temis Weber Furlanetto Corte, que me acompanhou durante minha trajetória na graduação e na pós-graduação e que me fez ter meus primeiros contatos com a pesquisa e que agora colho os resultados.

Agradeço a meus pais pelo apoio espiritual, financeiro e ético durante minha trajetória de vida, pois sem todo o investimento que me foi feito durante todos estes anos, eu não estaria aqui escrevendo este texto e tampouco os textos futuros que virão.

Agradeço a meus amigos por me escutarem nos momentos bons e ruins, por compartilhar de seus conhecimentos adquiridos durante suas trajetórias.

**Porto Alegre**

**2017**

*“Em meio a escuridão, de alguma forma, eu sobrevivi  
Um amor difícil, eu sabia desde o início  
No fundo, nas profundezas  
Do meu coração rebelde”*

*Madonna*

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina 5' - difosfato

ATP – Adenosina 5' - trifosfato

AATC-Associação Americana de Tumores Cerebrais

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

HGF- Fator de Crescimento de Hepatócitos

GABA- Ácido  $\gamma$ -Amino Butírico

GBM - Glioblastoma Multiforme

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IDH-1/2-Isocitrato Desidrogenase

OMS -Organização Mundial da Saúde

NF-1- Neurofibromatose tipo 1

ENTPDs- Ectonucleotidases

CD73- ecto-5'-nucleotidase

MGMT- O6-metilguanina-DNA metiltransferase

PDGF – Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

PDGFR – Receptor do Fator de Crescimento derivado de Plaquetas

SNC – Sistema Nervoso Central

TCGA- Atlas Genômico do Câncer

TMZ – Temozolomida

VEGFR – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

PLC- Fosfolipase C

GPCRs- Receptores Acoplados a Proteína G

MAPK- Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

ERK- Quinase Regulada por Sinal Extracelular

TGF $\alpha$ - Fator de Crescimento Transformador  $\alpha$

AA- Ácido Araquidônico

cAMP- AMP cíclico

COX-1- Ciclooxigenase-1

CYP-Citocromo

PI3K- Fosfatidilinositol 3-kinase

PLC $\beta$ -Fosfolipase C $\beta$

TR- Receptor de Tromboxano

TxA<sub>2</sub>-Tromboxano A<sub>2</sub>

VASP-P-Fosfoproteína Fosforilada Vaso-dilatadora Estimulada

RT-PRC- Reação em Cadeia da Polimerase Reversa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Mecanismo de Diferenciação Neuronal.....pag. 13
- Figura 2-** Elementos-chave na Sinalização Purinérgica.....pag. 14
- Figura 3-** Representação Estrutural do Receptor P2Y<sub>12</sub>.....pag. 17
- Figura 4-** Mecanismo de Ação do Clopidogrel.....pag. 19
- Figura 5-** Biotransformação do Clopidogrel.....pag. 21



## RESUMO

O glioblastoma multiforme (GBM) é considerado o mais agressivo dos tumores do sistema nervoso central (SNC) e o mais letal entre os tumores primários apresentando baixo prognóstico de sobrevida, resistência à radioterapia e a quimioterapia. O P2Y<sub>12</sub> é considerado um quimiorreceptor para a adenosina difosfato (ADP). Sua expressão é documentada em algumas linhagens de câncer, como a linhagem C6 de glioma de rato, carcinoma renal e carcinoma de cólon. Contudo, seu papel no desenvolvimento da sinalização e resposta à quimioterapia não está bem elucidado. Atualmente, está bem estabelecido que o funcionamento normal das plaquetas é um importante fator para a progressão de tumores, sendo que ratos com trombocitopenia demonstraram uma redução significativa de metástases. O bissulfato de clopidogrel é um fármaco pertencente à classe dos antiagregantes plaquetários, sendo um antagonista do receptor P2Y<sub>12</sub>, cujo ligante endógeno é o ADP. O presente trabalho teve como objetivo averiguar quais os efeitos ocasionados às células de gliomas quando expostas ao clopidogrel. Para isto, foram utilizadas duas linhagens de gliomas, U251-MG de glioma humano e C6 de ratos, e o tratamento com clopidogrel (150, 300, e 500 µM), foi avaliado nos parâmetros de viabilidade celular, contagem de células, RT-PCR e citometria de fluxo. A linhagem de rato C6 mostrou-se sensível ao fármaco testado (150 µM) com redução da viabilidade e contagem celular (69.63±8,70) e (53,05 ± 20.06), respectivamente. Ambas as linhagens apresentaram uma redução significativa no número de colônias após 10 dias tratamento com clopidogrel. A linhagem U251-MG demonstrou um aumento significativo na fase G1 e uma redução significativa na fase S e do ciclo celular (20,32 ± 3.05) e (19.45± 2.35 ) na concentração de 500 µM, porém nos ensaios de viabilidade e contagem não houve diferença significativa. Nossos resultados demonstram atividade antiproliferativa importante em ambas as linhagens tumorais, sugerindo uma participação importante do receptor P2Y<sub>12</sub> neste processo.

Palavras-chave: sistema purinérgico; glioblastoma multiforme; P2Y<sub>12</sub>; bissulfato de clopidogrel

## ABSTRACT

Glioblastoma multiform (GBM) is considered the most aggressive tumors of central nervous system (CNS), and the most lethal among primary tumors presenting low survival prognosis, resistance to radiotherapy and chemotherapy. P2Y<sub>12</sub> is considered a chemoreceptor for adenosine diphosphate (ADP). Its expression is documented in some cancer types, such as the C6 lineage of rat glioma, renal carcinoma and colon carcinoma. However, its role in the development of tumour progression and the resistance mechanism in chemotherapy are not well elucidated. Currently, it is well established that normal platelet function is an important factor for the progression of tumors, with thrombocytopenic rats demonstrating a significant reduction of metastases. Clopidogrel bisulfate is a drug, which belongs to the class of antiplatelet agents, being a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist whose endogenous ligand is ADP. The aim of the present study was to determine the effects of tumor cells exposed to the treatment with clopidogrel. The C6 rat cell line was sensitive to the drug tested (150 μM) in the viability and cell counts (69.63 ± 8.70) and (53.05 ± 20.06). Both cell lines showed a significant reduction in the number of colonies after 10 days of treatment with clopidogrel. The U251-MG strain demonstrated a significant increase in the G1 phase and a significant reduction in the S phase in the cell cycle (20.32 ± 3.05) and (19.45 ± 2.35) in the concentration of 500 μM. Other results demonstrate important antiproliferative activity in both tumor lines, suggesting an important participation of the P2Y<sub>12</sub> receptor in this process.

Key Words: purinergic system; glioblastoma multiform; P2Y<sub>12</sub>; clopidogrel bisulfate

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Gliomas.....	14
1.1.1 Glioblastoma (GBM) .....	15
1.2 Sistema Purinérgico.....	17
1.2.1 Receptor P2Y <sub>12</sub> .....	20
1.3 Bissulfato de Clopidogrel.....	23
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
1.1 Objetivo Geral .....	25
1.2 Objetivos específicos.....	25
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>26</b>
<b>1. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>27</b>
<b>2. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>29</b>
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>39</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>41</b>
<b>Materials and Methods</b> .....	<b>44</b>
<i>RT-PCR</i> .....	44
<i>Cell viability</i> .....	45
<i>Cell counting</i> .....	45
<i>Clonogenic assay</i> .....	45
<i>Annexin V/PI and cell cycle analysis</i> .....	46
<i>Acridine Orange flow cytometry staining technique</i> .....	46
<i>Statistical analysis</i> .....	46
<b>Results</b> .....	<b>47</b>
<i>Clopidogrel reduced mitochondrial viability in glioma C6 and U251-MG cell lines</i> .....	47
<i>Clopidogrel decreases cell counting and inhibits the proliferation of glioma cells</i> .....	47
<i>Treatment with clopidogrel alters cell cycle progression in glioma cells</i> .....	48
<i>Clopidogrel leads to autophagy in glioma cells</i> .....	48
<b>Discussion</b> .....	<b>49</b>
<b>References</b> .....	<b>52</b>
<b>Figure Legends</b> .....	<b>57</b>
<b>Figure 1.</b> .....	59
<b>Figure 2.</b> .....	60

**Figure 3. .... 61**  
**Figure 4. .... 62**  
**Figure 5. .... 63**  
**Figure 6. .... 64**  
**Figure 7. .... 65**

## **CAPÍTULO I**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Gliomas

Gliomas são tumores provenientes das células de glia ou neuroglia (GOODENBERGER & MCKINSEY, 2012) e representam cerca de 30% de todos os tumores cerebrais primários (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015). O glioblastoma, tipo mais maligno dos gliomas, está associado com a maioria das mortes por tumores cerebrais primários por não possuir cura e por apresentar uma gama de tratamentos muito limitados para os pacientes (WELLER et al., 2015; FERLAY et al., 2010). De uma maneira geral, é originário de astrócitos, afetando sobretudo adultos e se localiza preferencialmente nos hemisférios cerebrais, raramente ocorrendo no cone medular (MENDONÇA, et al., 2005; BARROS 2012, DAI & HOLLAND, 2001; OSTROM et al., 2015). As causas do aparecimento de tumores no Sistema Nervoso Central (SNC) são ainda desconhecidas, com apenas alguns fatores de risco reconhecidos como a irradiação terapêutica, o trauma físico na cabeça e o trauma acústico (casos de trabalhadores expostos a altos níveis de som) (CONNELLY & MALKIN, 2007). A idade média de diagnóstico é de 64 anos, sendo 1,5 vezes mais comum em homens do que em mulheres. Algumas ocupações também são consideradas possíveis fatores de risco, como os trabalhadores em radiologia, indústria nuclear, minas subterrâneas e tabagismo (INCA, 2016; NAVAS-ACIÉN et al., 2002). Alguns estudos sugerem que a radiação gerada por rádio, telefonia móvel e telecomunicações pode estar associada à etiologia dos gliomas, mas, este assunto permanece inconclusivo (INCA, 2016; DE VOCHT, 2016). Adicionalmente, a herança genética também é citada como risco para alguns tipos de câncer do SNC (INCA, 2016; MCNEILL, 2016; FISHER et al., 2007).

Nas últimas três décadas, poucos avanços foram feitos em relação ao controle da progressão do tumor e melhora da qualidade de vida do paciente, entretanto, recentemente, houve um grande progresso na compreensão da patogênese molecular dos gliomas, tanto em adultos como em crianças (MORRONE et al., 2003, 2016; WELLER et al., 2015). Os gliomas são classificados em quatro graus (I-IV) de acordo com a OMS e estão agrupados em diferentes estágios de acordo com sua morfologia, aumento da atividade mitótica e características histopatológicas (WESTPHAL & LAMSZUS, 2011). O astrocitoma de estágio inicial (grau II) acomete 1,6% dos gliomas nos Estados Unidos, diferentemente do astrocitoma pilocítico (grau I), os tumores de estágio II frequentemente evoluem para tumores de maior grau. Pacientes com astrocitoma grau II tem 50% de chances de atingirem uma sobrevida de 5 anos. Astrocitomas anaplásicos (grau III) exibem três das características histopatológicas: polimorfismo nuclear, atividade mitótica aumentada e proliferação endotelial. Esses tumores agressivos totalizam 6,7% dos gliomas, onde a maioria dos pacientes acometidos por esse tipo

de enfermidade tende a evoluir para glioblastoma (grau IV) onde possuem 30% de chances de ter uma sobrevida de apenas três anos (CHANDANA et al., 2008; GOODENBERGER & MCKINSEY, 2012). Oligodendrogliomas contabilizam 6,5% do total dos gliomas existentes e compartilham características dos astrocitomas, como crescimento retardado. Oligodendrogliomas podem ser classificados de acordo com seu grau de desenvolvimento podendo o grau III ser referido como oligodendroglioma anaplásico (GIANNINI *et al* 2008, GOODENBERGER & MCKINSEY 2012, YAN HAI *et al* 2009).

Uma classificação posterior ocorre com base na localização, diferenciação característica e pela origem das células estromais normais do cérebro (NICOLETTI et al., 2014; WELLER et al., 2007). Diferentemente de tumores não relacionados ao SNC, eles penetram de forma generalizada através do cérebro espalhando-se muito além da massa tumoral que é visível através de neuro-imagem (CLAES, 2007). As principais questões que atualmente desafiam este campo de estudo incluem a determinação das mudanças moleculares que iniciam a formação dos gliomas, as alterações moleculares que determinam a progressão de crescimento de tumores de baixo grau para o crescimento tumoral rápido, tornando-o de alto grau (WESTPHAL & LAMSZUS, 2011). Atualmente, acredita-se que os gliomas são provenientes de células precursoras intrínsecas do SNC, ao invés de células neuronais já diferenciadas, devido à baixa atividade proliferativa que apresentam neurônios, astrócitos e oligodendroglia ou células microgliais (WELLER et al., 2015).

### 1.1.1 Glioblastoma (GBM)

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum, com uma incidência de 3: 100.000, constituindo 45,2% de todos os tumores malignos do SNC e 80% de todos os tumores malignos primários (FISHER et al, 2007; SIEGEL et al, 2015). O GBM é classificado em primário e secundário, sendo o primário o mais comum (95%), e geralmente surge *de novo*, ou como um tumor progressivo em pacientes que já têm um tumor prévio de baixo grau em um período de 3-6 meses, em pacientes mais velhos. Já o GMB secundário é derivado principalmente de astrocitomas de baixo grau em pacientes mais jovens (10-15 anos) (LASSMAN 2004; ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015).

