

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Matheus Henrique Jantsch

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO BISSULFATO DE CLOPIDOGREL
EM MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: ENVOLVIMENTO
DO SISTEMA PURINÉRGICO PLAQUETÁRIO**

**Santa Maria, RS
2022**

Matheus Henrique Jantsch

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO BISSULFATO DE CLOPIDOGREL
EM MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: ENVOLVIMENTO
DO SISTEMA PURINÉRGICO PLAQUETÁRIO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas; Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Chitolina

Santa Maria, RS

2022

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Jantsch, Matheus Henrique
Efeitos in vitro e in vivo do Bissulfato de Clopidogrel em modelo experimental de melanoma: envolvimento do sistema purinérgico plaquetário / Matheus Henrique Jantsch.- 2022.
81 p.; 30 cm

Orientadora: Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coorientadora: Maria Rosa Chitolina
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2022

1. Melanoma 2. Metástase 3. Plaquetas 4. Sistema Purinérgico 5. Bissulfato de Clopidogrel I. Leal, Daniela Bitencourt Rosa II. Chitolina, Maria Rosa III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MATHEUS HENRIQUE JANTSCH, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Matheus Henrique Jantsch

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO BISSULFATO DE CLOPIDOGREL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA
PURINÉRGICO PLAQUETÁRIO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas; Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica Toxicológica

Aprovado em 08 de agosto de 2022:

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Nathieli Bianchin Botari, Dra. (UFN)
(videoconferência)

Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dra. (UFSM)
(videoconferência)

**Santa Maria, RS
2022**

Dedico este trabalho a minha família, especialmente minha mãe Alice e a todos os colegas do LabiBio que contribuíram diretamente com minha formação e desejo assim, que qualquer pessoa possa ter essa mesma possibilidade.

AGRADECIMENTOS

Início os agradecimentos destacando que considero esta, uma das sessões mais valiosas da dissertação. Todo o desenvolvimento do meu mestrado foi realizado sob circunstância da Pandemia do COVID-19, que até o momento, levou a óbito 6,16 milhões de pessoas ao redor do mundo. Certamente, fazer um mestrado requer um trabalho árduo e apresenta certas dificuldades, e no meu caso, essas questões foram potencializadas por consequência do cenário pandêmico. No entanto, aos poucos o trabalho foi sendo executado e esse fechamento foi possível devido a colaboração de família, amigos e colegas.

Primeiramente devo agradecer minha mãe, Alice, e minha avó materna Hirmungarth que sempre possibilitaram que eu vivesse minhas vontades e aventuras, tanto pessoais quanto profissionais, seu apoio psicológico, financeiro e assistencial foi fundamental para o meu desenvolvimento.

Ao Anderson, agradeço pela parceria, pelos momentos de descontração e por estar sempre me acompanhando e seguindo ao meu lado.

A minha cachorrinha Sara, agradeço a companhia inseparável durante as atividades remotas e por ter tornado todo o isolamento pandêmico mais leve.

Aos meus amigos de Santa Maria agradeço por nossos momentos de amizade, e também, por sempre me acolherem na cidade.

Agradeço às minhas orientadoras Dr^a Maria Chitolina e Dr^a Daniela Leal, duas pesquisadoras de excelência e que sempre se mostraram dispostas a auxiliar da forma mais sensível possível, agradeço o acolhimento, a confiança, o apoio, o incentivo e a orientação.

Aos meus colegas do LabiBio, agradeço por terem me recebido e participado de toda minha trajetória acadêmica até aqui. Obrigado também, pelos ensinamentos, pela companhia diária, por aceitarem e terem se dedicado junto comigo a esse projeto e por terem tornados os dias de trabalho mais leves.

Agradeço à banca examinadora por aceitarem o convite e pelas contribuições que farão a este trabalho.

E por fim, agradeço a todos os demais professores e funcionários, assim como as instituições UFSM e IFFar e aos programas CAPES, CNPq e PIIQP por contribuírem para o progresso da educação e da ciência.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO BISSULFATO DE CLOPIDOGREL EM MODELO EXPERIMENTAL DE MELANOMA: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PURINÉRGICO PLAQUETÁRIO

AUTOR: Matheus Henrique Jantsch
ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

O melanoma é um tipo de câncer que ao evoluir para a forma metastática apresenta grande agressividade e torna os tratamentos antitumorais tradicionais menos eficazes. As plaquetas ativadas participam da progressão tumoral, através das interações celulares e da secreção de nucleotídeos e nucleosídeo, assim como, ATP, ADP e adenosina. A concentração extracelular dessas substâncias é controlada por enzimas que compõem o sistema purinérgico e estão presentes na superfície celular. Nucleotídeos e nucleosídeos interagem com receptores presentes na superfície de células e plaquetas e são reconhecidos como receptores purinérgicos. O bissulfato de clopidogrel (BC) é um inibidor do receptor purinérgico P2Y₁₂, podendo então ser utilizado para inibir a ativação das plaquetas. Assim, esse projeto teve como objetivo avaliar o efeito do BC *in vitro* e *in vivo* na progressão tumoral e na modulação das enzimas das vias purinérgicas (CD39, CD73, E-ADA) em plaquetas. O estudo *in vitro* foi conduzido com células B16-F10 tratadas com 7 concentrações de BC e avaliadas em 24h, 48h e 72h. O *in vivo* foi realizado com camundongos, C57BL-6, divididos em 4 grupos: controle negativo (C); controle melanoma (M); tratado com BC (BC); com melanoma tratado com BC (M+BC). A indução do câncer nos grupos com melanoma foi realizada a partir da administração de células B16-F10 via intraperitoneal. Após 2 dias, foi iniciado o tratamento com BC em 30mg/kg/dia por gavagem, durante 12 dias. Ao final deste período, os animais foram anestesiados e eutanasiados por exsanguinação para avaliação de parâmetros como: números de nódulos tumorais, peso dos órgãos, hemograma, quantificação de biomarcadores no plasma: lactato desidrogenase (LDH); óxido nítrico (ON); e espécies reativas de oxigênio (ROS) e avaliação da atividade de enzimas do sistema purinérgico (NTPDase, 5'-nucleotidase, E-ADA) em plaquetas. Nas culturas B16-F10 *in vitro* em 72h o BC reduziu a proliferação e aumentou a citotoxicidade das células em dosagens superiores a 30 µM. No *in vivo* o tratamento reduziu o número de nódulos tumorais, aumentou os níveis de NO e reduziu a atividade da LDH. No entanto, o tratamento com BC não foi eficiente em reduzir os efeitos sistêmicos da indução refletidos pelo hemograma e peso dos órgãos. Também foi observada uma maior atividade das enzimas purinérgicas das plaquetas quando comparadas aos grupos não tratados. Dessa forma, o tratamento com BC parece reduzir possíveis alterações relacionadas à progressão tumoral, sugerindo um efeito benéfico no tratamento do melanoma.

Palavras-chaves: melanoma; bissulfato de clopidogrel; plaquetas; sistema purinérgico;

ABSTRACT

***IN VITRO* AND *IN VIVO* EFFECTS OF CLOPIDOGREL BISSULFATE IN EXPERIMENTAL MODEL OF MELANOMA: INVOLVEMENT OF THE PLATELET PURINERGIC SYSTEM**

AUTHOR: Matheus Henrique Jantsch
ADVISOR: Prof. Dr.^a Daniela Bitencourt Rosa Leal

Melanoma is a type of cancer that, when it develops into the metastatic form, is very aggressive and makes conventional antitumor treatments less effective. Activated platelets are involved in tumor progression through cellular interactions and secretion of nucleosides and nucleotides, such as ATP, ADP, and adenosine. The extracellular concentration of these substances is controlled by enzymes that make up the purinergic system and are present on the cell surface. Nucleotides and nucleoside interact with receptors on the surface of cells and platelets and are recognized as purinergic receptors. Clopidogrel bisulfate (CB) is an inhibitor of the P2Y₁₂ purinergic receptor, so it can be used to inhibit platelet activation. Thus, this project aimed to investigate the effect of BC *in vitro* and *in vivo* on tumor progression and modulation of enzymes of the purinergic pathway (CD39, CD73, E-ADA) in platelets. The *in vitro* study was performed with B16-F10 cells treated with 7 concentrations of CB and assessed after 24h, 48h, and 72h. The *in vivo* study was conducted with mice (C57BL-6), which were divided into 4 groups: negative control (C); melanoma control (M); treated with CB (BC); with melanoma treated with BC (M+BC). Cancer induction in the groups with melanoma was performed by administration of B16-F10 cells by intraperitoneal route. After 2 days, treatment with BC at a dose of 30mg/kg/day was initiated by gavage for 12 days. At the end of this period, the animals were anesthetized and euthanized by exsanguination for evaluation of parameters such as tumor nodule count, organ weight, blood count, quantification of plasma biomarkers: lactate dehydrogenase (LDH); nitric oxide (NO); and reactive oxygen species (ROS), and assessment of the activity of enzymes of the purinergic system (NTPDase, 5'-nucleotidase, E-ADA) in platelets. In *in vitro* B16-F10 cultures, BC decreased proliferation in 72 h and increased cell cytotoxicity at doses greater than 30 μ M. *In vivo*, the treatment decreased tumor nodule count, increased NO levels, and decreased LDH activity. However, BC treatment was not effective in reducing the systemic effects of induction, as reflected in blood count and organ weights. Higher activity of purinergic enzymes in platelets was also observed compared to the untreated groups. Thus, BC treatment appears to reduce potential alterations associated with tumor progression, suggesting a beneficial effect in the treatment of melanoma.

Keywords: melanoma; clopidogrel bisulfate; platelets; purinergic system;

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Desenvolvimento do câncer.....	16
Figura 2: Estrutura da pele.....	20
Figura 3: Representação dos componentes do sistema purinérgico.....	27
Figura 4: Ativação e sinalização purinérgica nas plaquetas.....	28
Figura 5: Fórmula estrutural do bissulfato de clopidogrel.....	30

MANUSCRITO

Figura 1: Desenho esquemático do experimento <i>in vivo</i>	66
Figura 2: Teste MTT.....	67
Figura 3: LDH ensaio.....	68
Figura 4: ON ensaio.....	69
Figura 5: EROs ensaio.....	70
Figura 6: Avaliação do desenvolvimento tumoral.....	71
Figura 7: Avaliações de biomarcadores de plasma.....	71
Figura 8: Atividade de E-NTPDase e 5'-Nucleotidase em plaquetas.....	72
Figura 9: Atividade de E-ADA em plaquetas.....	72

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1: Peso corporal, peso dos órgãos e sua relação com o peso corporal de camundongos com melanoma e tratados com bissulfato de clopidogrel.....	64
--	----

Tabela 2: Parâmetros hematológicos de camundongos com melanoma e tratados com bissulfato de clopidogrel.....	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADO	Adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
B16-F10	Linhagem celular de melanoma
BC	Bissulfato de Clopidogrel
C57BL-6	Cepa de camundongo
CB	Bissulfato de Clopidogrel
CD39	NTPDase
CD73	Enzima ecto-5'-nucleotidase
CXCL5	Quimiocina CXCL-5
CXCL7 -	Quimiocina CXCL-7
CXCL-12	Quimiocina CXCL-12
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E-ADA	Enzima adenosina desaminase
E-NTPDase	Enzima ecto-nucleosideo difosfato difosfohidrolase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPIb-IX-V	Proteína de ligação plaquetária
GPIIb/IIIa	Proteína de ligação plaquetária
IL-1B	Citocina Interleucina 1
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mTOR	Proteína rapamicina de mamífero
NLR	Relação de neutrófilos com linfócitos
NK	Células natural-killer
ON	Óxido nítrico

PI3K	Proteína quinase B (Inositol 3-fosfato kinase)
P2Y	Receptor P2Y
P2Y12	Receptor P2Y12
PPP	Micropartículas derivadas de plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Radiação ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER.....	16
1.2 CÂNCER DE PELE MALANOMA	17
1.3 PROGRESSÃO DO MELANOMA.....	20
1.4 PLAQUETAS E CÂNCER	23
1.5 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS PLAQUETAS.....	27
1.6 BISSULFATO DE CLOPIDOGREL	30
2. OBJETIVOS	32
3. DESENVOLVIMENTO	33
4. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	81

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está dividida da seguinte maneira: *Introdução*, que traz uma síntese teórico-científica sobre o estudo, e *Objetivos*, geral e específicos, que abordam a finalidade da pesquisa. O *Desenvolvimento*, está representado por um manuscrito que inclui: os Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências. O manuscrito está formatado conforme as normas do periódico *Biochemistry and Cell Biology* ao qual foi submetido. A Conclusão apresenta a interpretação dos resultados encontrados, e por fim, as *Referências* trazem as citações mencionadas ao longo da Introdução.