O prognóstico piora à medida que a idade aumenta e por razões desconhecidas, o glioblastoma possui uma prevalência maior em homens, não possuindo uma predisposição genética (HARDELL et

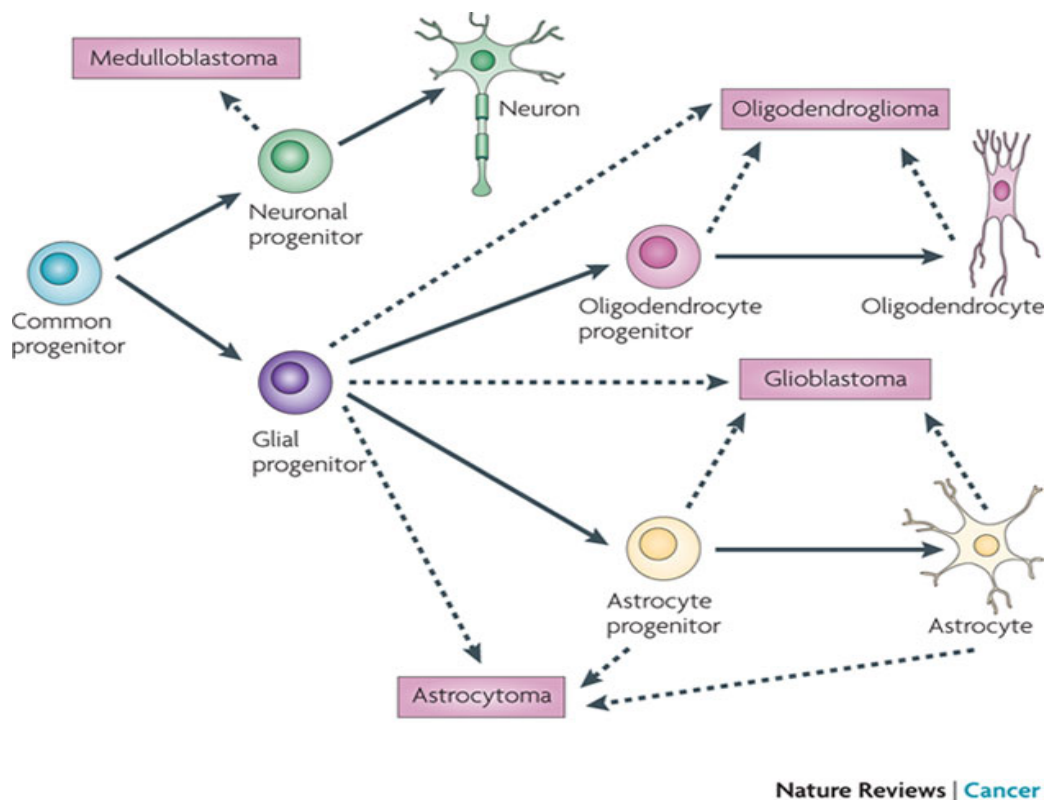
al., 2009). Fatores moleculares como mutações no gene da p53, e no MIB-1, um anticorpo monoclonal para acompanhar o potencial proliferativo de medida de tumores gliais, e metilação do gene O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) tem sido correlacionados com recorrência no GBM (MOLENAAR et al., 2014). Por mais de três décadas, a radioterapia pós-operatória tem sido o tratamento padrão para o glioblastoma recém diagnosticado, porém, vários protocolos de tratamento de radiação com escalonamento de dose além de 60 Gray têm sido infrutíferos e levaram a um aumento da toxicidade (STUPP et al, 2009). Em 2008 o Atlas Genômico do Câncer (*TCGA*) publicou um importante estudo das características moleculares sobre o GBM, onde foram analisadas: número de cópias alteradas, alteração na sequência do DNA de forma adquirida, expressão dos genes dos pais e metilação do DNA. Análises feitas pelo *TCGA* demonstraram que GBMs frequentemente adquirem ganhos dos cromossomos 7 e 19, perdas nos cromossomos 10 e 13. Aproximadamente 50 a 80% dos exames histológicos secundários de GBMs, astrocitomas de grau II e III, assim como oligodendrogliomas possuem mutações adquiridas em genes que codificam enzimas chave, como é o caso da isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1 e IDH2) que emergiram como promotores importantes de um subgrupo mais raro de gliomas, particularmente gliomas de baixo grau e GBM secundário (LLAGUNO & PARADA, 2016). Os tratamentos do GBM incluem a quimioterapia, que pode ser dividida em monoterapia ou politerapia, radioterapia e remoção cirúrgica, porém, há discordâncias entre os profissionais da saúde quanto à utilização da radioterapia e da remoção cirúrgica (HART et al., 2008). Segundo a AATC (*American Brain Tumor Association*) para cada tipo de glioma, há um tratamento mais utilizado, como nos seguintes casos: astrocitoma pilocítico, onde tanto em crianças quanto em adultos a remoção cirúrgica é o tratamento de escolha, porém, caso não seja possível a total remoção, pode-se fazer o uso da radioterapia. Para o astrocitoma de grau IV, a remoção do tumor deve ser feita rapidamente, e normalmente acompanha a radioterapia. Em crianças, a quimioterapia é associada à remoção cirúrgica para evitar o uso da radioterapia (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION 2015; LLAGUNO & PARADA, 2016).

O tratamento de tumores gliais recidivantes sempre foi desafiador e está associado a toxicidades significativas, e sempre deve ser alcançado um equilíbrio entre o controle local do tumor e as morbidades e mortalidades relacionadas ao tratamento. Tem havido muita controvérsia quanto ao diagnóstico de recorrência somente utilizando o exame histopatológico, entretanto, a maioria dos pacientes que possuem achados de imagem sugestivos de progressão podem não estar aptos para um procedimento cirúrgico, tornando difícil o diagnóstico (MALLICK et al., 2016).

Apenas 5% dos GBMs estão relacionados com síndromes hereditárias. Um aspecto importante da patogênese dos gliomas é que a sua transformação para malignidade é um resultado da acumulação de genes repetidos alterados e da regulação anormal dos fatores de crescimento de sinalização, tais



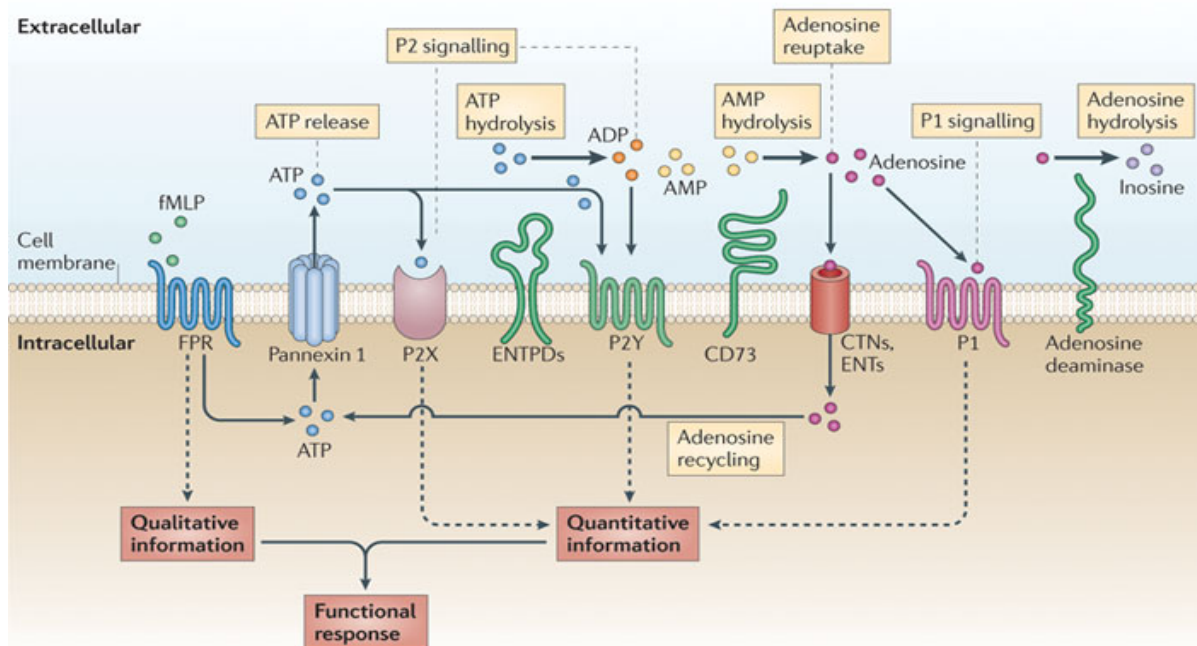
como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (ALIFIERIS & TRAFALIS, 2015, DEAN & FOJO, 2005). De acordo com o entendimento da heterogeneidade molecular do glioblastoma, o Atlas do Genoma do Câncer dividiu este tumor em subclasses: clássica, mensenquimal, proneural e subtipos neurais, fundamentada em alterações genéticas e perfil de expressão principalmente de PDGFR, EGFR, NF1 e IDH1 (VERHAAK et al. 2009). A **Figura 1** representa a diferenciação celular de células normais e cancerosas dos tumores cerebrais.



**Figura 1.** Sugere-se que os progenitores comuns auto-renováveis produzem progenitores neuronais e gliais diferenciados que eventualmente se diferenciam em neurônios maduros, astrócitos e oligodendrócitos. Adaptado de HUSE & HOLLAND, 2010.

## 1.2 Sistema Purinérgico

Em meados da década de 1970, Geoffery Burnstock sugeriu que o ATP extracelular poderia ser um neurotransmissor em respostas não adrenérgicas e não colinérgicas do intestino e da bexiga. A hipótese de sinalização purinérgica é baseada na liberação de ATP quando a célula é estimulada e subsequentemente se liga a receptores sensíveis a nucleotídeos modulando suas funções como mostrado na **Figura 2** (BURNSTOCK, 2008; PRAETORIUS, 2010).



Nature Reviews | Immunology

**Figura 2.** Esquema dos elementos-chave envolvidos na sinalização purinérgica. A ativação do receptor conduz a abertura de canais de pannexina 1 e à liberação de ATP a partir da célula. O ATP liberado promove a ativação autócrina de receptores P2. Ectonucleotidasas (ENTPDs) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina, que ativa receptores P1. A adenosina é "neutralizada" pela adenosina desaminase, que converte a adenosina em inosina, ou é reciclada. Além disso, estes processos de reação autócrina podem ser influenciados de uma forma parácrina por ligantes de receptor purinérgicos que são gerados por outras células, por exemplo, em tecidos infectados ou danificados. Adaptado de JUNGER, 2011.

O sistema purinérgico consiste em uma rota de comunicação comum entre células, e está envolvido em diversos mecanismos neuronais e não neuronais, como respostas imunes, inflamação, agregação plaquetária, dor e vasodilatação mediada pelo endotélio, podendo levar à proliferação ou à morte celular (BURNSTOCK, 2004). O ATP, molécula química sinalizadora do sistema purinérgico, é um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células e está incluído na regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular. No sistema nervoso, este nucleotídeo é armazenado em vesículas nas terminações sinápticas e, após um estímulo ocorre a despolarização neuronal liberando a molécula na fenda sináptica podendo atuar em receptores específicos localizados na

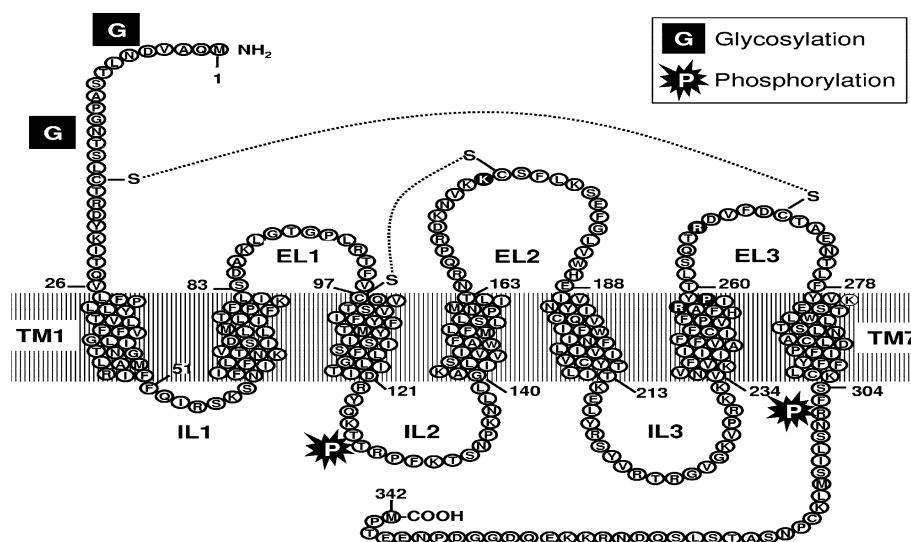
membrana celular pós-sináptica, denominados purinoreceptores (HOEBERTZ et al., 2003). O ATP pode ser liberado juntamente com diversos neurotransmissores, assim como a acetilcolina, o glutamato, a noradrenalina, a serotonina e o ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (ALTENHOFEN, 2013). A liberação de ATP nos terminais pré e pós-sinápticos pode ocorrer como um mecanismo fisiológico ou em resposta a danos celulares, como hipóxia e injúrias (BATTISTA et al., 2009; VERKHRASKY et al., 2009). Neurônios, axônios e terminais sinápticos, bem como a neuroglia podem liberar ATP para o meio extracelular, o qual é  $10^6$  vezes mais concentrado no citosol do que no meio extracelular (mM *versus* nM) (DI VIRGILIO et al., 2009). Em mamíferos, até o momento foram identificados sete receptores P2X ligados a canais iônicos (P2X1-7) e oito receptores P2Y acoplados a proteína G (P2Y<sub>1</sub>, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14) (CZAJKOWSKI et al., 2002; NISHIMAKI et al., 2012). Os receptores P2X não possuem seletividade quanto aos cátions disponíveis no meio extracelular, promovendo o influxo de  $Ca^{+2}$  e  $Na^{+}$  e o efluxo de  $K^{+}$  através da membrana plasmática, levando à despolarização celular e o aumento de  $Ca^{+2}$  e  $Na^{+}$  podendo promover o disparo do potencial de ação nos neurônios (ALTENHOFEN 2013; CZAJKOWSKI et al., 2002; KRZEMINSKI et al., 2006; NISHIMAKI et al., 2012).

Os receptores da família P2Y possuem diversos ligantes endógenos, promovendo seu efeito via transdução de sinais através de segundos mensageiros. Dentre eles, podemos citar a ativação da fosfolipase C (PLC), a ativação das vias MAPKs, a inibição ou estimulação da adenilatociclase e a modulação direta de canais iônicos (ALTENHOFEN, 2013; FIELDS & BURNSTOCK, 2006; KIRISCHUK et al., 1995; NORTH & VERKHRATSKY, 2006). Além disso, a função dos receptores P2Y em células de carcinoma não está totalmente elucidada. Foram descritos efeitos anti-proliferativos e apoptóticos em células de carcinoma colorretal e esofágico em humanos, já em células de pele humana, os receptores do tipo P2Y demonstraram atividade relacionada ao aumento da proliferação celular (COUTINHO-SILVA et al., 2005). Quando comparado com tecidos saudáveis, o ATP está quase exclusivamente localizado no interior da célula, sendo assim, sua concentração extracelular em condições normais pode ser desconsiderada. Com isso, podemos sugerir que nestas condições a sinalização purinérgica que depende de ATP, na maioria dos receptores P2, está inativa (DI VIRGILIO et al., 2009). Os nucleotídeos permanecem disponíveis durante um curto espaço de tempo no meio extracelular devido à existência de uma variedade de diferentes enzimas de degradação. A hidrólise de nucleotídeos consiste num processo sequencial que inativa os agonistas do receptor P2 em várias etapas. O aumento da proliferação por ação de receptores P2Y, estimulado pela via da ERK, foi documentado em diferentes tipos de câncer, incluindo células mesangiais, células vasculares de musculatura lisa e astrócitos primários (ZIMMERMANN, 2000). Os nucleotídeos mostraram atuar no controle da proliferação celular através de diferentes formas, dependendo do tecido estudado.

Enquanto que nos tumores, o crescimento celular é inibido pela presença do ATP, a proliferação dos astrócitos primários é aumentada com a estimulação dos receptores purinérgicos (YEGUTKIN, 2008). Essa discrepância pode ser explicada pela presença de uma família de enzimas denominadas ectonucleotidasas, que realizam o metabolismo desses nucleotídeos no meio extracelular. A ecto-ATPase, NTPDase1, degrada ATP para AMP, enquanto que a NTPDase2 hidrolisa ATP a ADP, já o AMP é degradado pela 5-ectonucleotidase (CD73) gerando adenosina (MORRONE et al., 2006; YEGUTKIN, 2008). No microambiente tumoral, devido à inflamação e à presença de hipóxia em tumores sólidos, tanto o ATP quanto a adenosina podem manter-se elevados durante longos períodos de tempo (CEKIC & LINDEN, 2016). A expressão de enzimas que degradam esses nucleotídeos e nucleosídeos está presente na superfície de células Treg e macrófagos no microambiente tumoral, e também foram encontradas em camundongos em diferentes tipos de tumores, como fibrosarcoma, melanoma, glioma e linfoma (CEKIC & LINDEN, 2016; MITTAL et al., 2014; SUTTON et al., 2017). Está bem estabelecido que os tumores malignos promovem uma forte resposta inflamatória e são caracterizados pela acentuada presença de áreas necróticas, neste contexto, o ATP é capaz de se acumular no ambiente extracelular como consequência de danos inespecíficos na membrana ou através de vias de permeação específicas (DI VIRGILIO, 2012; YEGUTKIN, 2008). O ATP e seus derivados têm fortes efeitos nas células tumorais por estimulação de alguns dos receptores P2Y, tais como, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> que são capazes de promover o crescimento tumoral e aumentar a capacidade de invasão (DI VIRGILIO, 2012). Os tumores malignos também mostram uma expressão incisa do receptor ionotrópico P2X7, promovendo a sobrevivência do tumor (DI VIRGILIO et al., 2009).

### 1.2.1 Receptor P2Y<sub>12</sub>

A família de receptores P2Y possui vários subtipos de receptores com diferentes seletividades farmacológicas. O receptor P2Y<sub>12</sub> pertencente a esta subclasse de receptores purinérgicos e consiste em uma proteína encontrada, principalmente na superfície de plaquetas, músculo liso vascular e cérebro, sendo essencial para que ocorra a coagulação sanguínea, como representado na **Figura 3** (DORSAM & KUNAPULI 2004; YANACHKOV et al., 2016). Faz parte da classe de receptores acoplados à proteína Gi (inibitória), que possui sete domínios transmembrana, hidrofóbicos, com uma curta cadeia extra do grupamento aminoterminal e terminal carboxil intracelular (HOLLOPETER et al., 2001)



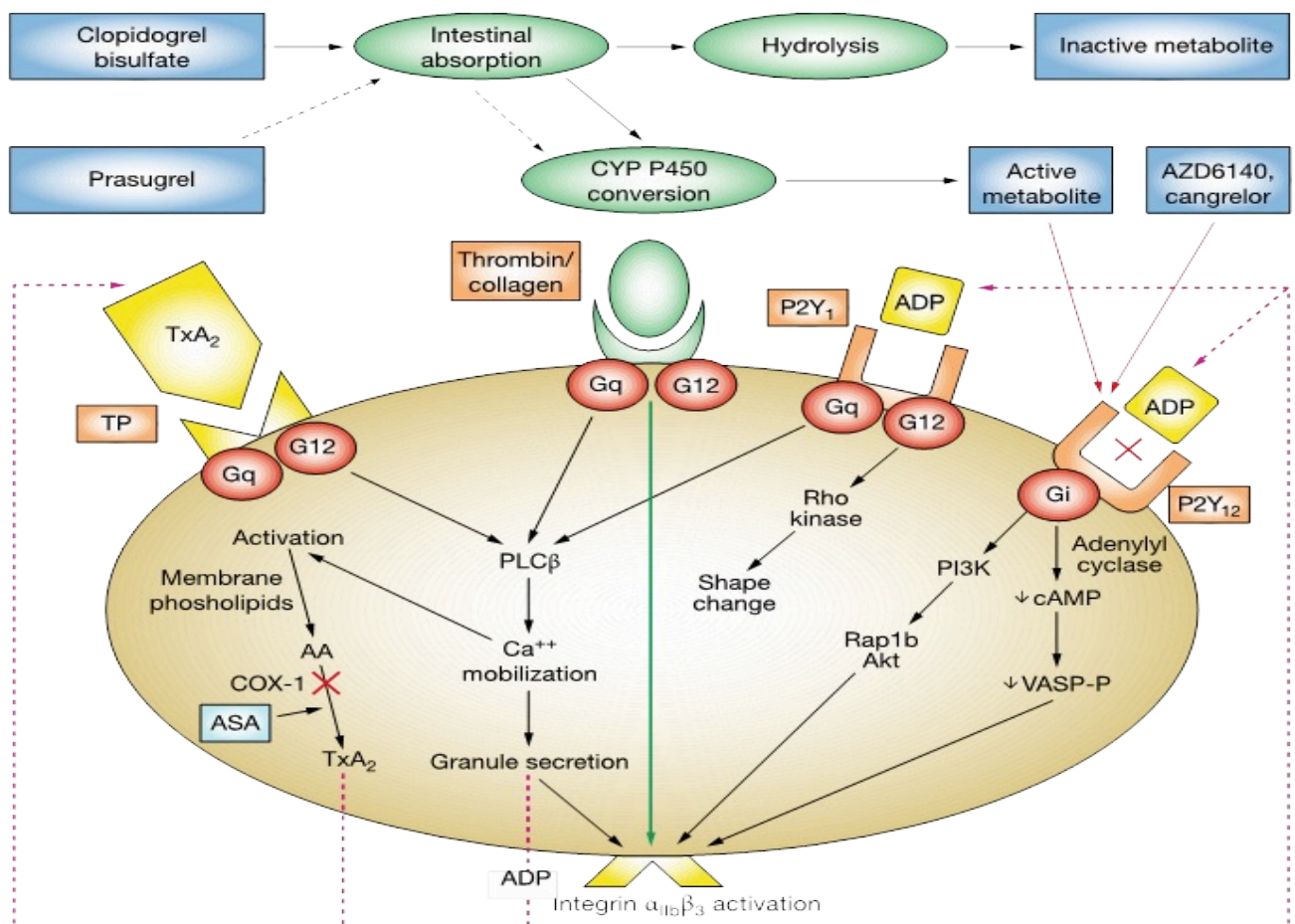
**Figura 3.** Representação estrutural do receptor P2Y<sub>12</sub>. Adaptado de CATTANEO, 2010.

O P2Y<sub>12</sub> é considerado um quimiorreceptor para a adenosina difosfato (ADP) (DORSAM & KUNAPULI, 2004; NICHOLAS, 2001). Sua expressão é documentada em algumas linhagens de câncer, como a linhagem C6 de glioma de rato, carcinoma renal e carcinoma de cólon. Contudo, seu papel no desenvolvimento da sinalização e resposta à quimioterapia não está bem elucidado (SARANGI et al., 2013; JANTARATNOTAI et al., 2009).

Vários receptores acoplados à proteína G (GPCRs) estão ligados à proliferação celular aumentada por ativação de vias de transdução de sinal múltiplas. Essas cascatas compreendem três proteínas quinase que atuam como retransmissores de sinais controlados, em parte, pela fosforilação de proteínas: a MAPK quinase-quinase (MAPKKK), a MAPK quinase (MAPKK) e a MAPK (ROBERTS & DER, 2007). Geralmente, a via ERK é ativada por receptores de superfície celular estimulados pelo fator de crescimento e pela PI3-K, **Figura. 4**, enquanto que as vias JNK, p38 e ERK5 são ativadas por fatores de stress e de crescimento (ROBERTS & DER, 2007). Agonistas do receptor P2Y<sub>12</sub> aumentam a proliferação celular através da ativação da via ERK 1/2 e por inibição dos receptores B-adrenérgicos induzindo diferenciação em astrócitos tipo II por reativação da proteína quinase B (PKB). Utilizando-se um bloqueador específico dos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>13</sub>, constatou-se que apenas a ativação do receptor P2Y<sub>12</sub> foi suficiente para aumentar a proliferação celular e reduzir a diferenciação em células de glioma de ratos (C6) (VAN KOLEN & SLEGGERS, 2006; CZAJKOWSKI et al., 2004).

Atualmente, está bem estabelecido que o funcionamento normal das plaquetas é um importante fator para a progressão de tumores, sendo que ratos com trombocitopenia demonstraram uma redução significativa de metástases. Devido a propriedade de adesão que as plaquetas possuem, acredita-se que as células tumorais que secretam nucleotídeos são capazes de tornar as plaquetas inativas, na sua forma

ativa e desta forma tem mais chances de se tornarem células metastáticas. Além disso, ao encobrir as células tumorais, as plaquetas mascaram as células cancerosas do sistema imune, impedindo que células *natural killers* (NK) sejam capazes de reconhecer estas células alteradas como uma ameaça a homeostase (TESFAMARIAM, 2016). Além disso, as plaquetas podem aumentar a capacidade das células cancerosas de se aderirem aos tecidos promovendo angiogênese e proliferação através da liberação de moléculas pequenas como ATP e ADP (HAYNES et al, 2006; GEBREMESKEL et al., 2015; SCHUMACHER et al., 2013).



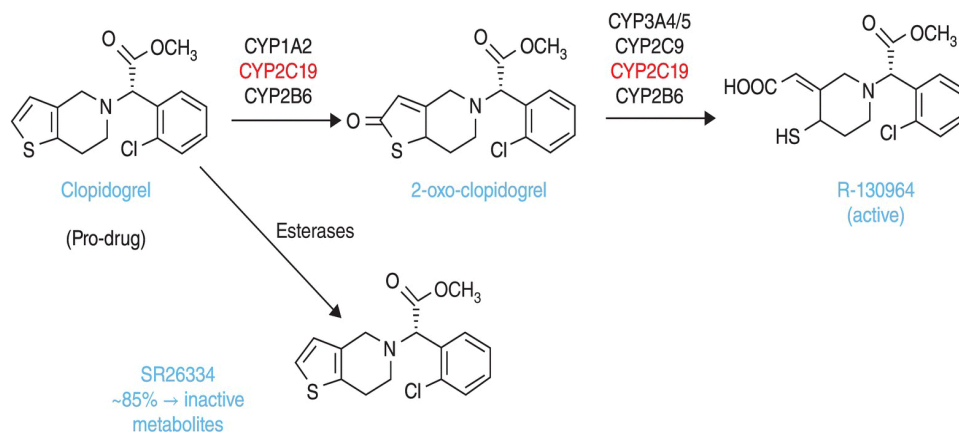
**Figura 4.** Mecanismo de ação do ADP e do clopidogrel. Abreviações: AA, ácido araquidônico; AS, aspirina; cAMP, AMP cíclico; COX-1, ciclooxigenase-1; CYP 450, citocromo; PI3K, fosfatidilinositol 3-kinase; PLCβ, fosfolipase Cβ; TR, receptor de tromboxano; TxA<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>; VASP-P, fosfoproteína estimulada por vasodilatador. Adaptado de (SCOTT et al., 2009).

### 1.3 Bissulfato de Clopidogrel

O bissulfato de clopidogrel é um fármaco pertencente à classe dos antiagregantes plaquetários tienopiridina, com massa molecular de 419g/mol. Seu nome químico oficial é ácido (+) - a- (2-clorofenil) -6,7-di-hidrotieno [3,2-c] piridina-5 (4H) -acético sulfato de éster metílico e possui fórmula molecular  $C_{16}H_{16}ClNO_2S \cdot H_2SO_4$ , e a fórmula estrutural representada na **Figura 5**. Suas características físico-químicas mostram um pó branco praticamente cristalino. É praticamente insolúvel em água em pH neutro, porém bastante solúvel em pH ácido (1), também é bastante solúvel em metanol, levemente solúvel em metileno e praticamente insolúvel em éter etílico e possui rotação óptica específica de aproximadamente  $+56^\circ$  (ACHÉ LABORATÓRIOS; DRUGS.COM; PLAVIX MONOGRAPH).

O bissulfato de clopidogrel é administrado por via oral e é absorvido pelo intestino sendo carregado até a corrente sanguínea. Para possuir ação terapêutica, é necessário que o fármaco seja metabolizado por diversos citocromos da família  $P_{450}$ , principalmente, CYP2C19 e CYP3A4 presentes no fígado, porém apenas 15% do fármaco administrado é biodisponível, pois os outros 85% são inativado pela presença de enzimas esterases presentes na corrente sanguínea formando um metabólito inativo representado na **Figura 5** (JIANG et al., 2016, KAZUI et al., 2010). Atua através da inibição da agregação plaquetária induzida pelo ADP, molécula liberada após dano no epitélio vascular ou pela ruptura de plaquetas, através da ligação de pontes dissulfeto de um grupamento tiol presente no metabólito ativo, e a dois resíduos de cisteína (Cis17 e Cis270) presentes no domínio extracelular do receptor  $P2Y_{12}$  (GURBEL & TANTRY, 2006; SAHOO et al., 2014). O tempo de ação do fármaco é de uma semana, o mesmo da vida útil das plaquetas (BROWN et al., 2015; POLASEK et al., 2011).

O clopidogrel é utilizado no tratamento e prevenção da trombose arterial em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio ou que possuem outras patologias referentes à agregação plaquetária como: acidente vascular cerebral recente, síndrome coronária aguda e fibrilação arterial. Seu uso reduz a mortalidade e a recorrência de episódios cardíacos em pacientes com doença coronária aguda (ACHÉ LABORATÓRIOS; DRUGS.COM; BROWN et al., 2015).



**Figura 5.** Esquema representativo das etapas e enzimas CYP envolvidas na biotransformação do clopidogrel em seus metabólitos ativos e inativos, devido a ação das esterases. Adaptado de [thoracickey.com/prasugrel/](http://thoracickey.com/prasugrel/)

Experimentos executados em ratos *knockout* para o receptor P2Y<sub>12</sub>, houve uma redução na ativação e agregação plaquetária, redução da migração da micróglia para áreas corticais promovidas pela presença de danos. O ADP ativa o P2Y<sub>12</sub> em células microgliais induzindo quimiotaxia. Por conseguinte, serve como um sinal "detector", sendo assim, alguns estudos sugerem que os antagonistas do P2Y<sub>12</sub> são um alvo para o controle da dor inflamatória e neuropática crônica (HAYNES et al, 2006). Segundo Wang e colaboradores (2013), ratos com baixa expressão do receptor P2Y<sub>12</sub>, apresentam um baixo nível de formação de metástases quando comparados aos animais controle, com expressão normal de P2Y<sub>12</sub>. Além disso, outro antagonista do receptor P2Y<sub>12</sub>, a ticlopidina foi escolhida pelos autores Shchors et al., (2015) para o tratamento de glioma de baixo e alto grau, tanto em células de rato como células humanas, em associação com um antidepressivo tricíclico clássico, a imipramina. Neste trabalho dos autores Shchors et al., (2015) demonstraram que a imipramina aumenta os níveis de cAMP, levando a autofagia celular e ao bloquear o receptor P2Y<sub>12</sub> com a ticlopidina, o processo de autofagia mostrou-se mais intenso, do que com o tratamento isolado com a imipramina. Diante do que foi descrito, torna-se relevante o estudo do potencial uso de um antagonista do receptor P2Y<sub>12</sub>, clopidogrel, como alternativa farmacológica no tratamento de gliomas.



# 1. OBJETIVOS

## 1.1 Objetivo Geral

Avaliar a modulação do receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub>, através do tratamento com bissulfato de clopidogrel, no crescimento de células de glioma.

## 1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do receptor P2Y<sub>12</sub> em células de glioma humano U251-MG.
- Avaliar a viabilidade e o número absoluto das células tratadas com o bissulfato de clopidogrel em ambas as linhagens celulares U251-MG e C6.
- Avaliar a capacidade de proliferação por meio de formação de colônias das células de glioma U251-MG e C6 após a exposição ao tratamento com o bissulfato de clopidogrel.
- Avaliar o tipo de morte celular causada pelo tratamento com o antagonista de receptor P2Y<sub>12</sub>, clopidogrel, na linhagem de células U251-MG.
- Avaliar se o tratamento com bissulfato de clopidogrel é capaz de interferir no ciclo celular da linhagem de glioblastoma humano, U251-MG.

## CAPÍTULO II

## 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os gliomas são tumores cerebrais primários que possuem um prognóstico ruim, progridem rapidamente e são resistentes a terapia tradicional. Devido à característica de se infiltrarem, a sua total remoção muitas vezes não é possível, sendo provável que reapareçam no local de origem. O manejo deste tipo tumoral é baseado em tratamentos paliativos, como alívio de sintomas, melhoramento da qualidade de vida e aumento da sobrevida do paciente. O nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a importância da sinalização purinérgica em gliomas (MORRONE, et al., 2003; 2005; 2006; 2016). Deste modo, o foco deste estudo foi avaliar os efeitos da modulação do receptor P2Y<sub>12</sub> em células de glioblastoma e os efeitos do bloqueio deste receptor mediante o uso de um antagonista amplamente utilizado na clínica, o bissulfato de clopidogrel.