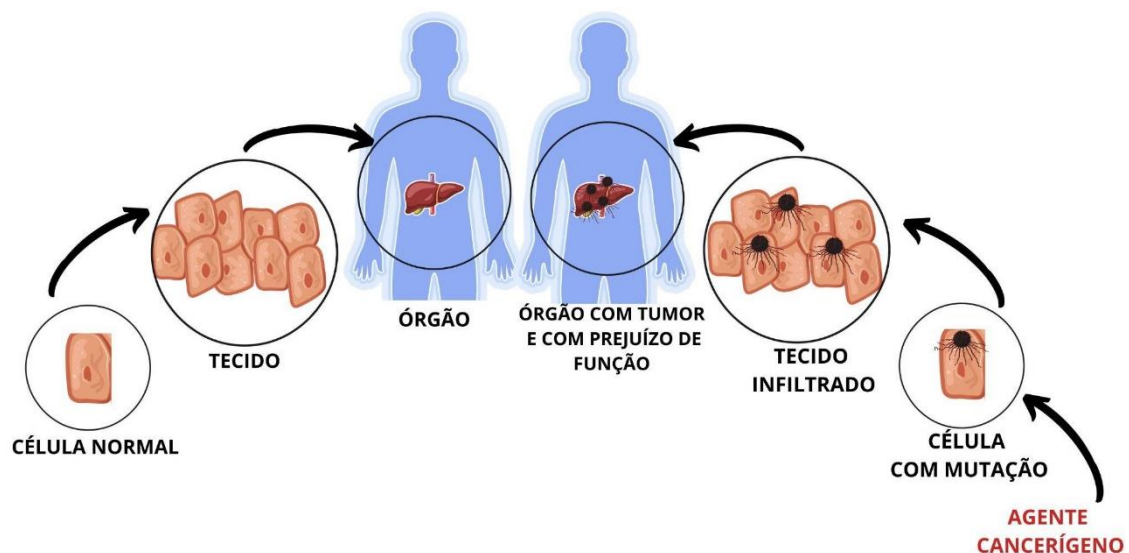
1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é um termo usado para definir um amplo conjunto de mais de 100 doenças malignas que apresentam em comum o desenvolvimento e crescimento irregular das células que compõe o organismo, estas, multiplicam-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, formando tumores e espalhando-se para outras regiões do corpo. Assim, os diferentes tipos de câncer são determinados pelas diferentes células afetadas e também por outras características como a velocidade de multiplicação das células e a sua capacidade metastática.

O desenvolvimento do câncer pode ser descrito em etapas (Figura 1). Primeiramente, as células que compõem o organismo são afetadas por agentes carcinogênicos e passam a desenvolver mutações em seu código genético, no DNA. Essas mutações levam a célula a apresentar disfunções e que muitas vezes promovem a multiplicação descontrolada. Nessa nova fase, as múltiplas células mutadas passam a infiltrar e compor o tecido e caracterizam o câncer, promovendo então as manifestações clínicas da doença através das disfunções nos órgãos em que estão inseridas. Por fim, as células cancerosas ainda podem se espalhar para outras regiões do corpo, promovendo a geração de múltiplos tumores no organismo (INCA, 2021) .

FIGURA 1: Desenvolvimento do câncer



Fonte: (Elaborado pelo autor, 2022)

O câncer apresenta uma crescente nos números de casos e óbitos no mundo todo, estimando-se que em 2020 mais de 19 milhões de novos casos foram diagnosticados e quase 10 milhões de óbitos registrados. Esse aumento está relacionado com o envelhecimento populacional, com a maior expectativa de vida, com mudanças de hábitos e à maior exposição aos fatores mutagênicos. Dessa forma, essa doença apresenta fortes impactos sociais, pessoais, financeiros e governamentais, tornando-se um problema de saúde pública e um desafio para o desenvolvimento humano e a ciência (SUNG *et al.*, 2021).

1.2 CÂNCER DE PELE MALANOMA

Dentre as os tipos de câncer, o de pele do tipo melanoma possui origem nos melanócitos e pode aparecer em qualquer parte do corpo, o surgimento espontâneo dessa doença já foi documentado em todas as classes de animais vertebrados como peixes (SWEET *et al.*, 2012), anfíbios (ZILAKOS e TSONIS, 1991) répteis (DE SANTI *et al.*, 2020) aves (KAJIGAYA *et al.*, 2010) e mamíferos diversos (MACEWEN, 1990). Para humanos, estima-se que cerca de 30% dos tumores registrados no Brasil sejam do tipo câncer de pele e 3% do tipo melanoma. Conforme Instituto Nacional do Câncer (2020) foram registrados 8.450 novos casos e 1978 óbitos em 2019. Sendo considerado muito grave, apresenta alta progressão para metástase, mas quando detectado em estágios iniciais o tratamento indica bom prognóstico (INCA, 2020).

Diferentemente dos outros tipos de cânceres com tumores sólidos, que costumam afetar a população mais idosa, o melanoma acomete principalmente adultos de meia-idade, com aumento linear do risco a partir dos 15 até os 50 anos, apresentam assim idade média mundial de diagnóstico de 57 anos, acometendo igualmente homens e mulheres e tendo uma sobrevida média estimada em 5 anos. (MARKOVIC *et al.*, 2007; RIES *et al.*, 2000).

Os principais fatores de risco associados ao melanoma são histórico familiar da doença, exposição a câmaras de bronzeamento, fenótipo de pele e olhos claros, presença de nevos (pintas) atípicas, imunossupressão e principalmente a exposição repetida e prolongado à radiação ultravioleta (UV), que está fortemente associada ao desenvolvimento da doença (MILLER e MIHM JR, 2006). A predominância e exposição dos fatores de risco na população do Rio Grande do Sul faz com que o

estado tenha uma média maior que a nacional em incidência do melanoma (COSTA e FREITAS, 2018).

Comumente, a manifestação do melanoma se dá em pele normal ou através de lesão pigmentada, com o aparecimento de uma pinta com bordas e coloração irregulares e a sintomatologia de coceira e descamação. A doença pode também progredir a partir da existência de lesão pigmentada pré-existente que apresenta aumento de tamanho e mudança de forma e coloração (UK, 2015).

O diagnóstico é realizado através de investigação clínica, associada à histopatologia, dermatoscopia e biópsia da lesão, que indicarão o tipo da doença, bem como o estágio em que se encontra (PSATY e HALPERN, 2009).

O autoexame é uma forma fundamental de identificação de lesões suspeitas e representa uma estratégia promissora na detecção precoce da doença. A presença de pinta ou lesão assimétrica, com um lado diferente de outro, com bordas irregulares, de contorno não definido, apresentação de várias cores na mesma lesão (avermelhada, azul, preta, castanha, branca), com tamanho de diâmetro maior que 6 milímetros e que vai mudando suas características conforme o tempo representam um sinal de alerta e necessitam de investigação (WATTS *et al.*, 2015).

Um método simples que ajuda a identificar lesões suspeitas de melanoma é a regra do ABCDE, em que cada letra, corresponde a uma característica existente na pinta de melanoma, a letra A refere-se à assimetria da lesão; B à bordas irregulares; C à variabilidade de cor; D ao diâmetro (suspeito maior que 6 mm); e a letra E refere-se à evolução da pinta (mudança com o passar do tempo). Sendo que a identificação apenas dos critérios A e C já pode ser suficiente para um indicativo de diagnóstico de melanoma (DOS SANTOS ROSSI *et al.* 2018).

Assim, o surgimento e o desenvolvimento do melanoma foram descritos pelo modelo de Clarck iniciando com a proliferação dos melanócitos no processo de formação de nevos, popularmente chamados de pintas, ou sinais na pele e desenvolvendo para displasia, hiperplasia, invasão e metástase (CLARK JR *et al.*, 1984).

O primeiro estágio do desenvolvimento do melanoma ocorre com a proliferação dos melanócitos, que mantêm sua estrutura normal, levando a formação de nevos benignos, pintas com bordas e coloração uniformes. Em seguida, os melanócitos tornam-se displásicos, assumindo formas e tamanhos diferentes que resultam em

lesões assimétricas, com nevos de bordas irregulares e com coloração diferenciada caracterizando, o segundo estágio. A terceira fase é descrita pelo crescimento horizontal da massa tumoral e pela invasão intraepidermal, o que resulta em lesões com relevo. O próximo estágio é marcado pelo crescimento vertical da massa tumoral, com a capacidade de invadir a derme e tecido adiposo tornando o nódulo expansivo. E então o melanoma avança para o quinto e último estágio, com a disseminação e evasão imune das células tumorais para outras regiões da pele e órgãos marcada pelo sucesso da proliferação e estabilização de metástases do melanoma em outros tecidos (MILLER e MIHM JR, 2006).

Grande parcela dos casos de melanoma é percebida acidentalmente pelos pacientes e familiares, destacando então a importância de conhecer a pele e estarem atentos aos sinais de alterações (YAGERMAN e MARGHOOB, 2013).

A pele é o maior órgão do corpo e recobre a totalidade da estrutura corporal e apresenta diversas funções biológicas que contribuem para a manutenção do organismo. A pele forma uma barreira e oferece assim proteção contra agentes externos físicos, químicos ou biológicos, e proteção contra radiação UV. Também fornece uma proteção interna, contribuindo para a manutenção da homeostase e hidratação do organismo. A pele também apresenta funções imunológicas, sensoriais e de termorregulação, participa na síntese de vitamina D, excreta algumas substâncias e também possui até a importância no comportamento social através de liberação de feromônios e hormônios contribuindo para comunicação e reprodução (SULLIVAN e MYERS, 2022).

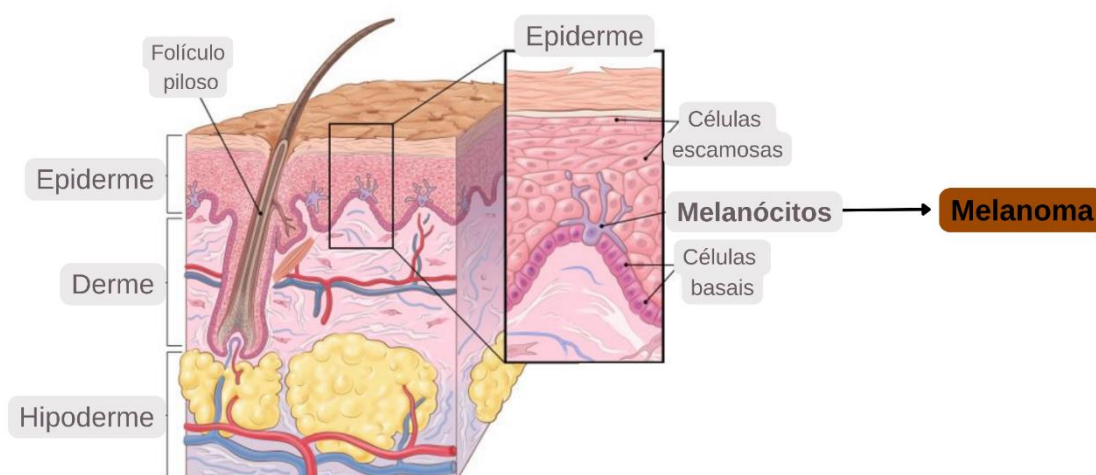
Quando íntegra, a pele apresenta uma divisão de três camadas: epiderme, derme e hipoderme (figura 2).

A epiderme representa a camada mais externa, apresentando a função de barreira protetora e ainda contando com células da imunidade inata, além de fornecer proteção contra a radiação UV. Essa camada apresenta um predomínio de três tipos celulares: os queratinócitos, são as células mais numerosas da epiderme, apresentam uma renovação constante e são produtoras da proteína fibrosa queratina que promove resistência e proteção; as células de Langerhans que são apresentadoras de antígeno, representam de 2 a 8% das células da epiderme e conferem proteção imune; e os melanócitos que são células dendríticas produtoras do pigmento melanina (GILABERTE *et al.*, 2016; SULLIVAN e MYERS, 2022).

A derme é um sistema integrado de fibras celulares e matrizes acelulares, é a camada mais larga da pele, acomodando vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas, além de servir como residência para fibroblastos, macrófagos, mastócitos e células imunes circulatórias. A derme é responsável pela elasticidade da pele, ajuda na manutenção da hidratação e controle térmico do corpo.

Já a hipoderme é majoritariamente composta por tecido adiposo, que promovem um isolamento térmico do corpo e possui também a função de reserva energética. Essa camada fornece proteção para a pele e é suporte para vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (KHAVKIN e ELLIS, 2011; SULLIVAN e MYERS, 2022).

FIGURA 2: Estrutura da pele



Fonte: (Adaptado de American Cancer Society, 2019)

1.3 PROGRESSÃO DO MELANOMA

O melanoma evolui a partir de alterações genéticas nos melanócitos que são células presentes principalmente no tecido epitelial, na região limítrofe entre a derme e epiderme. São produtoras de pigmento que possui funções protetoras contra a radiação UV e danos ao DNA. A exposição aos fatores de risco podem contribuir para

efeitos mutagênicos nessas células, resultando em proliferação celular descontrolada, e a defeitos na via de reparo de DNA, induzindo assim, mutações oncogênicas nos melanócitos e o surgimento da doença maligna definida como melanoma (SONG *et al.*, 2021).