Com a investigação da ação de um antagonista seletivo do receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub> foi possível verificar alterações na capacidade das células tratadas com o clopidogrel de se proliferarem após a exposição por um período de 24 h e 48 h. Nossos dados mostraram que as células C6 de glioma de ratos, demonstraram uma redução significativa no número absoluto de células, na viabilidade celular e na formação de colônias. Já, a linhagem U251-MG de glioblastoma humano, apresentou resultados diferentes. Nos ensaios de viabilidade celular e número absoluto de células, não houve uma alteração significativa no mesmo intervalo de tempo de 24 h, entretanto as células quando expostas as mesmas condições de tratamento por um período maior de tempo, 48 h, apresentaram significativa redução na viabilidade mitocondrial. As células tratadas por 24 h não foram capazes de formar o mesmo número de colônias quando comparamos ao controle sem o tratamento, confirmando com os resultados obtidos na avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo que mostram um aumento significativo de células na fase G2 e uma redução na fase S do ciclo celular, após o tratamento com clopidogrel durante 24h. Segundo Shchors et al., (2015) células de astocitoma anaplásico de camundongos e glioblastoma humano, tratadas com imipramina e antagonistas de P2Y<sub>12</sub> demonstraram marcações positivas para autofagia. Desta forma, os resultados encontrados no modelo experimental aplicado pelo nosso laboratório, corroboram com dados presentes na literatura.

Sabe-se que o ATP é capaz de se acumular no ambiente extracelular como consequência de dano à membrana inespecífico ou através de vias de permeação específicas (DI VIRGILIO, 2012; YEGUTKIN, 2008). Além disso, foi demonstrado que o ATP e o outros nucleotídeos e a adenosina podem induzir à proliferação de gliomas (MORRONE et al., 2003). Outro estudo mostrou que algumas linhagens celulares de glioma possuem o catabolismo extracelular de ATP, ADP e AMP alterado, com baixas taxas de hidrólise de ATP extracelular e altas taxas de hidrólise de AMP extracelular quando

comparadas com astrócitos sadios (WINK et al., 2003). Além disso, o tratamento com clopidogrel, reduziu acentuadamente o tamanho do tumor, as características de malignidade, angiogênese e o processo inflamatório em gliomas derivados de C6-EYFP / NTPDase2 (BRAGANHOL et al., 2010).

Deste modo, esta dissertação mostra, pela primeira vez, a participação direta do receptor do P2Y<sub>12</sub> como um potencial alvo farmacológico em células de glioblastoma humano U251-MG. O entendimento dos mecanismos de modulação do receptor P2Y<sub>12</sub> trará uma melhor compreensão da biologia deste tipo de glioma, originando assim novas ideias para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para a cura desta doença. Este estudo abre novas perspectivas que pretendemos explorar em estudos posteriores.

## 2. PERSPECTIVAS

Este trabalho deixa algumas perspectivas de estudos relacionados à capacidade do uso de antagonistas do receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub> e do desenvolvimento de novos bloqueadores farmacológicos para este receptor como tratamentos dos glioblastomas.

- Avaliar autofagia nas células de glioma tratadas com clopidogrel;
- Analisar as vias de sinalização envolvidas na diminuição da proliferação induzida pelo clopidogrel;
- Avaliar a migração celular após o tratamento com clopidogrel;
- Realizar a PCR em tempo real das células de glioma humano submetidas ao tratamento;
- Associar o tratamento com clopidogrel + temozolamida;
- Investigar o efeito farmacológico do bloqueio do P2Y<sub>12</sub> através de estudos *in vivo* com modelo de glioma em camundongos.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN Brain tumor association. Disponível em <<http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/astrocytoma.html>> Acesso em: 04 de janeiro de 2017

ACHÉ Laboratórios LTDA, bula bissulfato de clopidogrel. Disponível em <<http://www.ache.com.br/Downloads/LeafletText/400/Clopidogrel.pdf>> Acesso em 04 de janeiro de 2017

ALIFIERIS, Constantinos; TRAFALIS, Dimitrios T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 152, p. 63-82, 2015

ALTENHOFEN, Stefani. **Avaliação dos efeitos de fármacos benzodiazepínicos sobre o catabolismo de nucleotídeos, nucleosídeos e acetilcolina em encéfalo de zebrafish adulto:(Danio rerio) 2013.**Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul 2013.

ANGIOLILLO, Dominick J. et al Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 14, p. 1505-1516, 2007.

BARROS PONTES, Luciola et al Glioblastoma: enfoque no tratamento de pacientes idosos. **Einstein (16794508)**, v. 10, n. 4, 2012.

BATTISTA, Ariadna G. et al Extracellular ADP regulates lesion-induced in vivo cell proliferation and death in the zebrafish retina. **Journal of neurochemistry**, v. 111, n. 2, p. 600-613, 2009.

BECK, Ruy **Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanopartículas contendo dexametasona. Avaliação da atividade antiinflamatória do fármaco associado.** 2000 Dissertação de Mestrado. Universidade de Santa Maria.

BROWN, Deanna G. et al A review of traditional and novel oral anticoagulant and antiplatelet therapy for dermatologists and dermatologic surgeons. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 3, p. 524-534, 2015.

BURNSTOCK, Geoffrey. Cotransmission. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 47-52, 2004.

BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signaling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 7, p. 575-590, 2008.

CATTANEO, Marco. The platelet P2Y<sub>12</sub> receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. **Blood**, p. blood-2010-08-263111, 2010.

CEKIC, Caglar; LINDEN, Joel Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 177-192, 2016.

CLAES, An. et al Diffuse glioma growth: a guerilla war. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 5, p. 443-458, 2007.

CERIZE, Natália Neto Pereira **Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo 2012.

CHANDANA, Sreenivasa R. et al Primary brain tumors in adults. **American Family Physician**, v. 77, n. 10, p. 1423-1430

COUTINHO-SILVA, Robson et al P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 5, p. G1024-G1035, 2005.

CZAJKOWSKI, Rafal et al ADP-evoked phospholipase C stimulation and adenylyl cyclase inhibition in glioma C6 cells occur through two distinct nucleotide receptors, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub>. **FEBS letters**, v. 513, n. 2, p. 179-183, 2002.

CZAJKOWSKI, Rafał et al. Differential effects of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> nucleotide receptors on ERK1/ERK2 and phosphatidylinositol 3-kinase signalling and cell proliferation in serum-deprived and nonstarved glioma C6 cells. **British journal of pharmacology**, v. 141, n. 3, p. 497-507, 2004.

DAI, Chengkai; HOLLAND, Eric C. Glioma models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1551, n. 1, p. M19-M27, 2001.

DE VOCHT, Frank. Inferring the 1985–2014 impact of mobile phone use on selected brain cancer subtypes using Bayesian structural time series and synthetic controls. **Environment International**, v. 97, p. 100-107, 2016.

DEAN, Michael; FOJO, Tito; BATES, Susan. Tumour stem cells and drug resistance. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 4, p. 275-284, 2005

DI VIRGILIO, Francesco; BOEYNAEMS, Jean-Marie; ROBSON, Simon C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Current opinion in pharmacology*, v. 9, n. 4, p. 507-513, 2009

DI VIRGILIO et al P2X7: a growth-promoting receptor—implications for cancer. **Purinergic signalling**, v. 5, n. 2, p. 251-256, 2009.

DI VIRGILIO, Francesco Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012.

DORSAM, Robert T.; KUNAPULI, Satya P. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 3, p. 340, 2004.

DRUGS.COM, clopidogrel bisulfate Disponível em <<http://www.drugs.com/pro/clopidogrel.html>> Acesso em: 30 de maio de 2015)

FISHER, James. L. et al Epidemiology of brain tumors. **Neurologic clinics**, v. 25, n. 4, p. 867-890, 2007.

FERLAY, J.; Parkin, D. M.; Steliarova-foucher, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. **European journal of cancer**, v. 46, n. 4, p. 765-781, 2010.

FIELDS, R. Douglas; BURNSTOCK, Geoffrey. Purinergic signaling in neuron–glia interactions. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 423-436, 2006.



GEBREMESKEL, Simon et al The reversible P2Y12 inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 1, p. 234-240, 2015.

GIANNINI, Caterina et al. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. **Brain Pathology**, v. 18, n. 3, p. 360-369, 2008.

GOODENBERGER, McKinsey L.; JENKINS, Robert B. Genetics of adult glioma. **Cancer genetics**, v. 205, n. 12, p. 613-621, 2012

HART, Michael G et al. Temozolomide for high grade glioma. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 4, 2008

HARDELL, Lennart et al. Epidemiological evidence for an association between use of wireless phones and tumor diseases. **Pathophysiology**, v. 16, n. 2, p. 113-122, 2009.

HAYNES, Sharon E. et al. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 12, p. 1512-1519, 2006.

HOEBERTZ, Astrid et al. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. **Trends in pharmacological sciences**, v. 24, n. 6, p. 290-297, 2003.

HOLLOPETER, Gunther et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 202-207, 2001.

HUSE, Jason T.; HOLLAND, Eric C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature reviews cancer**, v. 10, n. 5, p. 319-331, 2010.

JANTARATNOTAI, Nattinee. et al. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. **BMC Cancer (2009)9:442**

JIANG, Xi-Ling et al. Development of a physiology-directed population pharmacokinetic and pharmacodynamic model for characterizing the impact of genetic and demographic factors on clopidogrel response in healthy adults. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2016.

JUNGER, Wolfgang G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201-212, 2011

KAZUI, Miho et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n. 1, p. 92-99, 2010.

KIRISCHUK, S. et al. ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. **The Journal of neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 7861-7871, 1995.

KRZEMINSKI, Patryk et al. Mitochondrial localization of P2Y 1, P2Y 2 and P2Y 12 receptors in rat astrocytes and glioma C6 cells. **Brain research bulletin**, v. 71, n. 6, p. 587-592, 2007.

CONNELLY, Jennifer M.; MALKIN, Mark G. Environmental risk factors for brain tumors. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 7, n. 3, p. 208-214, 2007.

LASSMAN, Andrew B. Molecular biology of gliomas. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 4, n. 3, p. 228-233, 2004.

LLAGUNO, Sheila R. Alcantara; PARADA, Luis F. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. **British Journal of Cancer**, 2016.

MALLICK, Supriya et al. Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 28, n. 4, p. 199-210, 2016.

MCNEILL, Katharine A. Epidemiology of Brain Tumors. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 981-998, 2016.

MEIJER, Dimpna H et al. Controlling brain tumor growth by intraventricular administration of an AAV vector encoding IFN- $\beta$ . **Cancer gene therapy**, v. 16, n. 8, p. 664-671, 2009

MENDONÇA, Rodrigo; DE LIMA, Luiz Gustavo Silva. Glioblastoma primário de conomedular. Relato de caso. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 2-B, p. 539-542, 2005.

MITTAL, Deepak et al. Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. **Cancer research**, v. 74, n. 14, p. 3652-3658, 2014.

MOLENAAR, Remco J et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. **Neuro-oncology**, p. nou005, 2014.

MORRONE, Fernanda B et al. Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. **Journal of neuro-oncology**, v. 64, n. 3, p. 211-218, 2003.

MORRONE, Fernanda B. et al. Increased resistance of glioma cell lines to extracellular ATP cytotoxicity. **Journal of neuro-oncology**, v. 71, n. 2, p. 135-140, 2005.

MORRONE, Fernanda B. et al. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. **BMC cancer**, v. 6, n. 1, p. 226, 2006.

MORRONE, Fernanda B.; GEHRING, Marina P.; NICOLETTI, Natália F. Calcium Channels and Associated Receptors in Malignant Brain Tumor Therapy. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 3, p. 403-409, 2016.

NAVAS-ACIÉN, Ana et al. Interactive effect of chemical substances and occupational electromagnetic field exposure on the risk of gliomas and meningiomas in Swedish men. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 12, p. 1678-1683, 2002.

NICOLETTI, Natália. F et al. Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. **Journal of neuro-oncology**, v. 120, n. 2, p. 235-244, 2014.

NISHIMAKI, Naoko et al. Autocrine regulation of  $\gamma$ -irradiation-induced DNA damage response via extracellular nucleotides-mediated activation of P2Y6 and P2Y12 receptors. **DNA repair**, v. 11, n. 8, p. 657-665, 2012.

NOCH, Evan; KHALILI, Kamel. Molecular mechanisms of necrosis in glioblastoma: the role of glutamate excitotoxicity. **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 19, p. 1791-1797, 2009.

NORTH, R. Alan; VERKHRATSKY, Alexei. Purinergic transmission in the central nervous system. **Pflügers Archiv**, v. 452, n. 5, p. 479-485, 2006.

OSTROM, Quinn T et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro-oncology**, v. 17, n. suppl 4, p. iv1-iv62, 2015.

PLAVIX PRODUCT MONOGRAPH. Disponível em <<http://products.sanofi.ca/en/plavix.pdf>>  
Acesso em: 05 de janeiro de 2017

POLASEK, Thomas M et al. Metabolic activation of clopidogrel: in vitro data provide conflicting evidence for the contributions of CYP2C19 and PON1. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 2, n. 6, p. 253-261, 2011.

PRAETORIUS, Helle A.; LEIPZIGER, Jens. Intrarenal purinergic signaling in the control of renal tubular transport. **Annual Review of Physiology**, v. 72, p. 377-393, 2010.

ROBERTS, Patrick J.; DER, Channing J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3291-3310, 2007.

SAHOO, Nalini K. et al. Validation of assay for bulk clopidogrel and for some tablet forms by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 4, p. 331-336, 2014.

SARANGI, Sasmit et al. P2Y12 receptor inhibition augments cytotoxic effects of cisplatin in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 30, n. 2, p. 1-6, 2013.

SCHUMACHER, Dagmar et al. Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y<sub>2</sub> Receptor. **Cancer cell**, v. 24, n. 1, p. 130-137, 2013.

SCOTT, Day Marice et al. P2Y12 inhibitors in cardiovascular disease: focus on prasugrel. **Annals of**

**Pharmacotherapy**, v. 43, n. 1, p. 64-76, 2009.

SHCHORS, Ksenya et al. Dual Targeting of the Autophagic Regulatory Circuitry in Gliomas with Repurposed Drugs Elicits Cell-Lethal Autophagy and Therapeutic Benefit. **Cancer cell**, v. 28, p. 1-16, 2015

SIEGEL, Siegel et al. **Cancer Statistics, 2015** CA, New York, v. 65, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/pdf>>. Acesso em: 04 de janeiro de 2016

SUTTON, Nadia R. et al. Ectonucleotidase CD39-driven control of postinfarction myocardial repair and rupture. 2017.

STUPP, Roger et al. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. **The lancet oncology**, v. 2, n. 9, p. 552-560, 2001.

TESFAMARIAM, Belay. Involvement of platelets in tumor cell metastasis. **Pharmacology & therapeutics**, v. 157, p. 112-119, 2016.

THORACIC KEY. Disponível em: <[thoracickey.com/prasugrel/](http://thoracickey.com/prasugrel/)> Acesso em 21 de janeiro de 2017

VAN KOLEN, Kristof; SLEGERS, Herman. Atypical PKC $\zeta$  is involved in RhoA-dependent mitogenic signaling by the P2Y<sub>12</sub> receptor in C6 cells. **FEBS Journal**, v. 273, n. 8, p. 1843-1854, 2006.

VERHAAK, Roel GW et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

VERKHRASKY, Alexei et al. Purinoceptors on neuroglia. **Molecular neurobiology**, v. 39, n. 3, p. 190-208, 2009.

WANG, Yanhua et al. Platelet P2Y<sub>12</sub> is involved in murine pulmonary metastasis. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80780, 2013.

WEI, Jun et al. Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 461-473, 2010.

WELLER, Michael et al. Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 23, p. 6933-6937, 2007.

WELLER, Michael et al. Glioma. **Nature Prime** v.1 p. 01-18, 2015

WESTPHAL, Manfred; LAMSZUS, Katrin. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 495-508, 2011

YAN, Hai et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 765-773, 2009.

YEGUTKIN, Gennady G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica ACTA (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673-694, 2008.

ZHENG, Tongzhang et al. Risk of brain glioma not associated with cigarette smoking or use of other tobacco products in Iowa. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 10, n. 4, p. 413-414, 2001.

ZIMMERMANN, Herbert. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 362, n. 4, p. 299-309, 2000.