A evolução de melanócitos para o melanoma e sua progressão é resultado de uma complexa cadeia de estimuladores endógenos e exógenos, e também de outros mediadores da própria condição tumoral e sua relação com o sistema imunológico (ZENG; *et al.*, 2020).

Comumente os melanócitos não apresentam uma divisão celular muito expressiva. No entanto, evidências apontam que essa capacidade de proliferar vai aumentando à medida que alterações nos melanócitos vão sendo desencadeadas. As alterações são associadas a mutações pontuais no DNA e que, conseqüentemente, geram um aumento do número de cópias das mutações e contribuem para uma maior divisão celular.

A exposição direta à radiação ultravioleta é apontada como um dos principais fatores mutacionais dos melanócitos, onde as mutações acumuladas nas células acabam sendo numerosas e destacam-se as alterações nas bases C para T como possível consequência da exposição à radiação UVB, e alterações nas bases G para T como possível efeito a exposição UVA. No entanto, outros fatores internos como a ação de radicais livres e interações bioquímicas com a melanina também podem gerar mutações e desordem genética nas células (SCHADENDORF *et al.*, 2018).

As alterações genéticas nos melanócitos levam a perturbações nas sinalizações intracelulares, as quais induzem mudanças que favorecem a função de um gene e que geram perda de função de outros (ZENG *et al.*, 2020). Essa complexa interação altera o ciclo celular dos melanócitos, bem como todo o processo envolvido na transcrição dos genes e remodelação da cromatina o que acaba por provocar um desequilíbrio na homeostase celular. Assim as funções básicas das células alteradas são desencadeadas pela superestimulação proteica com ação nas vias celulares afetadas (SHAIN *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2020).

Alterações proteicas também são destacadas através da superestimação recíproca de vias celulares, em especial a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a via fosfatidilinositol (PI3K), proteína -quinase-B (AKT) e via de

alvo de rapamicina de mamífero (mTOR), que controlam o ciclo celular e interferem no metabolismo, na sobrevivência e invasão dos melanócitos (ZENG *et al.*, 2020).

Outro ponto de destaque para o desenvolvimento do melanoma é a evasão imunológica. Os melanócitos mutados apresentam um reforço nos pontos de controle imunológico evitando assim, uma resposta mais efetiva do sistema imune contra a doença. A liberação de citocinas, como da classe dos interferons, inibe a atividade efetora de células T e conseqüentemente inibe a resposta imune antitumoral. Além disso, há também a relação com outros mecanismos imunossupressores como a regulação negativa de antígenos tumorais e a secreção de fatores inibitórios da imunidade (ALEXANDROV *et al.*, 2013; HODIS *et al.*, 2012; SHAIN *et al.*, 2015).

Assim, o progresso tumoral induz um processo inflamatório que influencia a promoção, o desenvolvimento, a invasão e metástase do câncer (GRIVENNIKOV. *et al.* 2010). Nesse contexto, a inflamação é um dos componentes críticos para a interação entre a resposta imune inata e adaptativa. Ambas desempenham um papel importante no controle do desenvolvimento do tumor, bem como na prevenção contra a malignidade do mesmo.

No desenvolvimento do melanoma, a inflamação é induzida pelo aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, e por danos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio (HOADLEY *et al.*, 2014). Por sua vez, o tumor induz a produção de substâncias inflamatórias pelos melanócitos e queratinócitos, as quais favorecem a promoção e o crescimento tumoral. Assim, o microambiente tumoral contribui para a manutenção do processo inflamatório e desenvolvimento do tumor, contendo células da imunidade inata e adaptativa (incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, derivados de células mieloides, células supressoras, células dendríticas e células natural killer, linfócitos T e B), além de células cancerosas, seu estroma circundante e plaquetas (GRIVENNIKOV *et al.*, 2010).

Essas células comunicam-se através de produção de citocinas, quimiocinas e contato direto, de maneira autócrina e parácrina, contribuindo para a modulação e o controle do crescimento tumoral. Dessa forma, é a expressão de vários mediadores e moduladores imunológicos, associados com a ativação dos diferentes tipos celulares do microambiente, que conduz a imunidade antitumoral, manutenção da inflamação e progressão do tumor (LIN e KARIN, 2007; SMYTH *et al.*, 2006).

1.4 PLAQUETAS E CÂNCER

As plaquetas são fragmentos de megacariócitos circulantes na corrente sanguínea e atuam como sentinelas de dano tecidual. Possuem importante função no controle homeostático e também atuam no processo inflamatório, contribuindo para a formação do microambiente tumoral e patogênese das doenças tumorais (CAMILLI, M. *et al.*, 2021; CASTRO *et al.*, 2006). Os megacariócitos são células presentes na medula óssea, apresentam grande tamanho (20 µm de diâmetro), possuem núcleo poliplóide e um citoplasma bem subdividido com membranas em formato ondulado. A ruptura da membrana plasmática dos megacariócitos leva à geração de fragmentos anucleados as plaquetas (GARCÍA e COMA, 2000).

Juntamente com eritrócitos e leucócitos, as plaquetas estão presentes principalmente no tecido sanguíneo e circulam no sangue com formato de disco bicôncavo, apresentando cerca de 3 µm² de diâmetro e 4-7 µm³ de volume. Em condições fisiológicas normais apresenta uma concentração no sangue estável e apresentam tempo de vida média no sangue de 7 à 10 dias quando então, são retiradas pelas células do baço e fígado. Assim, 70 % das plaquetas estão presentes no sangue e 30% no baço (CASTRO *et al.*, 2006; GARCÍA e COMA, 2000).

As plaquetas apresentam importante função no controle da homeostasia. Seu mais conhecido papel é o controle de sangramento, situação na qual, ocorre a formação de trombo plaquetário diante de dano ou lesão no endotélio vascular, com a finalidade de realizar o controle do sangramento. Esse processo se dá através ligação de moléculas sinalizadoras, como proteases, nucleotídeo ADP, trombina e colágeno à receptores existentes na membrana plasmática das plaquetas. Então, os fragmentos plaquetários sofrem uma alteração morfológica, amplificam os sinais de dano endotelial, iniciam a adesão plaquetária com recrutamento de plaquetas adicionais e resultam na formação de um agregado plaquetário que se ligam ao sítio da lesão promovendo a contenção do extravasamento sanguíneo (BOZZA *et al.*, 2009).

Estudos recentes trazem as plaquetas como componentes ativos do sistema imunológico, apresentando participação ativa em processos inflamatórios, uma vez que, as plaquetas possuem a capacidade de interagir diretamente ou indiretamente com outras células e de responder a estímulos externos derivados de outras células, como os leucócitos, macrófagos e células dendríticas (CAMILLI *et al.*, 2021;

OLIVEIRA *et al.*, 2013). As plaquetas apresentam um ponto de conexão entre inflamação e câncer. Quando ativadas promovem a liberação de substâncias que desencadeiam uma regulação da resposta imune e da inflamação. Assim, podem participar da cascata de inflamação através da secreção de citocinas, moléculas e do conteúdo dos grânulos α , e que podem promover a interação, ativação e migração de leucócitos assim como estimular a secreção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (ON) agindo sobre a vascularização e potencializando a inflamação (CAMILLI *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Ainda, existem evidências que mostram que as plaquetas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer, contribuindo para progressão e disseminação, através de uma comunicação mútua com as células tumorais. Assim, as plaquetas ativadas regulam a hematopoiese e migração de células imunes para o microambiente tumoral, contribuindo então para manutenção da inflamação, manutenção do tumor e disseminação do câncer para outras partes do corpo.

As células cancerígenas conseguem influenciar o comportamento das plaquetas através da ativação e formação de agregados mantendo assim uma mútua comunicação. Essas relações plaquetárias promovem grandes vantagens para o câncer como aceleração do crescimento, invasão e disseminação. As células tumorais podem expressar um fator tecidual que é o principal ativador da via coagulativa, gerando assim uma grande sinalização de trombina, uma enzima chave de cascata de coagulação que amplifica a ativação das plaquetas e promove a agregação plaquetária induzida por células tumorais (MITRUGNO *et al.*, 2019; OLEKSOWICZ e DUTCHER, 1995; WANG *et al.*, 2013; YAN e JURASZ, 2016).

Quando ativadas, as plaquetas liberam ADP que apresenta um efeito pró-agregador e sustentam a mútua comunicação das plaquetas com células tumorais, induzindo mais secreção de ADP gerando um feedback positivo. Assim a ativação das plaquetas leva à ativação de proteínas de ligação na superfície das plaquetas como GPIb-IX-V, GPIIb/IIIa, e P-selectina, as quais têm demonstrado um papel crucial na formação das agregações plaquetárias induzidas por células tumorais (OLEKSOWICZ e DUTCHER, 1995; YAN e JURASZ, 2016).

As plaquetas também geram um efeito direto sobre as células tumorais, através de sua presença no microambiente tumoral e ação pró-inflamatória. As células tumorais induzem a ativação das plaquetas e a liberação de seus grânulos que contêm

citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (LABELLE. *et al.*, 2014; MITRUGNO *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2010). A liberação das quimiocinas CXCL5 e CXCL7 recrutam granulócitos em locais distantes e começam a configurar o nicho pré-metastático. Enquanto a quimiocina CXCL12 promove a atração de células imunes como células B, células T e alteram células progenitoras na medula óssea, IL-1 induz a expressão de proteínas de adesão de leucócitos e células endoteliais. A secreção da citocina TGF- β , ON e outros fatores de crescimento promovem angiogênese, sobrevivência e proliferação das células tumorais (LABELLE *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2010).

Então, quando as células tumorais atingem a corrente sanguínea as plaquetas auxiliam também no processo de metástase. As plaquetas ativadas transferem O-selectina dos grânulos- α para a superfície da membrana celular e as glicoproteínas GPIIb/IIIa e outras integrinas formam complexos de ligação com outras plaquetas, células tumorais, e leucócitos (KOPP *et al.*, 2009; MENTER *et al.*, 2017; PLACKE *et al.*, 2012). Esses complexos formam uma barreira física e impedem a ação de células imunes, através da secreção de TGF- β que suprime a citotoxicidade mediada por NK e a ação de linfócitos, favorecendo assim a sobrevivência e disseminação do câncer. Além disso, as plaquetas também transferem para as células tumorais o MHC de classe 1 que confere um fenótipo pseudonormal do organismo dificultando a identificação do câncer pelo sistema imune e promovendo o escape imunológico para formar metástase (CAMILLI *et al.*, 2021; KOPP *et al.*, 2009; MENTER *et al.*, 2017; PLACKE *et al.*, 2012).

Seguindo a progressão tumoral, as plaquetas ativadas ativam proteínas ligações e secretam moléculas como ATP, ADP, ADO, ON, quimiocinas e citocinas que norteiam a progressão do câncer e promovem um ambiente inflamatório favorável para o crescimento tumoral e assim medeiam a fixação e a transmigração das células tumorais ao endotélio, e ainda a fixação das células tumorais aos novos tecidos, bem como, a angiogênese e a promoção do crescimento e desenvolvimento dessa nova massa tumoral (CAMILLI *et al.*, 2021; GEBREMESKEL *et al.*, 2015).

Assim, os processos patológicos que geram inflamação e dano epitelial desencadeiam a liberação de moléculas que atuam como sinalizadoras e geram a ativação das plaquetas, que então amplificam essa sinalização. Nessas condições, as plaquetas liberam substâncias a partir dos seus grânulos intracelulares, incluindo ATP e ADP, que se ligam a receptores purinérgicos específicos como P2Y1, P2X1 e P2Y12

que direcionam a ativação das plaquetas (COLGAN *et al.*, 2006; SANTANA *et al.*, 2020).

A ativação das plaquetas por ADP parece estar relacionada com dois receptores purinérgicos do tipo P2 o P2Y1 e o P2Y12, ambos acoplados com proteínas G. Há evidências que sugerem que a ativação de ambos os receptores é necessária para promover a agregação das plaquetas (WOULFE *et al.*, 2001). O P2Y1 está acoplado à proteína Gq e é responsável pela alteração da forma das plaquetas e alteração no fluxo de Ca²⁺. O receptor P2Y12 está associado à proteína Gi e sua ativação por ADP altera a enzima Fosfolipase C e inibe a formação de AMPc pela inibição da enzima Adenilil Ciclase, promovendo assim, a ativação das plaquetas, ativação de proteínas de ligação e a secreção de citocinas, quimiocinas, grânulos densos e nucleotídeos e nucleosídeo. Assim a inativação de um dos receptores leva à inibição da atividade das plaquetas (WOULFE *et al.*, 2001).

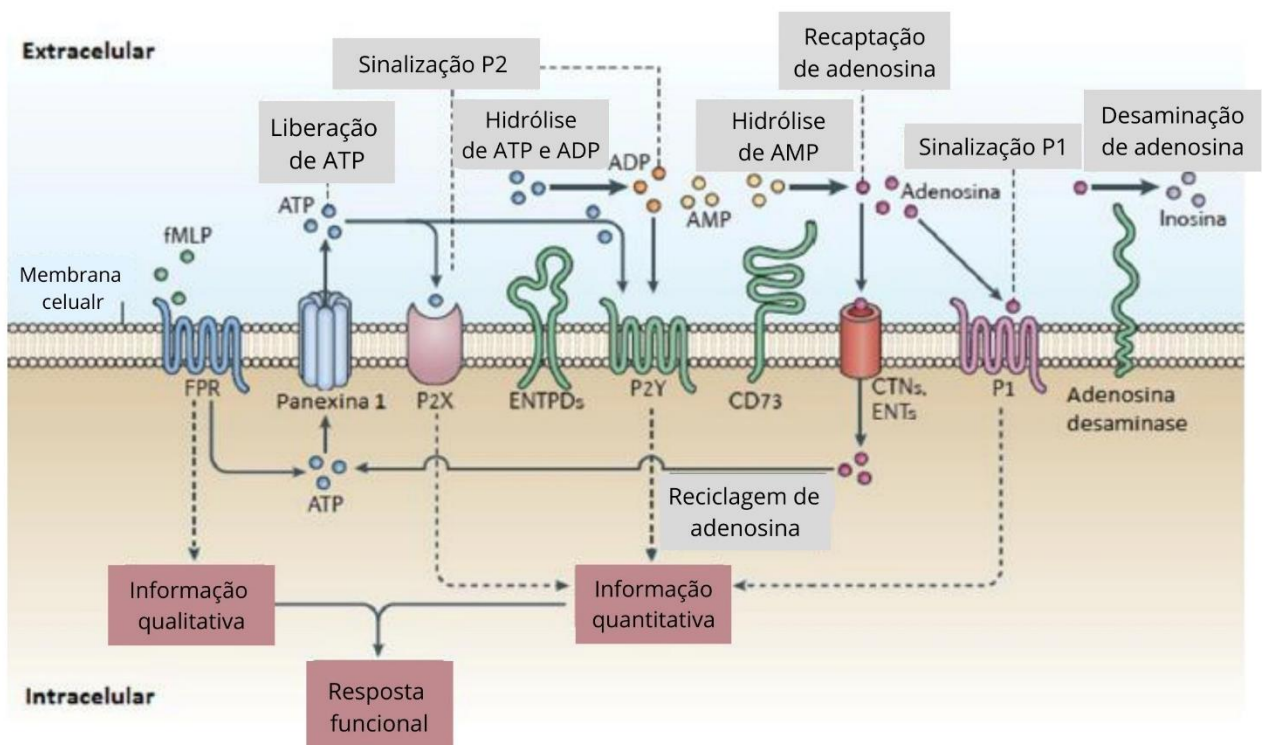
A ligação do ADP simultânea aos receptores P2Y12 e P2Y1 atua como promotor da agregação plaquetária através de estimulação de proteínas de adesão e liberação de substâncias. A via do P2Y12 gera a ativação dos receptores de fibrinogênio (complexo glicoproteico GPIIb/IIIa) que medeiam a adesão, e as agregações plaquetárias, enquanto a sinalização via P2Y1 promove a ativação da enzima Fosfolipase C que atua promovendo uma sinalização intracelular e está relacionado com a mudança morfológica das plaquetas (COLGAN *et al.*, 2006; DORSAM e KUNAPULI, 2004; ELTZSCHIG *et al.*, 2012). A utilização de antagonistas de P2Y12 promove um efeito redutor da ativação das plaquetas, uma vez que esse receptor se apresenta como um dos principais mecanismos de sinalização que promovem a hiperatividade das plaquetas (NAGY JR *et al.*, 2011).

Os receptores plaquetários P2Y12 desempenham papel central na amplificação da agregação induzida por todos os agonistas plaquetários, como a adenosina difosfato, o colágeno, tromboxano A₂, adrenalina e serotonina. Por esse motivo, têm sido o principal alvo das drogas antiplaquetárias. O receptor P2Y12 é encontrado principalmente na superfície de plaquetas, cérebro e músculo liso, possui sete domínios transmembrana e é considerado um forte quimiorreceptor para o ADP, sendo portanto um alvo para modulação da resposta plaquetária (COLGAN *et al.*, 2006; DORSAM e KUNAPULI, 2004; HOLLOPETER *et al.*, 2001).

1.5 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS PLAQUETAS

Entre os mecanismos bioquímicos capazes de modular a atividade e função das plaquetas estão a inibição dos receptores e modulação das enzimas do sistema purinérgico. O sistema purinérgico é um importante mecanismo de modulação da resposta imunológica e ativação celular. Além disso, há estudos demonstrando as funções patofisiológicas da sinalização purinérgica e seu potencial terapêutico para diversas doenças, inclusive o câncer (BURNSTOCK e DI VIRGILIO, 2013). O sistema purinérgico é constituído por enzimas, nucleotídeos, nucleosídeos e receptores purinérgicos (Figura 3). As enzimas atuam na regulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos, as quais são moléculas sinalizadoras autócrinas e/ou parácrinas e a medida em que as moléculas se ligam aos receptores específicos, geram uma resposta funcional na célula.

FIGURA 3: Representação dos componentes do sistema purinérgico

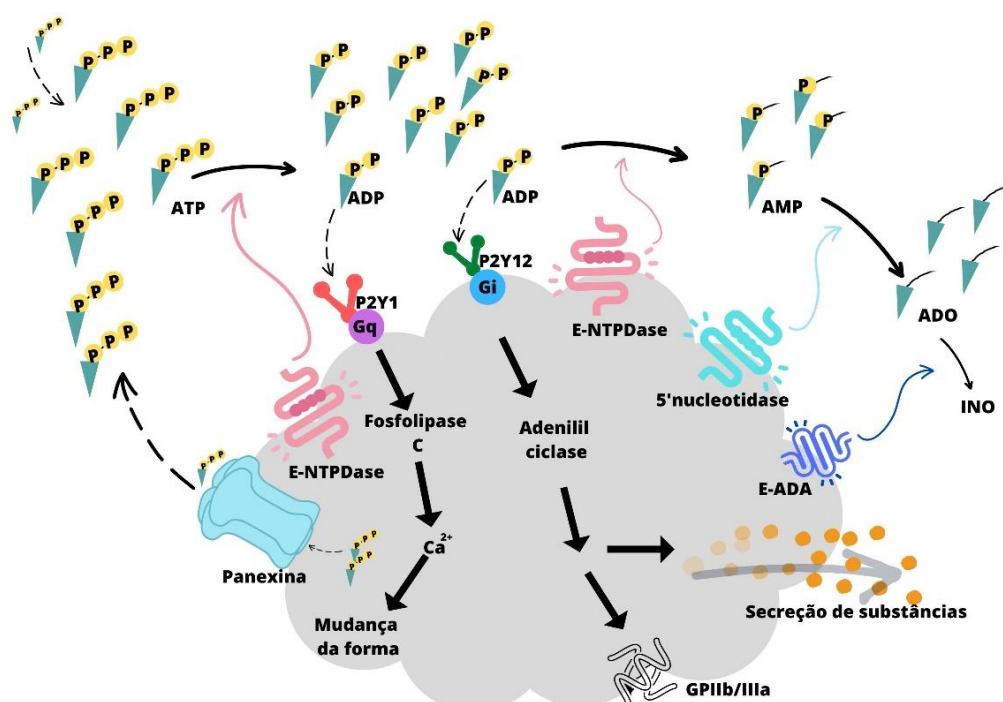


Fonte: (Adaptado de JUNGER, 2011, p.202)

A enzima ectonucleosídeo-trifosfato-difosfoidrolase (E-NTPDase, CD39, EC 3.6.1.5) catalisa a desfosforilação sequencial do nucleosídeo trifosfato de adenosina (ATP em ADP em AMP), enquanto a enzima 5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5) catalisa a desfosforilação do nucleosídeo monofosfato (AMP em ADO) e a enzima adenosina desaminase (ADA, EC 3.5.4.4), a desaminação da adenosina (ADO) em inosina (COLGAN *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, 2001). Os nucleotídeos e o nucleosídeo de adenina, os quais têm suas concentrações extracelulares reguladas pelas atividades dessas enzimas, são ligantes e agonistas endógenos de receptores purinérgicos ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P1, P2Y) (COLGAN *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008; ZIMMERMANN, 2001).

A ligação dos nucleotídeos e nucleosídeo aos receptores purinérgicos, resultam uma grande variedade de respostas, como estimulação do crescimento ou apoptose, quimiotaxia para a diferenciação das células, nocicepção à liberação de citocinas e neurotransmissão (BURNSTOCK e DI VIRGILIO,). As enzimas purinérgicas também desempenham um papel fundamental no controle da homeostasia plaquetária e sua relação com a progressão do câncer. A enzima NTPDase atua sobre as concentrações de ATP e ADP e podem contribuir para uma reduzida ativação plaquetária e seus efeitos (Figura 4).

FIGURA 4: Ativação e sinalização purinérgica nas plaquetas



Fonte: (Elaborado pelo autor)

Os nucleotídeos de adenina (ATP, AMP e ADP) e seu derivado adenosina, são secretados por plaquetas, leucócitos e células endoteliais. Representam uma importante classe de moléculas extracelulares que desempenham um papel importante na modulação da resposta imune e ativação celular (BURNSTOCK e DI VIRGILIO, 2013; KOSZAŁKA *et al.*, 2015). Essas moléculas interagem com os receptores purinérgicos presentes na superfície celular e desencadeiam uma cascata de eventos que modulam diversos processos biológicos como a agregação plaquetária e a inflamação (BURNSTOCK e DI VIRGILIO, 2013; ROBSON *et al.*, 2006).

Altos níveis de ATP podem levar a respostas de inflamação crônica em pacientes com melanoma, como demonstrado em estudo recente por Manica e colaboradores (2018). Sabe-se ainda que o processo inflamatório crônico e a ativação fatores de transcrição podem favorecer o desenvolvimento tumoral (MANICA *et al.*, 2018; TANIGUCHI e KARIN, 2018).

O ADP no meio extracelular atua como mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregador após danos teciduais. Dessa forma, o ADP pode apresentar capacidade de modular a interação de plaquetas com células cancerosas e, portanto, a metástase, através do reconhecimento pelos receptores purinérgicos P2Y1 e P2Y12 presentes nas plaquetas. A sinalização via P2Y12 amplifica a agregação e a secreção plaquetária, sendo que estudos mostram que as plaquetas ativadas contribuem com a secreção de moléculas de ADP e ATP que contribuem com a progressão tumoral e angiogênese (GEBREMESKEL *et al.*, 2015). A adenosina, metabólito da degradação de nucleotídeos da adenina, desempenha funções importantes como efeitos na regulação de processos inflamatórios, na vasodilatação, na quimiotaxia e na imunossupressão (BOURS *et al.*, 2006; DI VIRGILIO e VUERICH, 2015).

Em plaquetas, o ADP liberado dos grânulos densos liga-se aos receptores purinérgicos e induz o processo de ativação plaquetária, agregação, secreção de grânulos plaquetários, ligação com células do sistema imunológico, como os neutrófilos, e ligação com células tumorais. O receptor P2Y12 é responsável por iniciar a transdução do sinal através de um GPCR, iniciando a cascata de agregação plaquetária. Desse modo, é alvo de eficientes agentes antitrombóticos, como o clopidogrel, que inibe a ligação do ADP ao P2Y12 e conseqüentemente a agregação

ativação plaquetária, podendo ter um possível efeito anticancerígeno. Além disso, estudos com modelo metastático de câncer de pulmão demonstraram o importante envolvimento do P2Y12 na progressão da metástase (SAVI *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2013).

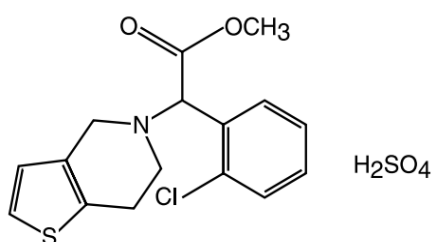
1.6 BISSULFATO DE CLOPIDOGREL

O clopidogrel é um fármaco comumente utilizado para prevenção de eventos trombóticos como isquemia, enfarto agudo do miocárdio, ataque vascular encefálico e angina de peito instável, através de sua ação antiplaquetária que diminui a formação de trombos e adesão plaquetária (COUKELL e MARKHAM, 1997).