## **CAPÍTULO III**

**Artigo à ser submetido na revista *Journal Of Cancer Research and Clinical Oncology***

## **Effect of P2Y<sub>12</sub> antagonist, clopidogrel, on glioma cells growth**

**Pedro Vargas<sup>1</sup>, Angélica Regina Cappellari<sup>1</sup>, Temis Furlanetto W. Corte<sup>2</sup>, Fabrício Figueiró<sup>3</sup>,  
Liliana Rockenbah<sup>3</sup>, Eduardo Cremonese Filippi-Chiela<sup>4</sup>, Ana Maria Oliveira Battastini<sup>3</sup>,  
Fernanda Bueno Morrone<sup>1-2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Farmacologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

**\*Corresponding author:** Dr. Fernanda Bueno Morrone

Laboratório de Farmacologia Aplicada, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,

Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone number: 55 (51) 3353 3512

E-mail address: fernanda.morrone@pucrs.br; [fbmorrone@gmail.com](mailto:fbmorrone@gmail.com)



## Abstract

ADP acts as P2Y<sub>12</sub> receptor ligand, and is highly expressed in platelets due to its role in the coagulation process in vascular smooth muscle and brain. P2Y<sub>12</sub> antagonists are targets for the control of inflammatory and chronic neuropathic pain. Receptor expression is documented in some cancer types, such as the C6 lineage of rat glioma, renal carcinoma and colon carcinoma. However, its role in tumors progression and the resistance mechanism to chemotherapy are not fully elucidated. Glioblastoma was associated with the majority of primary brain tumor deaths, with no cure and a very limited range of treatments. In the present work, we showed the role of the P2Y<sub>12</sub> receptor in the proliferation and survival capacity of two glioblastoma cell lines, human U251-MG and rat C6, through an agent widely used in the clinic as an antiplatelet agent, clopidogrel bisulfate, a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist. The treatment with clopidogrel (150 µM) lead to a significant reduction in cell count and viability assays, in C6 rat cell line, but the same result was not observed on U251-MG cell line, even at higher concentration (500 µM) for the same time of treatment period (24 h). When U251-MG cells were exposed to 48 h of clopidogrel (200 µM), there was a significant reduction in cell number and viability. However, clopidogrel at lower concentration (300 µM) diminished the number of colonies in U251-MG cells after 24 h treatment. Furthermore, treatment with the antagonist (500 µM) led to significant arrest in the G1 phase with consequent reduction in the S phase of cell cycle in U251-MG cell line. Therapy with the blocker P2Y<sub>12</sub>, clopidogrel, triggered autophagy in both cell lines. These data show the importance of P2Y<sub>12</sub> inhibition by a specific antagonist in glioma development.

Key Words: glioblastoma multiforme; purinergic system; P2Y<sub>12</sub>; clopidogrel

## Introduction

Gliomas are the most common tumor type of central nervous system tumor (CNS), and account essentially 30% of all primary brain tumors.<sup>1</sup> It has been tied for the majority of deaths from primary brain tumors, with no cure and very limited available forms of treatment.<sup>2,3</sup> The causes of appearance of CNS tumors are still unknown, with only a few recognized risk factors such as the therapeutic irradiation, physical trauma in the head and acoustic trauma<sup>4</sup>. Some occupations are also considered possible risk factors, such as radiology workers, the nuclear industry, underground mines and smoking.<sup>5,6</sup> Genetic inheritance is also cited as a risk for some types of CNS cancer.<sup>5,7</sup> The diagnosis average age is 64 years, and it is 1.5 times more common in men than women.<sup>8</sup>

In the past three decades, very few progresses were made in the field of controlling the tumor's advance and to improve in patient's quality of life, but in recent years, there has been solid progress in understanding the molecular pathogenesis of gliomas, both in adults and in children.<sup>2</sup> According to World Health and Organization (WHO), gliomas are classified in four grades (I-IV) based on their morphology, increased mitotic activity and histopathological characteristics. Further classification occurs based on the location, characteristic differentiation and the origin of normal stromal cells of the brain.<sup>9-11</sup> Differently to some non-CNS tumors, they penetrate throughout the normal tissue spreading far beyond the tumor mass.<sup>12</sup> An important aspect of the pathogenesis of gliomas is that their transformation to malignancy is a result of repetitive altered genes accumulation and abnormal regulation of signaling growth factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and hepatocyte growth factor (HGF).<sup>1,13</sup> The Cancer Genome Atlas (TCGA) divided this type of tumor into different subclasses: classic, mensesquimal and proneural, grounded on genetic alterations, and expression profile mainly of PDGFRA, EGFR, NF1 and IDH1<sup>14</sup>. Glioblastoma multiform (GBM) is the most common primary brain tumor and the prognosis gets worse as the age increases.<sup>1,7</sup> For more than three decades, postoperative radiotherapy has been the standard treatment for newly diagnosed glioblastoma.<sup>15</sup> Besides, temozolomide (Temodal™), an alkylating agent, is widely used in the treatment of glioblastoma, reducing the risk of recurrence and prolonging patients' survival, in spite of bringing important adverse effects, such as, hematological toxicity, thrombocytopenia and lymphopenia.<sup>53</sup>

The hypothesis of purinergic signaling is based on ATP release, and subsequent binding to receptors in the cell, modulating their functions.<sup>17,18</sup> Extracellular nucleosides and nucleotides participate in a wide range of cellular responses, amongst them stimulation (or inhibition) of cell death, proliferation, migration, differentiation, release of growth factors and inflammatory intermediaries.<sup>19,20</sup> In mammals there are seven ligand-gated P2X (ATP) receptors (P2X1–7), four subtypes of P1 (adenosine) receptors (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>) and eight G protein-coupled P2Y receptors (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>). Nucleotides remain available for a short period of time in the extracellular medium due to the existence of different degrading enzymes.<sup>21</sup> The ecto-ATPase, NTPDase1, degrades ATP to AMP, whereas the NTPDase2 only hydrolyzes ATP to ADP, thereby promoting new agonists for ADP-specific P2 receptors. Sequentially, AMP is degraded by the 5'-ectonucleotidase (CD73) to adenosine.<sup>22,23</sup>

In tumor microenvironment, due to inflammation and the presence of hypoxia in solid tumors, both ATP and adenosine may be kept elevated for extended periods of time.<sup>24</sup> The expression of enzymes that degrade these nucleotides and nucleosides are present in the surface of T<sub>reg</sub> cells in the microenvironmental tumor, and was also found in mice on different tumor types, such as, fibrossarcoma, melanoma, brain and lymphoma.<sup>24,25</sup> It is well established that malignant tumors promote a strong inflammatory response and are characterized by the presence of necrotic areas. In this context, ATP and its derivate nucleotides have effects on the tumor cells by stimulation of some of P2Y receptors, for instance, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> that are able to promote tumor growth and increase the invasion ability.<sup>26</sup> P2Y<sub>12</sub> receptor recognizes ADP as its ligand; it is coupled to Gi protein and is highly expressed in platelets due to their role in the coagulation process, vascular smooth muscle and brain.<sup>27</sup> In P2Y<sub>12</sub> knockout mice, there was a reduction in the activation and platelet aggregation, as well as a reduction of migration of microglia cortical areas by the presence of damage. ADP activates the P2Y<sub>12</sub> in microglial cells to induce chemotaxis, serving as a “detector” signal, and P2Y<sub>12</sub> antagonists can be targets for inflammatory and chronic neuropathic pain control.<sup>28</sup> Therefore, in this study we elucidated the role of the P2Y<sub>12</sub> receptor in the proliferation and survival capacity of glioblastoma cell lines through a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, clopidogrel.

## Materials and Methods

### *Cell lines and cell culture*

The U-251 MG human glioblastoma and C6 rat glioblastoma cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC—Rockville, Maryland, USA). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10 % and 5 % fetal bovine serum (FBS), respectively, at a temperature of 37° C, a minimum relative humidity of 95%, and an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

### *RT-PCR*

U-251 MG was seeded in 6-well plates. After 24 h the total RNA from cells was isolated with Trizol LS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA with M-MLV reverse transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) in a final volume of 25 µL in the presence of oligo dT primer, as showed in Table 1. RT-PCR reaction was performed in a total volume of 20 µL, which included 0.75 µL of cDNA, 0.5 µL of each forward and reverse primer (Table 1), and 10 µL of PCR master mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The reference gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the endogenous control. Seven microliters of the RT-PCR reaction were separated on a 2% agarose gel containing SYBR<sup>®</sup> Safe DNA and visualized under ImageQuant<sup>™</sup> LAS 400 (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA). Substituting the templates for DNase/RNase-free distilled water in each RT-PCR reaction performed negative control. The resulting bands were subjected to densitometric analysis with ImajeJ software. The PY<sub>12</sub> expression levels were normalized by comparison to GAPDH.

**Table 1.**

List of primers used for P2Y<sub>12</sub> PCR in U251-MG glioma cells.

Gene	Primer 5'-3'	Amplicon (bp)
P2Y <sub>12</sub> - Foward	GCCTGGATCCGTTTCATCTAT	95 bp
P2Y <sub>12</sub> - Reverse	GGGACAGAGATGTTGCAGAA	
GAPDH – Forward	TTC TTT TGC GTC GCC AGC CG	93 bp
GAPDH - Reverse	ACC AGG CGC CCA ATA CGA CC	

### *Cell viability*

Glioblastoma cells were seeded at  $5 \times 10^3$  cells per well in 96-well plates. After confluence, the cells were treated with clopidogrel bisulfate (1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 and 500  $\mu\text{M}$ ). Following 24 h and 48 h of treatment, the medium was removed, the cells were washed with calcium magnesium-free medium (CMF) and 100  $\mu\text{l}$  of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide solution (MTT) (MTT 5 mg/ml in PBS in 90 % DMEM/10 % FBS) was added to the cells and incubated for 3 h. The formazan crystals were dissolved with 100  $\mu\text{l}$  of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was quantified in 96-well plates (Spectra Max M2e, Molecular Devices) at 540 nm.<sup>29</sup>

### *Cell counting*

Glioma cells were seeded at  $2 \times 10^4$  cells per well in 24- well plates. After of semi-confluence, the cells were treated with clopidogrel bisulfate (150, 300 and 500  $\mu\text{M}$ ) or ADP (100  $\mu\text{M}$ ) (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA) for the U-251 MG cell line, and clopidogrel (150 and 300  $\mu\text{M}$ ) or ADP (100  $\mu\text{M}$ ) for the C6 cell line. After 24 h of treatment, the medium was collected and 200  $\mu\text{l}$  of trypsin/EDTA solution was added to detach the cells, which were counted in an automatic cell counter (Countess II FL, Life Technologies, CA, USA), stained with tripan blue. The cell number of the control group (not treated cells) was considered 100 %.

### *Clonogenic assay*

Glioblastoma lineages, U-251 MG and C6, were plated  $2 \times 10^4$  cells per well in a 24 wells-plate. After 24 h, cells were treated with clopidogrel bisulfate (150, 300 and 500  $\mu\text{M}$ ) for the U-251 MG cell line, and clopidogrel (300  $\mu\text{M}$ ) for the C6 cell line for 24 h. Then cells were re-seeded around  $2 \times 10^2$  in a 12 wells-plate and maintained in culture for 10 days. The medium was renovated once every two days. At the end of the experiment, the cells were washed with PBS, fixed with formalin 4 % for 5 min and stained with gentian violet by 5 min. At the sequence, cells were washed two times with PBS and stored at room temperature to dry. After 24 h the images were obtained by Cyber-shot DSC-W510 Sony Picture 12.1 mega pixels and the number of colonies was determined by WCFI Image J software (NIH) (<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/>). The results were presented as absolute number of colonies.

### *Annexin V/PI and cell cycle analysis*

U-251 MG and C6 glioma cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per well in 6-well plates and grown for 24 h. The cells were then treated with clopidogrel, for 24 h. Dead cells were quantified by annexin V-FITC–propidium iodide (PI) double staining, using Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD, Biosciences, Mountain View, CA) 24 h after treatment, according to the manufacturer's instructions. For cell cycle analysis, at the end of the treatment, the medium and the cells were centrifuged at  $400 \times g$  for 6 min. Next, the cells were washed once with PBS (pH 7.4), centrifuged and suspended in 400  $\mu\text{L}$  staining solution (0.5 mM Tris-HCl (pH 7.6), 3.5 mM trisodium citrate, 0.1% NP 40 (v/v), 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  RNase and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  PI) at a concentration of  $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Experiments were performed on FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences) and the results were analyzed using FlowJo Software (Tree Star).

### *Acridine Orange flow cytometry staining technique*

U-251 MG and C6 glioma cells were seeded and grown for 24 h. The cells were treated with clopidogrel for 24 h. Autophagic cells were quantified by acridine orange staining. Experiments were performed on FACS Calibur Flow Cytometer (BD Biosciences) and the results were analyzed using FlowJo Software (Tree Star).

### *Statistical analysis*

The number of experimental replications is given in the figure legends; replicate experiments were conducted with cultures from different seeding procedures. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, or by Student's *t* test using GraphPad Software (San Diego, CA, USA). *P* values  $< 0.05$  were taken to indicate statistical significance.

## Results

### *Expression of P2Y<sub>12</sub> in U251-MG human glioblastoma cells*

In this study we firstly investigated the expression of P2Y<sub>12</sub> receptor in human glioblastoma cells. Our analysis showed that, the U251-MG cell line used in this study which derivates from human glioblastoma astrocytoma<sup>31</sup>, significantly expressed the receptor of interest when compared to the reference gene GAPDH (Fig.1). As previously shown in the literature, rat C6 glioma cell line also expresses the P2Y<sub>12</sub> receptor.<sup>30</sup>

### *Clopidogrel reduced mitochondrial viability in glioma C6 and U251-MG cell lines*

We decided to test a vast range of the P2Y<sub>12</sub> antagonist, clopidogrel, concentrations (1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 and 500  $\mu$ M) in order to choose the most effective in antagonizing the receptor. This effect was observed in U251-MG cell line after 48 h of treatment with equal concentrations of clopidogrel (Fig. 2A). No results were observed to U252-MG after 24 h of treatment (Fig. 2A). The treatments with clopidogrel above 150  $\mu$ M lead to a significant reduction of C6 cell viability ( $53.05 \pm 20.06$ ), as measured by MTT assay, after 24 h and 48 h (Fig. 2B).

### *Clopidogrel decreases cell counting and inhibits the proliferation of glioma cells*

In accordance to the results obtained in the MTT assay, we chose the following concentrations of clopidogrel to evaluate the number of cells: 150 and 300  $\mu$ M for the C6 cell line and 150, 300 and 500  $\mu$ M for the U251-MG cell line. Since ADP is considered a P2Y<sub>12</sub> receptor agonist,<sup>32</sup> cells were exposed to 100  $\mu$ M of ADP in order to observe whether this nucleotide was capable of stimulating cell proliferation, as well as reversing the effect of clopidogrel on the induction of cell death. The U251-MG cell line showed a significant reduction on cell counting with the chosen concentrations of clopidogrel (150, 300 and 500  $\mu$ M), when the cells were exposed for a longer period (48 h) (Fig.3A). Interestingly, ADP induced cell proliferation, but was not able to reverse the effect of clopidogrel in inducing cell death. The results on C6 cell line showed that the treatment with clopidogrel 150 and 300  $\mu$ M was effective on diminishing cell counting after 24 h treatment (Fig. 3B) and ADP did not reverse this effect. After, a clonogenic assay was performed with the purpose of evaluating the colonies formation after 10

days of treatment. Interestingly, the results showed that, after the exposure to 300  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$  of clopidogrel, the U251-MG cell line presented a significant reduction in the ability of cells to proliferate and to form colonies when compared to control (Fig.4A). Similar results were observed when the C6 cells were treated with clopidogrel 300  $\mu\text{M}$  (Fig.4B).