A busca por novos e mais potentes agentes antiplaquetários através dos clássicos químicos tienopiridinas levou à descoberta do clopidogrel (HERBERT, 1993). Um agente inibidor da interação do ADP com o receptor plaquetário P2Y12 classificado então como um potente e irreversível agente antiplaquetário (COUKELL e MARKHAM, 1997). O clopidogrel é um fármaco que apresenta a capacidade de ligar-se ao receptor purinérgico P2Y12, inibindo assim sua ligação com ADP, e consequentemente a ativação plaquetária. A droga atua de modo substancial na inibição plaquetária, aumentando seu efeito de forma progressiva (COUKELL e MARKHAM, 1997).

Equivalente ao clopidogrel, o bissulfato de clopidogrel (Figura 5) apresenta massa molecular de 419g/mol, com nome químico oficial de ácido (+) - a- (2- clorofenil) -6,7-di-hidrotieno [3,2-c] piridina-5 (4H) -acético sulfato de éster metílico com fórmula molecular $C_{16}H_{16}ClNO_2S \cdot H_2SO_4$. (SANDOZ BRASIL INDÚSTRIA FARMACÊTICA, 1999).

FIGURA 5: Fórmula estrutural do bissulfato de clopidogrel



Fonte: (SANDOZ, 1999)

Apresenta-se como um pó branco, levemente amarelado, comumente administrado por via oral. Sua absorção se dá pelo intestino onde é direcionado para a corrente sanguínea. Para exercer seu papel de inibidor do P2Y₁₂ o fármaco é metabolizado por citocromos do tipo P450, principalmente, CYP2C19 e CYP3A4 que estão presente no tecido hepático. Após a metabolização, aproximadamente 15% do fármaco torna-se biodisponível para ação terapêutica e o restante é inativado por enzimas enterases na corrente sanguínea (JIANG *et al.*, 2016; KAZUI *et al.*, 2010).

Sua ação de inibição plaquetária se dá através da ligação ao receptor P2Y₁₂, através de ligação de pontes dissulfeto de um grupo tiol presente no metabólito ativo a dois resíduos de cisteína existentes no domínio extracelular do receptor P2Y₁₂, o que resulta em bloqueio da ativação das plaquetas induzido por ADP (SAHOO *et al.*, 2014). O princípio ativo liga-se ao receptor de forma irreversível e, portanto, apresenta tempo de ação equivalente à vida útil das plaquetas, que é aproximadamente de 7 dias (BROWN *et al.*, 2015). Dessa forma a interação do bissulfato de clopidogrel com o receptor é um bom mecanismo para avaliação da inibição do receptor P2Y₁₂ nas plaquetas e seu efeito no desenvolvimento do câncer.

O tratamento do melanoma depende do estágio da doença, comumente, se dá através de remoção cirúrgica da lesão, associado à quimioterapia e radioterapia. Apesar de existirem novos medicamentos com boas taxas de sucesso terapêutico, quando em estágio metastático a doença tende a apresentar uma alta agressividade e prognóstico desfavorável (INCA, 2018). Nesse sentido, a busca por novos tratamentos adjuvantes torna-se primordial para somar esforços contra o câncer.

Assim, hipotenzamos que o fármaco bissulfato de clopidogrel pode modular o sistema purinérgico das plaquetas, interferindo no desenvolvimento do melanoma, no estabelecimento das metástases do câncer, podendo apresentar uma ação benéfica contra os efeitos sistêmicos da indução do melanoma.

Portanto, através desse projeto propõe-se avaliar o efeito do bissulfato de clopidogrel como um possível reposicionamento de fármaco com ação terapêutica no melanoma, através da modulação das enzimas purinérgicas das plaquetas.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do bissulfato de clopidogrel *in vitro* e *in vivo* sobre o desenvolvimento do melanoma e metabolismo de purinas nas plaquetas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do bissulfato de clopidogrel sobre a viabilidade, produção de ROS, LDH e ON em células B16-F10.
- Avaliar o desenvolvimento dos tumores em animais submetidos à indução do melanoma e tratados ou não com bissulfato de clopidogrel.
- Avaliar parâmetros de peso corporal, peso dos órgãos e suas relações com peso corporal em animais submetidos à indução do melanoma e tratados ou não com bissulfato de clopidogrel.
- Avaliar parâmetros hematológicos em animais submetidos à indução do melanoma e tratados ou não com bissulfato de clopidogrel.
- Avaliar LDH, ON e EROs em plasma de animais submetidos à indução do melanoma e tratados ou com bissulfato de clopidogrel.
- Avaliar a atividade das enzimas da via purinérgica, E-NTPDase, 5'-Nucleotidase e E-ADA, em plaquetas de animais submetidos à indução do melanoma e tratados ou não com bissulfato de clopidogrel.

3. DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento deste estudo está organizado na forma de um manuscrito intitulado: **Effects of Clopidogrel Bisulfate on B16-F10 cells in platelet purine metabolism and tumoral nodule count in a murine model of melanoma**. Que está submetido no periódico: **Biochemistry and Cell Biology**.

**Effects of Clopidogrel Bisulfate on B16-F10 cells in platelet purine metabolism
and tumoral nodule count in a murine model of melanoma**

Matheus Henrique Jantsch^{a,b,c}, Pedro Henrique Doleski^{a,d}, Altevir Rossato Viana^f, Jean Lucas Gutknecht da Silva^b; Daniela Ferreira Passos^{a,b}, Fernanda Licker Cabral^{a,d}, Alessandra Guedez Manzoni, Renan Ebone^{a,b}; Bárbara Uchoa^e; Cíntia Melazzo de Andrade^{a,e} Maria Rosa Chitolina Schetinger^b, Daniela Bitencourt Rosa Leal^{a,b,d}

^aLaboratório de Imunobiologia Experimental e Aplicada (LABIBIO), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^cInstituto Federal Farroupilha, Campus Santo Ângelo, Santo Ângelo, RS, Brasil

^dPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^eHospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^fPrograma de Pós-graduação em Nanociências; Laboratório de Biociências. Universidade Franciscana, Santa Maria, RS, Brasil.

Author Correspondente

Prof. Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal (daniela.leal@ufsm.br) Departamento de Microbiologia e Parasitologia/CCS/UFSM - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - Brazil Prédio 20 – Sala 4237 – Phone: + 55 55 3220 9581

Summary

Metastatic melanoma is a very aggressive skin cancer. Platelets are constituents of the tumor microenvironment and, when activated, contribute to cancer progression, especially metastasis and inflammation. P2Y₁₂ is an adenosine diphosphate (ADP) receptor that triggers platelet activation. Inhibition of P2Y₁₂ by clopidogrel bisulfate decreases platelet activation, which is also controlled by the extracellular concentration and the metabolism of purines by purinergic enzymes. We evaluated the effects of clopidogrel bisulfate on the viability and cytotoxicity of cultured B16-F10 cells. We also used a metastatic model of melanoma with C57BL-6 mice to evaluate cancer development and the modulation of platelet purine metabolism. B16-F10 cells were administered intraperitoneally to the mice and, after 2 days, a 12-day treatment with clopidogrel bisulfate (30 mg/kg by gavage) followed. We found that clopidogrel bisulfate reduced cell proliferation and increased cytotoxicity in B16F10 culture within 72h at dosages above 30 μ M. In vivo, clopidogrel bisulfate decreased the tumor nodule counts and LDH levels and increased platelet purine metabolism. Our results showed that the clopidogrel bisulfate has significant effects on melanoma progression.

Words: Melanoma; Platelets; P2Y₁₂; Clopidogrel Bisulfate; Purinergic Enzymes

1. Introduction

Melanocytes are cells mainly present in the epithelial tissue that produce protective pigment against UV radiation. However, endogenous and exogenous factors, such as genetic predisposition and UV radiation, may trigger mutations in these cells, leading to a malignant disease defined as melanoma (SONG *et al.*, 2021). In the absence of early treatment, melanoma progresses to metastasis, which tends to be very aggressive and associated with a poor prognosis (CLARK *et al.*, 1984; CONTURSI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019). In melanoma, inflammation, mediated by tumor microenvironment and changes in blood flow, vascular permeability, reactive oxygen species generation, and cellular activation, is one of the critical components of the immune response that controls tumor development (HOADLEY *et al.*, 2014). The tumor microenvironment is composed of leukocytes, cancer cells, their surrounding stroma, and platelets, which contribute to the maintenance of the inflammatory process and progression of cancer (GRIVENNIKOV, GRETEN, & KARIN, 2010). Platelets interact with inflammatory and cancer cells, which may increase metastatic capacity (MENDOZA, 2022). Evidence shows that activated platelets contribute to tumor growth and metastasis by assisting cancer cells with mobility, immune evasion, and adhesion to new tissues mediated by the release of granules containing ADP, growth factors, platelet-derived microparticles (PPP), and cytokines. Such actions may prompt platelets to boost cancer progression (GEBREMSKEL *et al.*, 2015; GEBREMSKEL *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; STONE *et al.*, 2012).

Among the factors that modulate the activity and function of platelets is the purinergic system, which is an important mechanism for controlling cellular activation (BURNSTOCK & DI VIRGILIO, 2013). The purinergic system consists of adenine nucleotides and nucleosides, their receptors, and the enzymes that regulate these

purines' extracellular levels. In the extracellular milieu, adenosine 5'-diphosphate (ADP) is a primary mediator of platelet activation. ADP interacts with the P2Y₁₂ purinergic receptor in platelets, triggering the secretion of mediators that influence tumor progression and angiogenesis. Thus, ADP may modulate the interaction of platelets with cancer cells and influence the metastatic process (GEBREMESKEL *et al.*, 2015; GEBREMESKEL *et al.*, 2018). Specific antithrombotic agents (such as clopidogrel bisulfate) target P2Y₁₂, preventing ADP from binding to this receptor, thereby controlling platelet activation. Clopidogrel bisulfate is a potent irreversible inhibitor of P2Y₁₂, acts substantially on platelet inhibition and is usually prescribed to prevent acute myocardial infarction, stroke, and other diseases that cause blood vessel obstruction. Such effect by clopidogrel bisulfate is a valuable mechanism to evaluate the action of platelets in cancer progression (COUKELL & MARKHAM, 1997; SANGKUHL; KLEIN & ALTMAN, 2010). Alternatively, platelet activation may be modulated by purinergic enzymes. The sequential dephosphorylation of adenosine nucleoside triphosphate (ATP) reduces ATP receptor (P2) signaling in platelets. ATP is dephosphorylated into ADP and adenosine nucleoside monophosphate (AMP) by ectonucleoside-triphosphate-diphosphohydrolase (E-NTPDase, CD39, EC 3.6.1.5). Next, AMP is dephosphorylated into adenosine (ADO) by 5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.3.5). ADO bioavailability is controlled by adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) which deaminates ADO into inosine (ZIMMERMANN, 2001; COLGAN *et al.*, 2006; YEGUTKIN, 2008).

Considering the importance of platelets and the role of purinergic signaling in cancer development, it became an important therapeutic target for regulating cancer progression (Battastini *et al.*, 2021). The current therapeutic options available are not as efficient in treating metastatic melanoma. In this sense, the search for new and

adjuvant therapeutics is necessary. Thus, we aimed to assess the effects of clopidogrel bisulfate on the culture of B16-F10 cells and *in vivo* in a murine melanoma model by evaluating the metastatic process, platelet purine metabolism, and inflammation.

2. Methods

2.1 Chemicals

Clopidogrel bisulfate (CAS n^o 120202-66-6) was acquired by Sigma Aldrich. Lactate Dehydrogenase (LDH) UV assay was acquired by BioClin. Bovine serum albumin, Coomassie Brilliant Blue G, dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), Griess reagent, Adenosine 5'-monophosphate, Adenosine 5'-diphosphate, Adenosine 5'-triphosphate, and Adenosine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All chemicals employed in the experiments performed in this work are of analytical grade.

2.2 *In Vitro* Experimental Design

First we performed *in vitro* tests at 3 times (24h, 48h and 72h) to evaluate the effects of 7 different doses of clopidogrel bisulfate (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ M) on B16-F10 cell cultures.

2.3 B16-F10 cell culture

The B16-F10 (ATCC CRL-6475) cells were acquired from Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil) and were cultivated with a specific medium according to BCRJ instructions. Polystyrene 25 cm² with *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) culture medium bottles were used, with the addition of 1% penicillin/streptomycin and 10% bovine fetal serum. The culture medium was changed

every 48 hours and incubation occurred at 37°C and 5% CO₂ in the incubator with a humidified atmosphere.

Cell scraper and mechanical removal technology were used to detach the cells. The culture medium containing the cells was transferred to Falcon tubes and centrifuged at 1500 RPM for 5 minutes. The resulting pellet was resuspended in a culture medium, and the cell count was performed in a Neubauer chamber. 1x10⁴ cells per well in 96-well microplates for periods of 24, 48, and 72 hours and in triplicate for *in vitro* activities.