#### *Treatment with clopidogrel alters cell cycle progression in glioma cells*

Treatment with clopidogrel 500  $\mu\text{M}$  was able to alter the cell cycle progression by arrest the cells in the G2 phase (from 9.26 to  $19.47 \pm 1.93$ ) with consequent decreasing in the S phase (from 27.43 to  $16.84 \pm 1.12$ ) in U251-MG glioma cells (Fig.5A). On the other hand, similar results were not observed in C6 glioma cells in the tested concentrations (Fig.5B).

#### *Clopidogrel leads to autophagy in glioma cells*

In order to investigate the type of cell death induced by the treatment with clopidogrel we performed a flow cytometry assay to evaluate apoptosis/necrosis pathways through annexin/Pi. Treatment with P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist did not induce cell death by apoptosis or necrosis in the tested concentrations for both lineages (Fig.6 A/B). Since the cells did not died by apoptosis nor necrosis, we decided to investigate whether autophagy would be responsible for the results previously presented. As shown in Figure 7 A and B, treatment with clopidogrel for 24 h induced autophagy in U251-MG human (150  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$ ) and C6 rat glioblastoma cells (150  $\mu\text{M}$  and 300  $\mu\text{M}$ ).



## Discussion

The treatment of recurrent primary brain tumors has always been challenging and it is associated with significant toxicities, and a balance has to be achieved between local control and treatment of related morbidities and mortalities.<sup>33</sup> Due to the importance of the purinergic system in the progression of various tumors,<sup>23</sup> specially gliomas, and the poor survival prognosis, we decided to investigate the effects of P2Y<sub>12</sub> blockade by clopidogrel bisulfate on U251-MG human and C6 rat glioblastoma cell lines.

Two lineages were used in this study, C6 rat glioma cells and U251-MG cells that are derivate from human glioblastoma astrocytoma.<sup>31</sup> This last cell line was previous used to evaluate the therapeutic efficacy of Irinophore C™ combined with temozolomide in glioblastoma tumor model.<sup>37</sup> Unlike the C6 lineage, U251-MG cells had no reports in the literature regarding the expression of the P2Y<sub>12</sub> receptor; so, we first showed the expression of this receptor on U251-MG human glioma cells. The P2Y<sub>12</sub> receptor is a purinergic receptor found on the surface of platelets, vascular smooth muscle and brain. Its expression is documented in some cancer types, such as renal carcinoma, colon carcinoma, the C6 and,<sup>34</sup> LN71 cell line.<sup>35</sup>

Clopidogrel bisulfate is a P2Y<sub>12</sub> antagonist acting by the inhibition of platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP).<sup>36</sup> In order to evaluate the involvement of this receptor on glioma cells proliferation and viability, different concentrations of clopidogrel were tested in the C6 rat and U251-MG human glioblastoma cell lines. Since the concentrations of 150 and 300 μM were effective in reducing the viable cell for the C6 line, we used these concentrations to perform the following experiments. Surprisingly, we did not observed the same results in the U251-MG cell line in neither concentration tested at 24 h, but similar results were observed at longer time, 48 h. In fact, P2Y<sub>12</sub> receptor-mediated proliferation activates the cascade of the ERK pathway in several cell types, such as smooth muscle cells and astrocytes.<sup>39</sup> Furthermore, in the glioblastoma C6 rat cells, when nucleotide degradation is blocked, the availability of the agonist, ADP, in the extracellular medium activates the ERK 1/2 through a mechanism dependent on cascade RhoA/PKC/Raf1/MEK-dependent by binding to the P2Y<sub>12</sub> receptor, leading to increased proliferation and decrease of cell differentiation.<sup>30,39</sup>

To evaluate the ability of clopidogrel to inhibit proliferation on glioma cells, the clonogenic assay was performed for ten days. Both cell lines showed a significant reduction in the formation of colonies when compared to control cells. According to previous study, in the rat C6 cell line the activation of the signaling cascade of ERK 1/2 stimulates cell proliferation, but in the case of U251-MG this effect occurs through other receptors, such as adiponectin.<sup>40</sup>

Besides, we showed that the blockade of P2Y<sub>12</sub> receptor in U251-MG human glioblastoma cells by clopidogrel is able to increase the G2 phase and reduce phase S on cell cycle. It has been formerly described the effects of ADP in a rat gliomas model, whereas Morrone et al., (2006) has implanted C6 glioma cells in rats associating the enzyme apyrase, whose role is to catalyze the breakdown of ATP in AMP + inorganic phosphate. The results obtained in this study confirmed the hypothesis of purinergic signaling in the growth of gliomas.<sup>41</sup> It is known that ATP is capable of accumulating in the extracellular environment as consequence of nonspecific membrane damage or through specific permeation pathways.<sup>21,42</sup> In addition, it has been demonstrated that ATP and other nucleotides, and adenosine may induce glioma proliferation.<sup>43</sup> In fact, Wink et al. (2003) has demonstrated that glioma cell lines have altered extracellular ATP, ADP, and AMP catabolism, showing low rates of extracellular ATP hydrolysis and high rates of extracellular AMP hydrolysis when compared to normal astrocytes.<sup>44</sup>

Considering that platelets express P2 receptors, which are activated by ADP (P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub>), Braganhol et al. (2010) demonstrated, using C6 cells that overexpress NTPDase2 in the rat implanted glioma cells, that ADP could activate P2Y<sub>12</sub> receptors, leading to increased platelet recruitment and activation. Furthermore, the treatment with clopidogrel, markedly reduced tumor size, malignity characteristics, angiogenesis, and the inflammatory process in C6-EYFP/NTPDase2-derived gliomas.<sup>45</sup> Autophagy is a lysosome-dependent process that degrades organelles in order to established cellular homeostasis, in response to damaged, such as, oxidative stress, nutrient deprivation and injury to cellular DNA. Several genes control this pathway; which controls several kinases, including mTOR, PI3k/Akt and MAPK.<sup>47</sup> The inhibition of P2Y<sub>12</sub> increases the levels of cAMP by upregulating adenylate cyclase leading to autophagic flux.<sup>47</sup> It has been proposed that autophagy contributes to oncogene-induced cell death or senescence, two essential oncossuppressive mechanisms. Here, we found that clopidogrel increased the percentage of AO-positive cells. Chemicals-induced autophagy has a dual role in cancer cells: in one hand, can contribute to cell resistance and survival; on the other hand, it can contribute to the toxicity of treatments. Previously, it has been suggested that autophagy is involved on the degradation of oncogenic proteins, including mutant, such as P53, p62, PML-RARA and BCR-ABL1.<sup>48</sup> According to Ma et al. (2013) autophagy is involved in the immune responses that prevent the establishing and multiplying of malignant cells. At least in some situations, dying malignant cells are capable of recruiting antigen-presenting cells (APCs) and other cellular components of the immune system, resulting in the elicitation of innate and/or adaptive antitumor immune responses.<sup>49</sup> On the one hand, autophagy responses are essential for dying neoplastic cells to release ATP in optimal amounts, which not only recruits APCs through purinergic receptor P2Y, but also triggers them to release immunostimulatory chemokines through purinergic receptor P2X7.<sup>47</sup>

Interestingly, in our study, treatment with P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist, clopidogrel, did not induce cell death by apoptosis or necrosis. Comparable results were obtained by Shchors et al. (2015), showing that the cell may get in to autophagy process when exposed to other P2Y<sub>12</sub> antagonist, ticlopidine.<sup>35</sup> The data shown herein demonstrate a significant antiproliferative activity in both tumor lines studied, suggesting an important participation of the P2Y<sub>12</sub> receptor in this process. Despite the P2RY<sub>12</sub> is expressed in low concentrations in healthy tissues, other than in platelets and glial cells, it has high expression in diverse tumor types and it's associates with poor prognosis, such as, glioma, colon and non-small cancer (NSCLC).<sup>48</sup> The tumor-inhibiting role of autophagy in certain human cancers is increasingly being demonstrated. For example, in GBM patients, comparatively higher levels of autophagy are associated with better survival prognosis.<sup>50</sup> Increased autophagic flux was lately shown to impair tumor growth of NSCLC in mice. As conclusion, we could see that glioma cells can express PY<sub>12</sub>R and the inhibition of this receptor by clopidogrel reduces cell proliferation and promotes cell death by autophagy. In front of our results, by modulating this receptor, it could be considered a potential pharmacological target to treat glioblastoma, although, other studies are need to confirm this hypothesis.

### **Acknowledgements**

Compliance with Ethical Standards: Approved by the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul ethics committee (Project N° 6774). Conflict of interest: The author Pedro Vargas declares he has no conflict of interest. The authors declare no conflict of interest. Ethical approval: This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors. Funding: This work was supported by Latin America Cooperative Oncology Group (LACOG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Project N° 303264/2013-4), CAPES, and FINEP Research Grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) #01.11.0014-00.

## References

1. Alifieris, C., & Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & therapeutics*, *152*, 63-82.
2. Weller, M. *et al.* Glioma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 15017 (2015).
3. Ferlay, J., Parkin, D. M., & Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European journal of cancer*, *46*(4), 765-781.
4. Connelly, J. M., & Malkin, M. G. (2007). Environmental risk factors for brain tumors. *Current neurology and neuroscience reports*, *7*(3), 208-214.
5. Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. *INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva* (2016).
6. Navas-Acién, A., *et al.* (2002). Interactive effect of chemical substances and occupational electromagnetic field exposure on the risk of gliomas and meningiomas in Swedish men. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, *11*(12), 1678-1683.
7. Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M., & Wiemels, J. L. (2007). Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics*, *25*(4), 867-890.
8. Ostrom, Q. T., *et al.* (2015). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*, *17*(Suppl 4), iv1.
9. Nicoletti, N. F., *et al.*, (2014). Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. *Journal of neuro-oncology*, *120*(2), 235-244.
10. Weller, M., *et al.*, (2007). Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker?. *Clinical Cancer Research*, *13*(23), 6933-6937.11.
11. Westphal, M., & Lamszus, K. (2011). The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nature reviews. Neuroscience*, *12*(9), 495.12.
12. Claes, A., Idema, A. J., & Wesseling, P. (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta neuropathologica*, *114*(5), 443-458.

13. Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, 5(4), 275-284.
14. Verhaak, R. G., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell*, 17(1), 98-110.
15. Stupp, R., *et al.* (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The lancet oncology*, 10(5), 459-466.
16. Burnstock, G. (2008). Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(7), 575.
17. Praetorius, H. A., & Leipziger, J. (2010). Intrarenal purinergic signaling in the control of renal tubular transport. *Annual review of physiology*, 72, 377-393.
19. Bours, M. J., *et al.*, (2011). P2 receptors and extracellular ATP: a novel homeostatic pathway in inflammation. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 1443-1456.
20. Khakh, B. S., & North, R. A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*, 442(7102), 527.
21. Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica ACTA (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(5), 673-694.
22. Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 362(4), 299-309.
23. Burnstock, G., & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic signalling*, 9(4), 491-540.
24. Cekic, C., & Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 16(3), 177.
25. Mittal, D., Young, A., Stannard, K., Yong, M., Teng, M. W., Allard, B., ... & Smyth, M. J. (2014). Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. *Cancer research*, 74(14), 3652-3658.

26. Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer research*, 72(21), 5441-5447.
27. Yanachkov, I. B., *et al.* (2016). New highly active antiplatelet agents with dual specificity for platelet P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> adenosine diphosphate receptors. *European journal of medicinal chemistry*, 107, 204-218.
28. Haynes, S. E., *et al.* (2006). The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature neuroscience*, 9(12), 1512.
29. Gehring, M. P., *et al.* (2012). P2X<sub>7</sub> receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic signalling*, 8(4), 729-739.
30. Krzemiński, P., *et al.* (2007). Expression and functional characterization of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> nucleotide receptors in long-term serum-deprived glioma C6 cells. *The FEBS journal*, 274(8), 1970-1982.
31. Jacobs, V. L., *et al.*, (2011). Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN neuro*, 3(3), AN20110014.
32. Song, J. W., Soh, S., & Shim, J. K. (2017). Dual antiplatelet therapy and non-cardiac surgery: evolving issues and anesthetic implications. *Korean journal of anesthesiology*, 70(1), 13-21.
33. Mallick, S., Benson, R., Hakim, A., & Rath, G. K. (2016). Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 28(4), 199-210.
34. Sarangi, S., *et al.* (2013). P2Y<sub>12</sub> receptor inhibition augments cytotoxic effects of cisplatin in breast cancer. *Medical Oncology*, 30(2), 567.
35. Shchors, K., Massaras, A., & Hanahan, D. (2015). Dual targeting of the autophagic regulatory circuitry in gliomas with repurposed drugs elicits cell-lethal autophagy and therapeutic benefit. *Cancer Cell*, 28(4), 456-471.
36. Gesheff, T., & Barbour, C. (2017). Oral antiplatelet agents for the management of acute coronary syndromes: A review for nurses and allied healthcare professionals. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 29(2), 104-115.
37. Verreault, M., *et al.* (2015). Determination of an optimal dosing schedule for combining

- Irinophore C<sup>TM</sup> and temozolomide in an orthotopic model of glioblastoma. *Journal of Controlled Release*, 220, 348-357.
38. Ide, S., Nishimaki, N., Tsukimoto, M., & Kojima, S. (2014). Purine receptor P2Y6 mediates cellular response to  $\gamma$ -ray-induced DNA damage. *The Journal of toxicological sciences*, 39(1), 15-23.
  39. Van Kolen, K., & Slegers, H. (2006). Atypical PKC $\zeta$  is involved in RhoA-dependent mitogenic signaling by the P2Y12 receptor in C6 cells. *The FEBS journal*, 273(8), 1843-1854.
  40. Porcile, C., *et al.* (2014). Adiponectin as novel regulator of cell proliferation in human glioblastoma. *Journal of cellular physiology*, 229(10), 1444-1454.
  41. Morrone, F. B., *et al.* (2006). In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC cancer*, 6(1), 226.
  42. Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer research*, 72(21), 5441-5447.
  43. Morrone, F. B., *et al.* (2003). Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines. *Journal of neuro-oncology*, 64(3), 211-218.
  44. Wink, M. R., *et al.* (2003). Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. *Cancer letters*, 198(2), 211-218.
  45. Braganhol, E., *et al.* (2009). Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer science*, 100(8), 1434-1442.
  46. Thomé, M. P., *et al.* (2016). Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci*, 129(24), 4622-4632.
  47. Vessoni, A. T., Filippi-Chiela, E. C., Menck, C. F., & Lenz, G. (2013). Autophagy and genomic integrity. *Cell death and differentiation*, 20(11), 1444.
  48. Hollopeter, G., *et al.* (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 409(6817), 202.
  49. Ma, Y., *et al.* (2013). Autophagy and cellular immune responses. *Immunity*, 39(2), 211-227.
  50. Aita, V. M., *et al.* (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59(1), 59-65.

51. Aoki, H., *et al.* (2008). Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3. *Autophagy*, 4(4), 467-475.
52. Xia, Y., Liu, Y. *et al.* (2014). A combination therapy for KRAS-driven lung adenocarcinomas using lipophilic bisphosphonates and rapamycin. *Science translational medicine*, 6(263), 263ra161-263ra161.
53. Chang, L., *et al.* (2014). Treating malignant glioma in Chinese patients: update on temozolomide. *Oncotargets and therapy*, 7, 235.



## Figure Legends

**Figure 1.** The PCR assay was performed in order to investigate the expression of the P2Y<sub>12</sub> receptor in U251-MG human glioblastoma cells (n=3). GAPDH was used as the reference gene. Data were analyzed by Student's *t* test, \*P<0.05, and show significant difference of band intensity from the GAPDH.

**Figure 2. A)** Dose-response curve (1-500 μM) was obtained through MTT assay (n = 3), after 24 h of exposure U251-MG cell line. Dose-response curve was obtained through MTT assay (n = 4), after 48 h of exposure. **B)** Selfsame concentrations of clopidogrel were used to evaluate cell viability in the rat C6 glioma cells (n = 8), after 24 h of exposure. The values represents the mean ± SEM from three independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.001 and \*\*\*P<0.0001 versus control by ANOVA with post-hoc following Tukey.