2.4 *In vitro* tests in B16-F10 cells

Cell viability and proliferation, toxicity by LDH, NO levels, and ROS were exposed to the doses of 30 µM 100 µM 300 µM, and 1000 µM of Clopidogrel. Were used 1x10⁴ cells per well in 96-well microplates for periods of 24, 48, and 72 hours and in triplicate.

2.4.1 Viability and proliferation (MTT) assay

This assay is performed using the succinate dehydrogenase, an enzyme present in viable cells that reduces the tetrazolium salt in insoluble formazan crystals (MOSMANN, 1983). The 24 hours cultures indicate viability and beyond that time indicate the proliferation of B16-F10 cells. After the initial incubation period, 20 µL were added to the wells of the sterile solution with MTT (5 mg mL⁻¹ of PBS 1X), and the plates were incubated again for 4 hours. Finally, the medium was carefully removed and 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to dissolve the crystals. Cell growth inhibition was identified by spectrophotometer at 570 nm. The calculation was performed considering the percentage in relation to the negative control.

2.4.2 Cellular Cytotoxic by Lactate dehydrogenase (LDH) assay

The assay was carried out according to the manufacturer's instruction "*CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*". After the determined time, 100 µL of supernatant was collected and added to 96 wells plates containing the reagent. Incubated at room temperature and protected from light for 30 minutes. After reading, it was done at a wavelength of 492 nm. The calculation was performed considering the percentage in relation to the negative control.

2.4.3 Nitric oxide (NO)

NO has nitrite as a stable metabolite and was determined by the Griess method. First, 100 µL of supernatant was incubated with the same volume of Griess reagent. Absorbance was measured at 540 nm (GRIESS, 1864).

2.4.4 Production of reactive oxygen species (ROS)

This method consists of evaluating the presence of ROS inside the cell by adding dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA). The action of esterase enzymes of cells diacetyl to DCFH-DA (ROTA; CHIGNELL & MASON, 1999; SAUER *et al.*, 2003). This reaction generates a non-fluorescent product, dihydrochlorofluorescein (DCFH). In the presence of ROS, DCFH is oxidized, turning into a fluorescent form, dichlorofluorescein (DCF). Thus, the higher the fluorescence detected, the higher the occurrence of oxidizing compounds. For the analysis of the total production of ROS in the supernatant, the reagent DCFH-DA was diluted in ethyl alcohol (1:10) (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004.) After that, a mix (65 µL de Tris-HCL/ 50 µL of cellular supernatant / 10µL of the DCFH-DA reagent) previously incubated at room temperature for 30 minutes was used. The reading was performed in a fluorometer at 525 nm of emission and excitation of 488 nm.

2.5 *In Vivo* Experimental Design

For the *in vivo*, the mice were randomly distributed into four groups of ten animals each: Control (C), Control + clopidogrel bisulfate (CB), Melanoma (M), and Melanoma + clopidogrel bisulfate (M+CB). After 7 days of settling, mice in the melanoma groups received an intraperitoneal (i.p) injection with 2×10^5 B16-F10 cells for melanoma induction (FU *et al.*, 2016). Forty-eight hours after the induction, the animals received treatment via gavage with 30mg/kg of clopidogrel bisulfate for 12 days. The animals without clopidogrel treatment and the ones not induced with melanoma went through the same procedures with the administration of 0.9% saline solution. After the treatment period, the animals were anesthetized with isoflurane and euthanized by exsanguination. Blood, organ, tissue, tumor, and weight assessments were then performed. Figure 1 shows a schematic drawing of an *in vivo* experiment.

2.6 Animals

Isogenic C57BL/6 mice from the Central Bioterium of the Federal University of Santa Maria (UFSM) were used. The male animals weighed between 20 and 30 grams and were six to seven weeks old. All procedures and the manipulation of the animals were performed according to animal welfare guidelines and the protocol was approved by the UFSM ethics committee (#8630040820) and the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA Brasil). The animals were kept in a controlled environment, with an average temperature of $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, a light/dark cycle of 12 hours, water at will, standard granulated food, and environmental enrichment.

2.7 *In vivo* tests

2.7.1 Hematological Parameters

For the evaluation of blood hematological parameters, samples were collected in 1mL tubes containing EDTA and evaluated using an automated hematology analyzer (SYSMEX XT-1800i, Roche Diagnostic, USA).

2.7.2 Body weight and organ evaluation

The animals underwent weight evaluation as well as the collected tissues. For evaluation of tissue parameters in relation to body weight, the following formula was used: (tissue weight – body weight) x1000.

2.7.3 Evaluation of tumor development

For evaluation of tumor nodule counts, at the time of euthanasia, tumor nodules were counted and tumor masses carefully removed and weighed. All tumor nodules present in the intraperitoneal cavity were taken into consideration, as well as the total weight of the nodules in each animal, which was carefully removed with a scalpel and evaluated.

2.7.4 Isolation of plasma and platelets

For platelet isolation, blood samples were collected in 1 mL sodium citrate tubes and were processed according to (PILLA *et al.*, 1996). Initially, the samples were centrifuged at room temperature for 15 minutes at 1000 rpm to obtain Platelet-rich plasma (PRP). Then the PRP was carefully removed and centrifuged at a cold temperature for 30 minutes at 3700 rpm. Platelet-Poor Plasma (PPP) was removed and the platelet pellet formed was washed with 3.5 mM HEPES buffer containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose and centrifuged again at 3700 rpm for 10

minutes. The platelet pellet was resuspended in HEPES buffer and the protein concentration was adjusted to 0.4-0.6 mg/mL.

2.7.5 Quantification of LDH in plasma

Plasma was used for LDH quantification, which was evaluated using a commercial kit and performed according to the manufacturer's package insert.

2.7.6 Quantification of NO in plasma

Plasma was used for quantification of NO *ex vivo*, which was then determined by the Griess method. First, 50 μ L of the supernatant of the samples was incubated with the same volume of Griess reagent. The absorbance was measured at 540 nm (GRIESS, 1864).

2.7.7 Quantification of ROS in plasma

Plasma was used to evaluate the presence of ROS by adding dichlorofluorescein acetate (DCFH-DA) through the action of the enzyme esterase that deacetylates DCFH-DA (ROTA; CHIGNELL & MASON, 1999; SAUER *et al.*, 2003)

2.7.8 Protein determination

Protein determination was performed according to the method of Coomassie blue (BRADFORD, 1976).

2.7.9 Determination of E-NTPDase and E-5'-Nucleotidase enzymatic activity in platelets

The enzymatic activity of E-NTPDase in platelets was performed in duplicate and determined by the colorimetric method through the quantification of inorganic phosphate released in the reaction of nucleotide hydrolysis (PILLA *et al.*, 1996). The

activity of the E-5' enzyme follows the same principle and was performed according to Chan *et al.* (1986).

2.7.10 E-ADA determination in platelets

The E-ADA activity in platelets was determined according to the method established by Gusti and Galanti (GUISTI & GALANTI, 1984). This technique directly measures the amount of ammonia, formed when ADA degrades adenosine.

3. Results

3.1 Results of the *in vitro* tests in B16-F10

The MTT test (Figure 2) and LDH (Figure 3) tests revealed significant results only for B16-F10 cultures at 72h. The tests for NO (Figure 3) e ROS levels (Figure 4) were not significantly different among doses and time of exposure.

Figure 2C shows that cell proliferation of B16-F10 cells in 72h culture with clopidogrel bisulfate was reduced by 22%, 20%, 21% and 23% at dosages of 30 μM (78.85 ± 4.21 ; $P < 0.05$); 100 μM (80.17 ± 1.081 ; $P < 0.05$); 300 μM (79.56 ± 3.30 ; $P < 0.05$) and 1000 μM (77.21 ± 0.04 ; $P < 0.05$) compared to the control test (100 ± 4.72). Clopidogrel Bisulfate also alters the LDH activity of cells (figure 3C) in the dosages of 30 μM (121.8 ± 3.59 ; $P < 0.01$), 100 μM (123.6 ± 2.29 ; $P < 0.01$), 300 μM (117.3 ± 1.32 ; $P < 0.05$) and 1000 μM (127.8 ± 3.95 ; $P < 0.001$) compared to the control (100 ± 4.72). These results represent an increase in cytotoxicity by 21%, 23%, 17%, and 27%, respectively.

3.2 *In vivo* analysis

3.2.1 Body weight (BW) and body weight/tissue weight relations

Table 1 presents the result of body weight (BW), organs, and their relationship with body weight. The M+CB group shows significant differences ($P<0.05$ $n=10$) in kidney weight and the Spleen/BW and Kidneys/BW ratios compared to C and CB groups. The animals in M+CB group, also show significant changes ($P<0.05$ $n=10$) in the kidney weight and the Spleen/BW and Kidneys/BW ratios compared to C and CB groups.

3.2.2 Hematological Parameters

The hematological parameters presented in table 2 show that the group of animals with melanoma presented significant decreased RBC counts ($P<0.05$), lymphocytes ($P<0.05$) and concentration of hemoglobin ($P<0.05$), increased neutrophil counts ($P<0.05$) and lymphocyte to neutrophil ratio (LNR) ($P<0.01$) compared to group C and BC. In the M+BC group, clopidogrel bisulfate treatment was not efficient in reversing the changes caused by induction. M+CB group also showed significant differences compared to the C and CB group, reduced RBCs ($P<0.05$), reduced hemoglobin ($P<0.05$), decreased lymphocytes ($P<0.05$), increased neutrophils ($P<0.05$), increased NLR ratio ($P<0.01$) compared to the C and CB groups.

3.3 Tumor nodule counts and total tumor weight

Figure 6A shows the results of tumor weight in group M ($n=10$) and that treatment in group M+CB ($N=10$) did not result in significant differences. Figure 5B shows the results of tumor nodule counts found and shows that treatment with clopidogrel bisulfate promoted a 32.26% ($P<0.05$; $n=10$) reduction in tumor count compared to the untreated melanoma group ($n=10$).

3.4 Plasma Evaluations

Figure 6a shows the evaluation of LDH in the plasma of the animals. The M group showed an increase (2209 ± 364.7 ; $P < 0.01$; $n=5$) compared with the C group (753.2 ± 81.06 ; $n=5$) and the CB group (948.6 ± 160 ; $n=5$). The treatment with clopidogrel bisulfate in the M+CB group (1182 ± 244 ; $n=5$), promoted an equivalent result to C, CB and M groups.

The evaluation of NO in plasma (Figure 6B) shows that the M+CB group presented an increase in the percentage of the levels (173.1 ± 42.74 ; $P < 0.05$; $n=5$) compared to C (88.95 ± 12.21 ; $n=5$) and equivalent levels to the CB group (115.7 ± 16.19 ; $n=5$) and the M group (116.9 ± 30.27 ; $n=5$).

The evaluation of the percentage of ROS in plasma is shown in Figure 6C, however, no significant results were found between the groups.

3.5 E-NTPDase and 5`nucleotidase activity in platelets

Figure 7 presents E-NTPDase activity in platelets. For ATP hydrolysis, the enzymatic activity of E-NTPDase showed a significant increase in group M (22.70 ± 1.59 ; $p < 0.01$; $n=5$) compared to group C (11.75 ± 1.07 ; $n=5$). Treatment with clopidogrel bisulfate (CB group) also increased ATP hydrolysis (20.86 ± 0.62 ; $p < 0.01$; $n=5$) compared to C. The group with melanoma treated with the drug (M + CB) (22.06 ± 1.6 ; $p < 0.01$; $n=5$) also showed a significant increase in ATP hydrolysis compared to C.

Figure 7B shows the activity of the enzyme for ADP hydrolysis, evidencing an increase in activity in the M group (26.68 ± 2.65 ; $p < 0.01$; $n=5$) compared to C (12.23 ± 0.82 ; $n=5$) and treatment with clopidogrel bisulfate also promoted an increase in

hydrolysis in the CB group (23.34 ± 0.97 ; $p < 0.01$; $n=5$) and the M+CB group (36.03 ± 2.25 ; $p < 0.01$; $n=5$) increase the activity compared to the other groups. For AMP hydrolysis, Figure 7C shows an increase in enzyme activity for the M+CB group (10.14 ± 1.47 ; $p < 0.01$; $n=5$) compared to group C (4.43 ± 0.023 ; $n=5$) and that the CB (7.81 ± 1.03 ; $n=5$), and M group (8.34 ± 0.81 ; $n=5$) groups are statistically equivalent to the C and M+CB groups.

3.6 E-ADA activity in platelets

E-ADA enzyme activity is presented in figure 8 and shows that melanoma induction in group M reduced the enzyme activity (1.88 ± 0.27 ; $p < 0.05$; $n=5$) compared to group C (4.64 ± 0.59 ; $n=5$). Treatment with clopidogrel bisulfate in the M+CB group (11.26 ± 1.49 $p < 0.001$) resulted in a reversal of such decrease and an increase compared to group C, as well as treatment in the CB group (9.12 ± 0.71 ; $p < 0.001$; $n=5$) also showed increased activity compared to group C and M groups.