**Figure 3. A)** U251-MG were treated with ADP and clopidogrel for 48 h (n=4). Control cells were supplemented with 10% FBS. Cell number is expressed as %. The values represent the mean ± SEM from three independent experiments. \*P<0,05 versus control, \*\*p<0,001 with ANOVA with post-hoc Tukey **B)** C6 glioma cells were treated with ADP and clopidogrel for 24 h in DMEM and cell counting was evaluated after 24 h (n=6). Control cells were supplemented with 5% FBS. Cell numbers are expressed as %.

**Figure 4. A)** Representative figures of the clonogenic assay in U251-MG and C6 cell lines. Number of cell colonies is express in gross numbers and were analyzed by Image J stained with violet gentian. **B)** The values represent the mean ± SEM from three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA post-hoc Tukey and Student's *t* test, respectively, significantly different from the control group \*P<0,05, \*\*P<0,001. For clonogenic assay U251-MG and C6 glioma cells were treated with clopidogrel for 24 h. The values represent the mean ± SEM from four independent experiments.

**Figure 5.** Flow cytometry to analyze cell cycle was performed through annexin/Pi after the treatment with clopidogrel. The values represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. ANOVA post-hoc following Tukey significantly different from the control group analyzed data.

**Figure 6.** Flow cytometry to analyze apoptosis / necrosis pathways was performed through annexin/Pi after the treatment with clopidogrel. The values represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. ANOVA post-hoc following Tukey, significantly different from the control group, analyzed data.

**Figure 7.** In order to analyze whether the treatment at different concentrations of clopidogrel was able to alter the cell cycle of the U251-MG cell line, the assay was performed through flow cytometry. The values represent the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA post-hoc following Tukey, significantly different from the control group \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,001$

Figure 1.

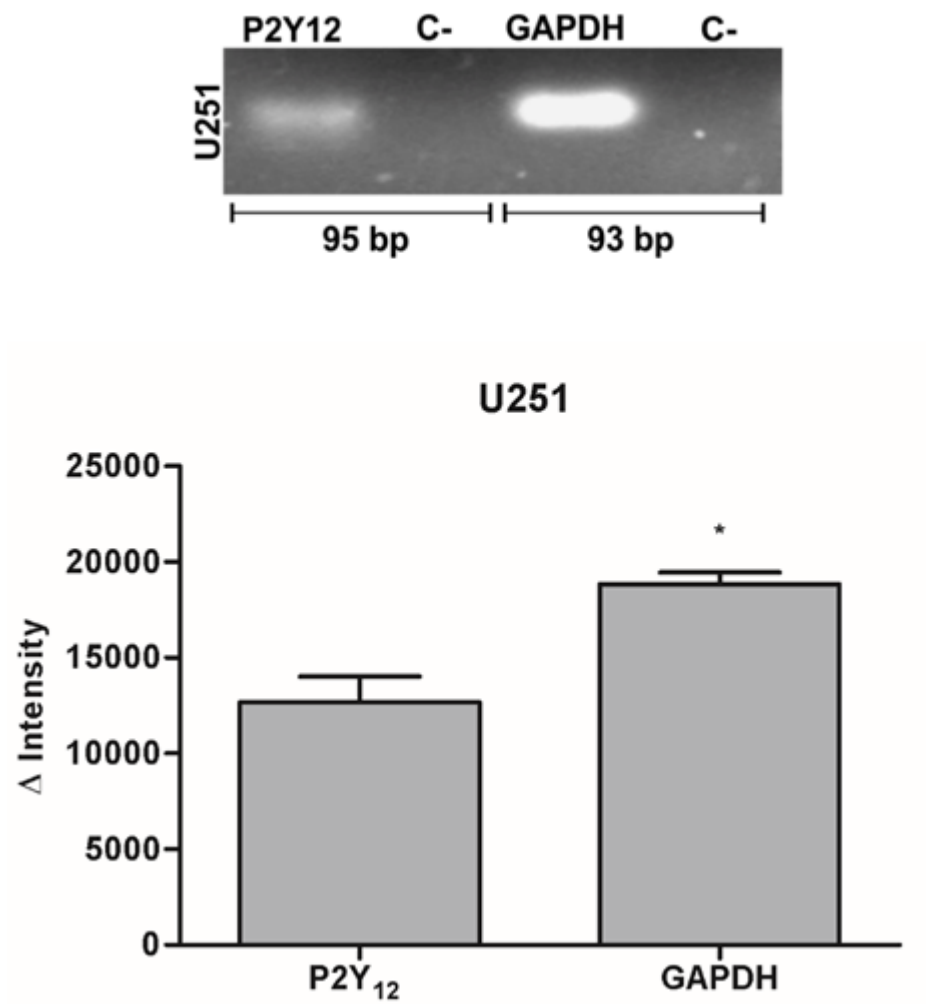
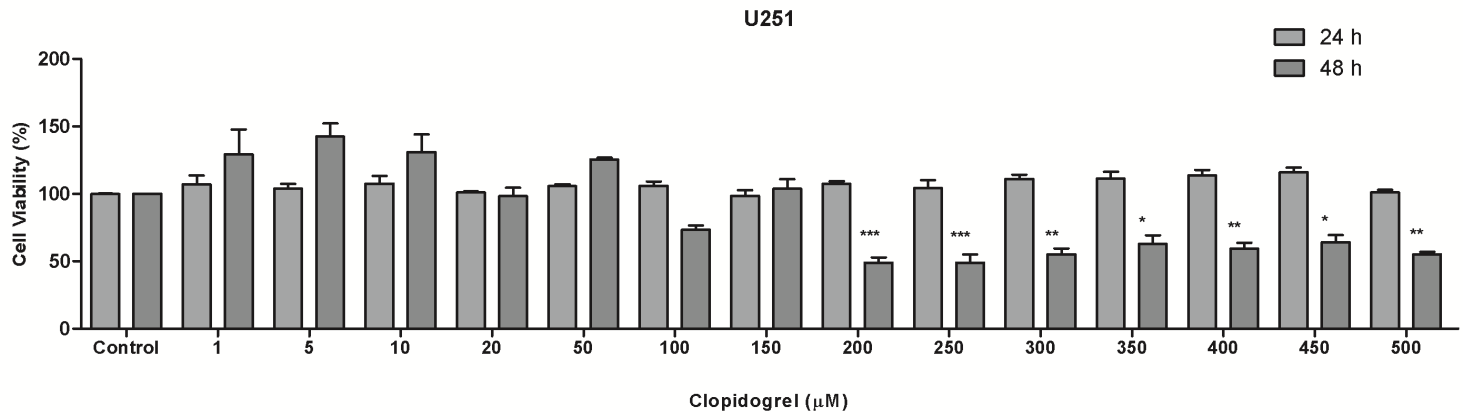


Figure 2.

A)



B)

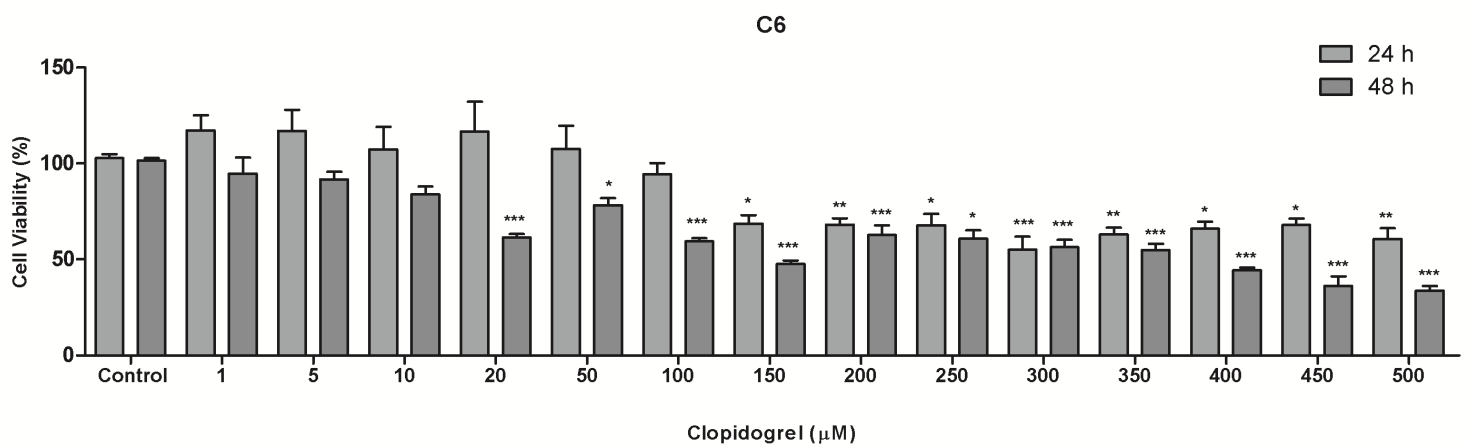
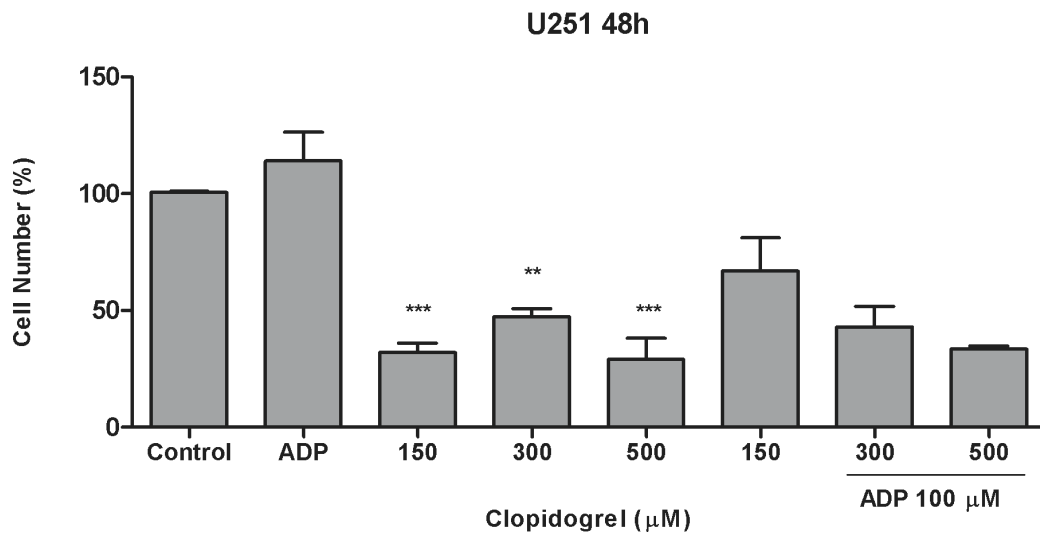


Figure 3.

A)



B)

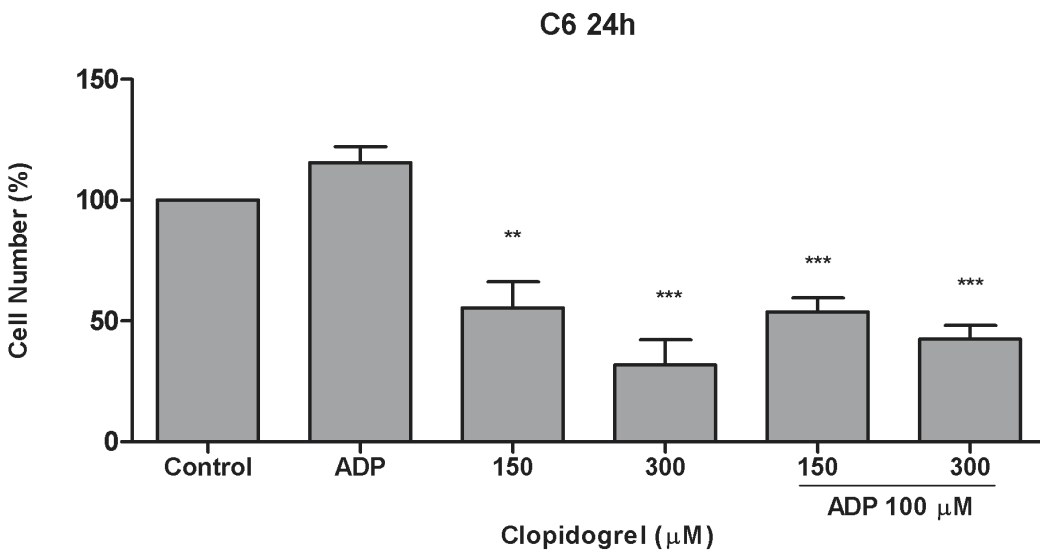


Figure 4.

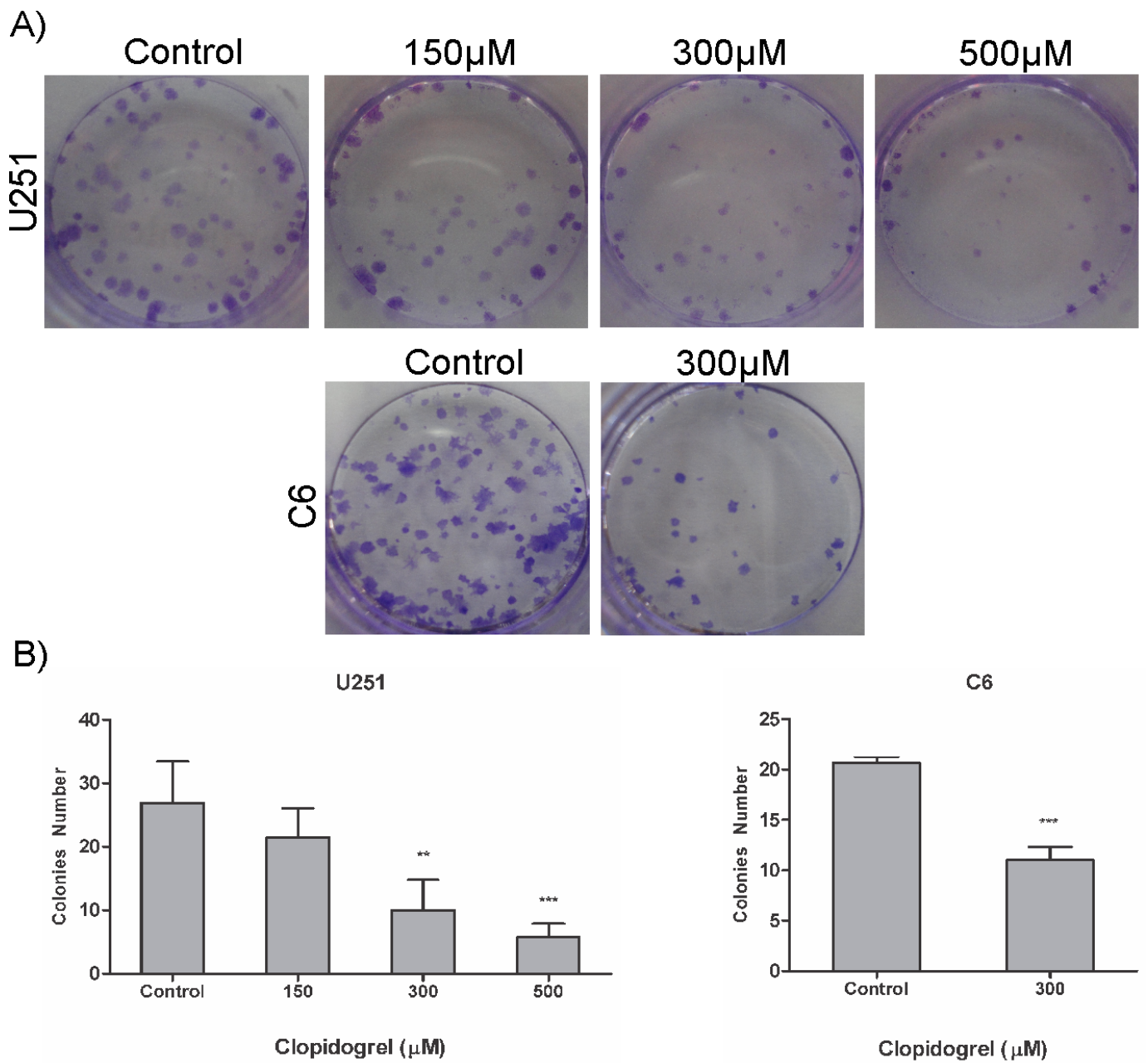


Figure 5.

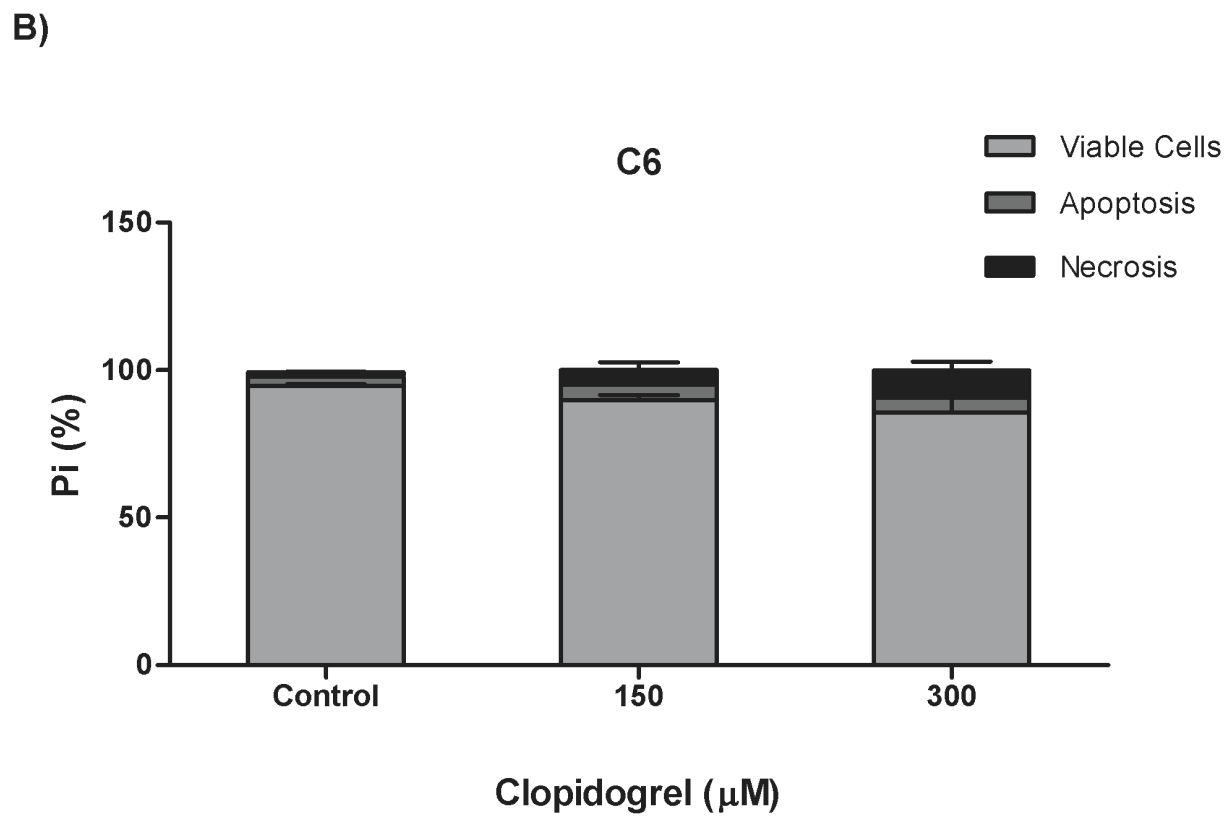
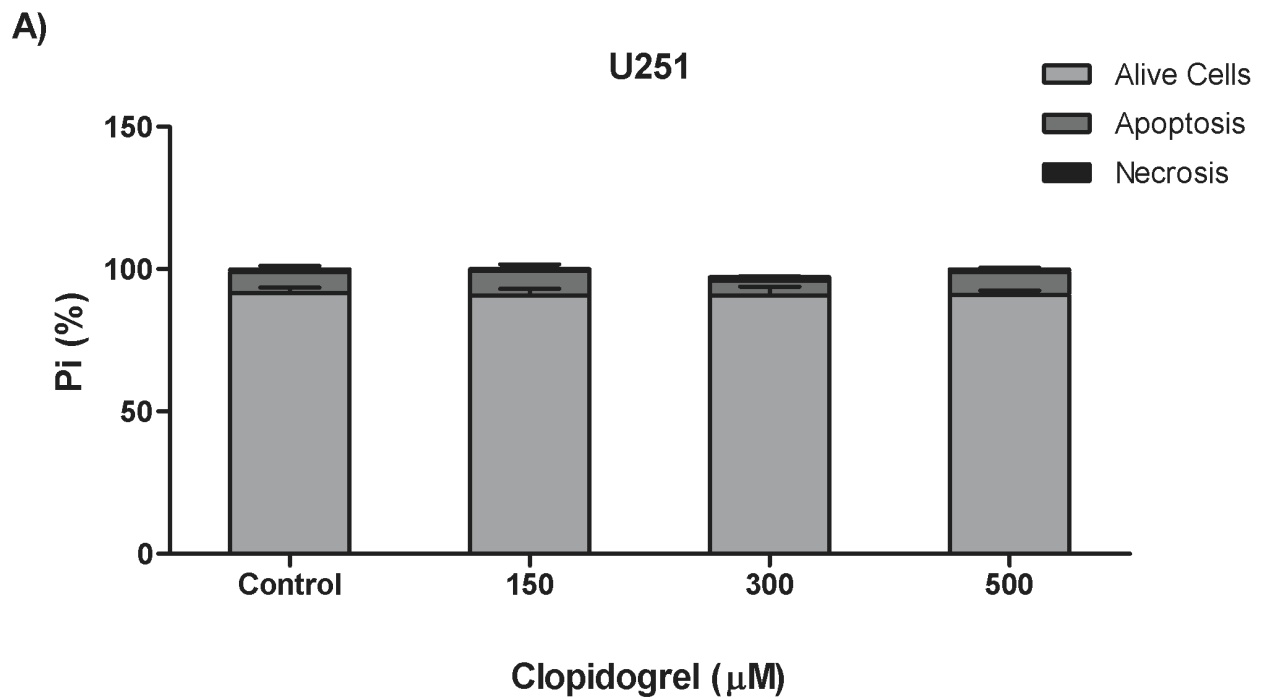


Figure 6.

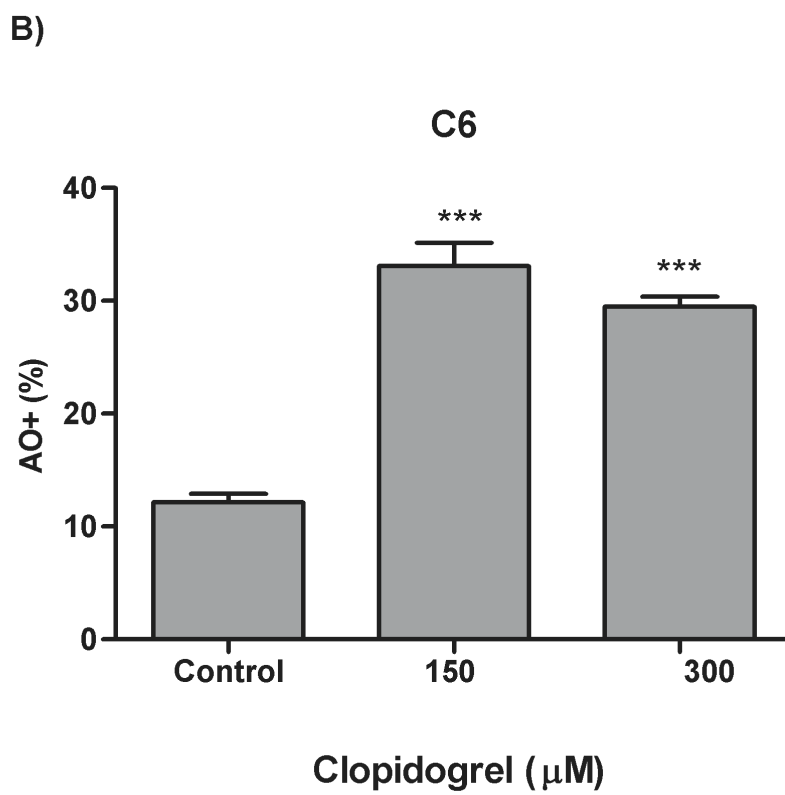
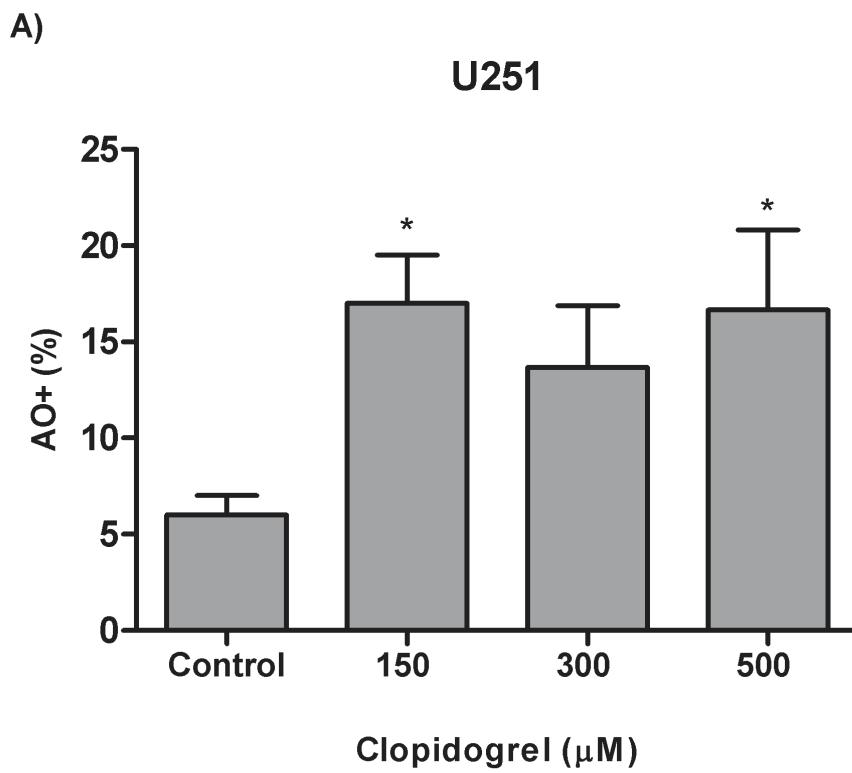
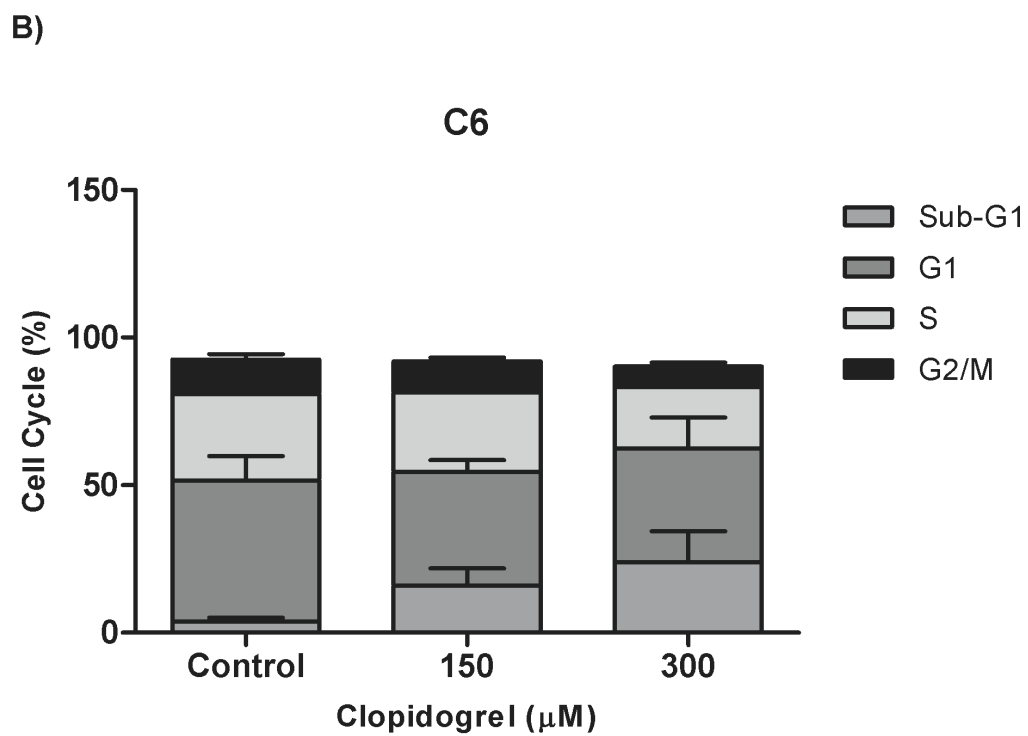
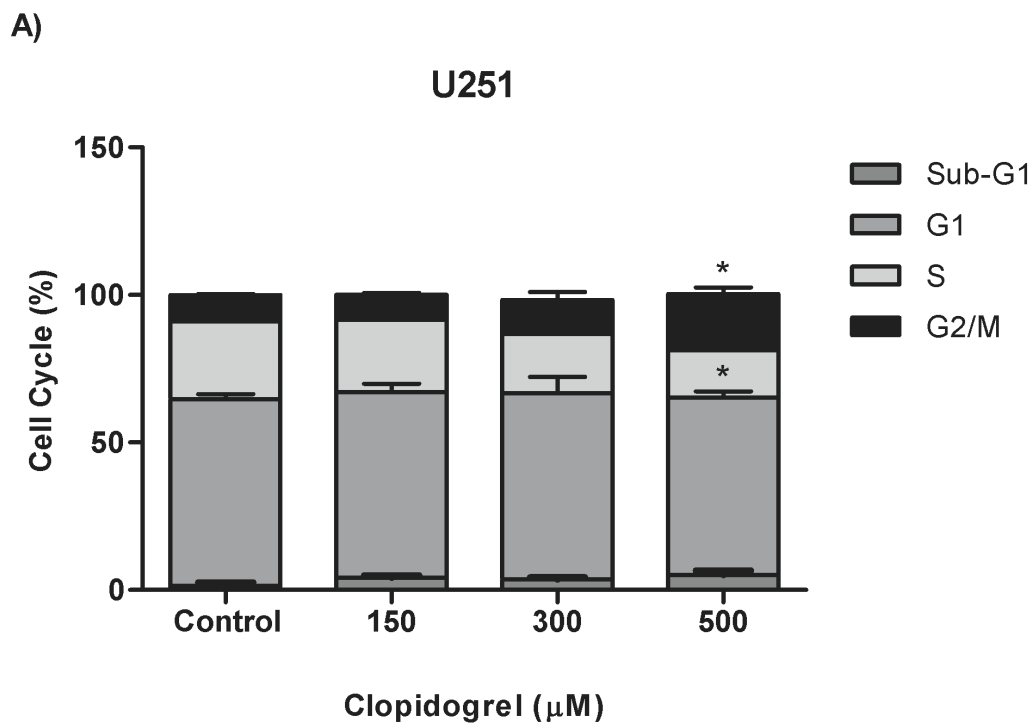




Figure 7.





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)