4. Discussion

Clopidogrel bisulfate inhibits platelet activation via P2Y₁₂ (SCHRÖR, 1993). P2Y₁₂ blockade decreases platelet activation and affects the interaction between platelets and tumor cells. Additionally, it may contribute to a decline in the mediation of tumor cell adhesion to tissues, reducing the successful establishment of new metastases, as previously mentioned by GAREAU *et al.* (2018). Thus, we conducted this study to evaluate the effects of clopidogrel bisulfate on B16-F10 cells *in vitro* in reducing the effects of melanoma induction and on the purine metabolism in platelets.

In our study, we observed tumor mass formation in all mice with melanoma induced by B16F10, the cell line of choice for experimental induction in mice. Injection

of the B16F10 cell line in mice via the intraperitoneal route is considered a metastatic model of melanoma. In this model, it is possible to observe the formation of solid tumors adhered in the peritoneum, kidneys, spleen, and liver (FUet al., 2016). Thus, when established, cancer generates a series of physiological disturbances, as evidenced in our study. We observed alterations in the hematological parameters in the mice with melanoma, with a decrease in red blood cells, hemoglobin, and hematocrit, characterizing anemia and an imbalance in the dynamics of the immune system. This condition impairs the body and is associated with increased morbidity in cancer (BALDUCCI, 2003). Cancer-related anemia is multifactorial and may be a consequence of red blood destruction, cell entrapment in the spleen, bone marrow infiltration, substance deficiency, renal failure, and evolution of the neoplastic process (MERCADANTE, 2000).

The release of cytokines, metabolites, and inflammatory mediators triggered by the disease process alters the bone marrow hematopoiesis and reorganizes the immune system, directly impacting stem cells (BASU *et al.*, 2000). This action favors the differentiation of lymphoid progenitor cells into myeloid lineages, commonly reducing the number of lymphocytes and increasing the number of neutrophils (KAMRAN *et al.*, 2018). This imbalance has already been reported in human patients, which seems to favor antitumor immunity reflected in the variation of NLR that has been considered a marker for inflammation and poor prognosis (NAKAMOTO *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2015). We also found an increased splenic weight to body weight ratio in the groups with melanoma, thus being another indication of alterations in the immune response. It occurs through overstimulation and proliferation of immune cells and because of the compensatory extramedullary hematopoiesis (KAMRAN *et al.*, 2018).

These results show the impact of melanoma-triggered changes on the hematopoietic system.

The development of cancers generates an inflammatory process, evaluated in this study through the activity of the LDH enzyme. LDH activity, a biomarker of a systemic inflammatory process and tissue lesions, is elevated in several diseases and very pronounced in cancer (GALVANO *et al.*, 2020; PELIZZARI *et al.*, 2019). Our results showed that the induction of melanoma increased LDH activity, possibly owing to the inflammatory process and tumor growth through the Warburg effect (LIBERTI, 2016). The connection between cancer development and inflammation plays a prominent role in activated platelets (CAMILLI *et al.*, 2021). Blockade of P2Y12 through inhibitors decreases in platelet activation and, consequently, shows beneficial action (BALLERINI *et al.*, 2018; GAREAU *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2013).

First, we evaluated the direct effects of clopidogrel bisulfate *in vitro* on melanoma cells. Our *in vitro* results showed that the dosages above 30mM in 72h resulted in complementary results with decreased viability and increased toxicity of B16F10 cells. This is an interesting result considering that the drug needs liver metabolization to be transformed into its active metabolite that interferes with platelet function (SANGKUHL; KLEIN & ALTMAN, 2010). However, the degree of metabolization of clopidogrel bisulfate by cultured cells is not well-established. This is particularly challenging because it makes it difficult to determine whether our results were caused by the cellular metabolism or are a direct effect on B16F10 cells. Also, we cannot determine whether this action may have any specific influence on melanoma development *in vivo* (CERDA *et al.*, 2017; SAVI *et al.*, 2000; SYBERG *et al.*, 2012; WEBER; REIMANN & SCHRÖR, 1999).

In vivo, the treatment with clopidogrel bisulfate decreased tumor nodule counts by approximately 32%, although it did not interfere with tumor weight. Clopidogrel bisulfate blocks the P2Y₁₂ on platelets, decreasing platelet activation and, consequently, affecting P2Y₁₂ action on cancer progression, which is likely through decreased adhesion and interaction of platelets with tumor and other cells. These findings agree with those of an animal model study of intravenous melanoma and breast cancer, where the researchers evaluated P2Y₁₂ inhibitors. Their findings suggest that blocking this receptor reduces the ability to spread and establish in the organs (GEBREMESKEL *et al.*, 2015). The inhibition of platelets via P2Y₁₂ downregulates the activation of the GPIIb/IIIa protein that mediates the interaction of platelets with tumor cells. Furthermore, P2Y₁₂ binding with ADP acts on ADP-dependent regulatory pathways and controls several attributes of platelet functions, including release of substances through alpha granules and activation of GPIIb/IIIa. Thus, P2Y₁₂ inhibition may have important implications for cancer development and tumor nodule counts (SAVAGE, 2013; SCHUMACHER, 2013; LONSDORF, 2012).

Regarding the hematological parameters and organ analysis, we found that the untreated groups, as well as those treated with clopidogrel bisulfate, showed no significant differences, in agreement with a previous study (CHEMNITZ *et al.*, 2003). Thus, we demonstrated that clopidogrel bisulfate, under the conditions used in this work, is not able to revert the changes in the hematological parameters (CHEMNITZ *et al.*, 2003; LI & WANG, 2010; SYBERG *et al.*, 2012). On the other hand, the animals with melanoma treated with clopidogrel bisulfate showed similar LDH levels to the healthy groups, a possible consequence of the anti-inflammatory effect of clopidogrel bisulfate. Such an effect has already been evidenced in other studies, as well as its relationship with the reduction of tumor nodule counts (HADI *et al.*, 2013;

MOLERO *et al.*, 2005; PATEL; RACHCHH & JADAV, 2012). Furthermore, a study with rats showed that pretreatment with clopidogrel resulted in decreased serum LDH levels upon induction of hyperlipidemia, thus suggesting an anti-inflammatory effect of the drug by reducing platelet aggregation and decreasing vascular inflammation (MOHAMED; EL-HADIDY & MANNAA, 2014).

During the development of melanoma, inflammation is induced by increased blood flow, vascular permeability, and damage by the production of reactive oxygen species (HOADLEY *et al.*, 2014). However, we did not find differences in the plasma levels of reactive oxygen species (ROS) among the groups. Vascular permeability is driven by nitric oxide (NO), an important molecule to be evaluated in cancer development, which is increased in some forms of the disease and has been studied as a diagnostic and prognostic biomarker (HU *et al.*, 2020). The results of the evaluation of NO showed an increase in the treated melanoma group compared to the control group. In the tumor microenvironment, NO has an action on cancer progression, and it is concentration-dependent. Studies show that NO in lower concentrations may contribute to tumor development and metastasis through angiogenesis. On the other hand, higher concentrations have antitumor properties through the generation of damage in tumor DNA, which makes it difficult to assess whether its effect was beneficial or not in our work (HU *et al.*, 2020). Inhibition of platelet activation leads to a blockade in NOs release, however, *in vitro* and *in vivo* studies reveal that clopidogrel increases NOs release in blood samples, possibly through stimulation of other immune cells and endothelial cells as a compensatory way (CERDA *et al.*, 2017; DE LA CRUZ *et al.*, 2002).

Activated platelets release several substances, including TGF- β , a multifunctional cytokine that influences tumor development and mediates the release

of LDH and NO (COLAK 2017; CHEN, 2001 & PIHUSCH, 2005). Therefore, platelet inhibition via P2Y12 by clopidogrel bisulfate may be changing the release of substances by platelets, influencing the results found in our work. The evidence shows that the activation platelets have an important role in tumor cancer progression, the release of mediators can promote angiogenesis, immunosuppression, cell activation, inflammation, and control of oncogenic determinants such as differentiation, proliferation, and apoptosis of cancer cells, which may thus favor tumor growth (GEBREMESKEL *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019; STONE *et al.*, 2012).

Ectoenzymes are also important for the modulation of the cellular and immune response and tumor development. Our results show that cancer increases the activity of CD39 and CD73 enzymes, enhancing the hydrolysis of ATP, ADP, and AMP. In the tumor microenvironment the platelets and cancer cells have been showing an expressive release of ATP and ADP, and the increase in the activity of CD39 and CD73 can be a compensatory effect for the excess of these nucleotides and platelet activation. Our results are in tune with other studies by BALLERINI *et al.*, (2018) and MANICA *et al.*, (2018). We also found a decrease in the activity of adenosine deaminase (E-ADA) in group with melanoma, which may be contributing to the increased bioavailability of adenosine and favoring the progression of cancer since ADO has strong immunosuppressive properties (BOURS *et al.*, 2006; DI VIRGILIO & VUERICH, 2015; DO CARMO ARAÚJO *et al.*, 2005; ZANINI *et al.*, 2012).

The healthy mice treated with clopidogrel bisulfate also increased ATP and ADP hydrolysis compared with control group. Also, the treated melanoma group showed an increased ADP hydrolysis compared with the control and the group with untreated melanoma. Furthermore, the results also show increased ADO deamination compared with the control and melanoma groups. These findings suggest that the clopidogrel

bisulfate *per se* when blocking of P2Y₁₂ receptor change platelets activity, the drug can lead to a decrease in the bioavailability of ADP and change the activity of the CD39 enzyme and the other enzymes of the purinergic cascade CD73 and ADA. Thus, clopidogrel bisulfate blocks the P2Y₁₂ receptor and may be increasing the hydrolysis of the main ligand, ADP, causing a set of effects that add up contributing to prevent platelet activation. The nucleotides play extracellular signaling roles and can amplify the platelet activation, so when there is a change in the hydrolysis of these molecules they can affect the modulation of inflammation, other cells activation and maybe cancer development. Moreover, clopidogrel bisulfate has increased the activity of adenosine deaminase, which may trigger a decrease in the bioavailability of adenosine and contribute to its antitumor effect.

Our *in vitro* results revealed that contact with clopidogrel bisulfate for 72 h decreases viability and increases cytotoxicity in melanoma cell cultures. Upon melanoma induction, clopidogrel bisulfate has shown the potential to reduce tumor nodule counts and alter the activity of platelet purinergic enzymes, which may also interfere with the regulation of the inflammatory process and platelet function. The results of this study are important to elucidate some of the clinical effects and mechanisms triggered by clopidogrel bisulfate treatment on purine metabolism in platelets and melanoma development. However, future studies are needed to fully understand if clopidogrel bisulfate has a direct or specific influence on melanoma development *in vitro* and *in vivo*, as well as the role of purinergic enzymes on platelet modulation and its relationship to inflammation and cancer.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest

Author Contribution Statement

M. H. J - Conceptualization, Data curation, Formal Analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Writing – original draft;.

P. H. D - Conceptualization; Data curation; Formal Analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing – review & editing.

A. R. V - Data curation; Formal Analysis; Investigation; Methodology; Validation.

J. L. G. S - Data curation; Formal Analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing – review & editing.

D. F. P - Data curation; Investigation; Writing – review & editing.

F. L. C - Data curation; Investigation; Methodology;

A. G. M - Data curation; Investigation; Methodology;

R. S. E - Data curation; Investigation; Methodology;

B. U - Data curation; Investigation; Methodology;

C. M. A - Investigation; Methodology; Resources; Supervision.

M.R.C - Investigation; Methodology; Resources; Supervision; Project administration; Writing – review & editing.

D.B.R.L - Investigation; Methodology; Resources; Supervision; Project administration; Writing – review & editing.

Funding Statement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. PROEX number 88887.499379/2020-00, Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia do Brasil (CNPq) and by Programa de Incentivo à Qualificação Profissional (PIIQP) do Instituto Federal Farroupilha (IFFar)

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

References

- BALDUCCI, L. Anemia, cancer, and aging. **Cancer Control**, v. 10, n. 6, p. 478–486, 2003.
- BALLERINI, P. et al. P2Y12 receptors in tumorigenesis and metastasis. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 66, 2018.
- BASU, S. et al. “Emergency” granulopoiesis in G-CSF–deficient mice in response to *Candida albicans* infection. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 95, n. 12, p. 3725–3733, 2000.
- BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BURNSTOCK, G.; DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic signalling**, v. 9, n. 4, p. 491–540, 2013.

CAMILLI, M. et al. Platelets: the point of interconnection among cancer, inflammation and cardiovascular diseases. **Expert review of hematology**, v. 14, n. 6, p. 537–546, 2021.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321–332, 2006.

CERDA, A. et al. Effects of clopidogrel on inflammatory cytokines and adhesion molecules in human endothelial cells: role of nitric oxide mediating pleiotropic effects. **Cardiovascular therapeutics**, v. 35, n. 4, p. e12261, 2017.

CHEMNITZ, J. et al. Fatal toxic bone marrow failure associated with clopidogrel. **European journal of haematology**, v. 71, n. 6, p. 473–474, 2003.

CHEN, H. et al. TGF- β 1 modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 3, p. H1035–H1039, 2001.

CHO, M. S. et al. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. **Blood**, v. 120, n. 24, p. 4869–4872, 2012.

CLARK JR, W. H. et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–1165, 1984.

COLAK, S.; TEN DIJKE, P. Targeting TGF- β signaling in cancer. **Trends in cancer**, v. 3, n. 1, p. 56–71, 2017.

CONTURSI, A. et al. Platelets as crucial partners for tumor metastasis: from mechanistic aspects to pharmacological targeting. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n. 19, p. 3491–3507, 2017.

COUKELL, A. J.; MARKHAM, A. Clopidogrel. *Drugs*, v. 54, n. 5, p. 745–750, 1997.

DE LA CRUZ, J. P. et al. Influence of nitric oxide on the *in vitro* antiaggregant effect of ticlopidine. **Vascular pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 183–186, 2002.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M. Purinergic signaling in the immune system. **Autonomic Neuroscience**, v. 191, p. 117–123, 2015.

DO CARMO ARAÚJO, M. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 3, p. 421–426, 2005.

FU, Q. et al. Novel murine tumour models depend on strain and route of inoculation. **International journal of experimental pathology**, v. 97, n. 4, p. 351–356, 2016.

GALVANO, A. et al. Analysis of systemic inflammatory biomarkers in neuroendocrine carcinomas of the lung: prognostic and predictive significance of NLR, LDH, ALI, and LIPI score. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 12, p. 1758835920942378, 2020.

GAREAU, A. J. et al. Ticagrelor inhibits platelet–tumor cell interactions and metastasis in human and murine breast cancer. **Clinical & experimental metastasis**, v. 35, n. 1, p. 25–35, 2018.

GEBREMESKEL, S. 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.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUISTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: In: HU Bergmeyer (Ed.): Methods of Enzymatic Analysis. 1-3rd Edn., Verlag ChemieWeinheim. New York: **Academic Press**, 1984.

HADI, N. R. et al. Antiatherosclerotic potential of clopidogrel: antioxidant and anti-inflammatory approaches. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

HOADLEY, K. A. et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 929–944, 2014.

HU, Y. et al. The regulation of nitric oxide in tumor progression and therapy. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 2, p. 0300060520905985, 2020.

KAMRAN, N. et al. Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 3, p. e1408750, 2018.

KOSZAŁKA, P. et al. CD73 on B16F10 melanoma cells in CD73-deficient mice promotes tumor growth, angiogenesis, neovascularization, macrophage infiltration and metastasis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 69, p. 1–10, 2015.

LI, Y.; WANG, N. Antithrombotic effects of Danggui, Honghua and potential drug interaction with clopidogrel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 623–628, 2010.

LI, Z. et al. The role of platelets in tumor growth, metastasis, and immune evasion. In: **Platelets. [s.l.] Elsevier**, 2019. p. 547–561.

LIBERTI, M. V; LOCASALE, J. W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LONSDORF, A. S. et al. Engagement of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) with $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 3, p. 2168–2178, 2012.

MANICA, A. et al. High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 5, p. 3980–3988, 2018.

MERCADANTE, S. et al. Anaemia in cancer: pathophysiology and treatment. **Cancer treatment reviews**, v. 26, n. 4, p. 303–311, 2000.

MOHAMED, A. R.; EL-HADIDY, W. F.; MANNAA, H. F. Assessment of the prophylactic role of aspirin and/or clopidogrel on experimentally induced acute myocardial infarction in hypercholesterolemic rats. **Drugs in R&D**, v. 14, n. 4, p. 233–239, 2014.

MOLERO, L. et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 419–424, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAKAMOTO, S. et al. Systemic immunity markers associated with lymphocytes predict the survival benefit from paclitaxel plus bevacizumab in HER2 negative advanced breast cancer. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2021.

PATEL, S. H.; RACHCHH, M. A.; JADAV, P. D. Evaluation of anti-inflammatory effect of anti-platelet agent-clopidogrel in experimentally induced inflammatory bowel disease. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 744, 2012.

PELIZZARI, G. et al. Lactate dehydrogenase (LDH) response to first-line treatment predicts survival in metastatic breast cancer: first clues for a cost-effective and dynamic biomarker. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1243, 2019.

PIHUSCH, V. et al. Transforming growth factor beta-1 released from platelets contributes to hypercoagulability in veno-occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation. **Thrombosis research**, v. 116, n. 3, p. 233–240, 2005.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6. 1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, n. 4, p. 225–230, 1996.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase:: Possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 7–8, p. 873–881, 1999.

SANGKUHL, K.; KLEIN, T. E.; ALTMAN, R. B. Clopidogrel pathway. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n. 7, p. 463, 2010.

SAUER, H. et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and TNF- α : the role of intracellular reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 586–594, 2003.

SAVAGE, J. S. et al. Munc13-4 is critical for thrombosis through regulating release of ADP from platelets. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**, v. 11, n. 4, p. 771–775, 2013.

SAVI, P. et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. **Thrombosis and hemostasis**, v. 84, n. 11, p. 891–896, 2000.

SCHRÖR, K. The basic pharmacology of ticlopidine and clopidogrel. **Platelets**, v. 4, n. 5, p. 252–261, 1993.

SCHUMACHER, D. et al. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. **Cancer cell**, v. 24, n. 1, p. 130–137, 2013.

SONG, W.-M. et al. Network models of primary melanoma microenvironments identify key melanoma regulators underlying prognosis. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2021.

SYBERG, S. et al. Clopidogrel (Plavix), a P2Y12 receptor antagonist, inhibits bone cell function *in vitro* and decreases trabecular bone *in vivo*. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 11, p. 2373–2386, 2012.

WANG, Y. et al. Platelet P2Y12 is involved in murine pulmonary metastasis. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80780, 2013.

WEBER, A.; REIMANN, S.; SCHRÖR, K. Specific inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel *in vitro*. **British journal of pharmacology**, v. 126, n. 2, p. 415–420, 1999.

WU, Y. et al. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio as an independent prognostic predictor for pancreatic cancer. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 95, n. 28, p. 2291–2293, 2015.

YEGUTKIN, G. 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.

ZANINI, D. et al. Lung cancer alters the hydrolysis of nucleotides and nucleosides in platelets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, n. 1, p. 40–45, 2012.

Figure and table legends

Figure 1: Schematic design of the *in vivo* experiment.

Figure 2: *In vitro* test to evaluate MTT at 24h (A), 48h (B), and 72h (C) in cultured B16F10 cells treated with clopidogrel bisulfate at the dosages of 1,3, 10, 30, 100, 300, 1000. The results were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test and expressed as mean \pm SEM. Significant differences between the groups were expressed in *($P<0.05$) and ** ($P<0.01$).

Figure 3: *In vitro* test to evaluate NO at 24h (A), 48h (B), and 72h (C) in cultured B16F10 cells treated with clopidogrel bisulfate at the dosages of 1,3, 10, 30, 100, 300, 1000. The results were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test and expressed as mean \pm SEM. There were no significant differences between the groups ($P>0.05$).

Figure 4: *In vitro* test to evaluate LDH at 24h (A), 48h (B), and 72h (C) in cultured B16F10 cells treated with clopidogrel bisulfate at the dosages of 1,3, 10, 30, 100, 300, 1000. The results were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test and expressed as mean \pm SEM. Significant differences between the groups were expressed in *($P<0.05$), ** ($P<0.01$) and *** ($P<0.001$).

Figure 5: *In vitro* test to evaluate ROS at 24h (A), 48h (B) and 72h (C) in cultured B16F10 cells treated with clopidogrel bisulfate at the dosages of 1,3, 10, 30, 100, 300, 1000. The results were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test and expressed as mean \pm SEM. There were no significant differences between the groups ($P>0.05$).

Figure 6: Evaluation of melanoma development through tumor nodule counting (A) and the total weight of tumors (B) found in each animal. The results were analyzed using Student T-test and were expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences between the groups ($P<0.05$).

Figure 7: Plasma evaluations LDH (a), NO (b), and ROS (c) in mice submitted to intraperitoneal melanoma induction and treated with clopidogrel bisulfate at a dosage of 30 mg/Kg/day. The results were analyzed using the one-way ANOVA test and

expressed as mean \pm SEM followed by Tukey test. Different letters indicate significant differences between the groups ($P<0.05$).

Figure 8: Activity of E-NTPDase in platelets for ATP hydrolysis (A), ADP hydrolysis (B), and AMP hydrolysis (C) in mice submitted to intraperitoneal melanoma induction and treated with clopidogrel bisulfate at a dosage of 30 mg/Kg/day. The results were analyzed using the one-way ANOVA test and expressed as mean \pm SEM followed by Tukey test. Different letters indicate significant differences between the groups ($P<0.05$).

Figure 9: Activity of E-ADA in platelets of mice submitted to intraperitoneal melanoma induction and treated with Clopidogrel Bisulfate at a dosage of 30 mg/Kg/day. The results were analyzed using the one-way ANOVA test and expressed as mean \pm SEM followed by Tukey test. Different letters indicate significant differences between the groups ($P<0.05$).

Tables

Table 1: Body weight, organ weight, and the organ weight/body weight ratios of mice with melanoma treated with clopidogrel bisulfate.

Groups: C: negative control; Clop: control treated with clopidogrel bisulfate (30mg/Kg/Day); M: mice with melanoma induced; M+Clop: mice with melanoma treated with clopidogrel bisulfate (30mg/Kg/Day); The results were analyzed using the one-way ANOVA test and were expressed as mean \pm SEM followed by Tukey test. Different letters indicate a significant difference between the groups ($P<0.05$; $n=10$).

Table 2: Hematological parameters of mice with melanoma treated with clopidogrel bisulfate.

VCM: Mean corpuscular volume; CHCM: Mean corpuscular hemoglobin concentration. LNR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelets-to-neutrophil ratio. The results were analyzed using the one-way ANOVA test and were expressed as mean \pm SEM followed by Tukey test. Different letters indicate significant difference between the groups ($P<0.05$; $n=5$)

Tables and Figures

Table 1: Body weight, organ weight, and the organ weight/body weight ratios of mice with melanoma treated with clopidogrel bisulfate.

	C	CB	M	M+CB
Body weight	22 ± (0,62)	22,1 ± (0,67)	21,7 ± (0,55)	22 + (0,64)
Heart	0,1359 ± (0,09)	0,1372 ± (0,06)	0,1155± (0,03)	0,1213 ± (0,04)
Heart/Body weight	6,374 ± (0,44)	6,208 ± (0,24)	5,329 ± (0,12)	5,427 ± (0,13)
Spleen	0,06363 ± (0,03)	0,078 ± (0,07)	0,0693 ± (0,06)	0,0725 ± (0,09)
Spleen/Body weight	2,893 ± (0,14) ^a	3,565 ± (0,39) ^a	4,437 ± (0,13) ^b	4,644 ± (0,31) ^b
Liver	1,136 ± (0,06)	1,241 ± (0,07)	1,093 ± (0,06)	1,019 ± (0,11)
Liver/Body weight	52,12 ± (2,10)	56,13 ± (2,79)	50,26 ± (2,24)	44,56 ± (6,65)
kidneys	0,3244 ± (0,04) ^a	0,3248 ± (0,03) ^a	0,2582 ± (0,03) ^b	0,2660 ± (0,02) ^b
kidneys/Body weight	14,72 ± (0,46) ^a	14,78 ± (0,60) ^a	11,88 ± (0,32) ^b	12,11 ± (0,24) ^b

Table 2: Hematological parameters of mice with melanoma treated with clopidogrel bisulfate.

	C	CB	M	M+CB
Red cells (x 10 ⁶ /μL)	7,242 ± (0,1287) a	7,214 ± (0,2966) a	4,334 ± (0,8767) b	4,176 ± (0,9616) b
Hemoglobin (g/dL)	11,3 ± (0,582) ^a	12,12 ± (0,595) ^a	6,46 ± (1,191) ^b	6,36 ± (1,353) ^b
Hematocrit (%)	41,8 ± (0,374)	40,2 ± (1,772)	25,8 ± (5,361) ^b	24,8 ± (6,264) ^b
VCM (fL)	57,7 ± (1,088)	54,56 ± (0,837)	59,16 ± (1,169)	55 ± (3,817)
CHCM (g/dL)	27,15 ± (1,607)	30,21 ± (0,528)	25,3 ± (1,158)	24,52 ± (0,220)
Plasma protein (μL)	5,5 ± (0,044)	5,4 ± (0,126)	5,32 ± (1,158)	5 ± (0,220)
Platelets (/μL)	701500 ± (44232)	782800 ± (67930)	564600 ± (132884)	543600 ± (150457)
Total leucocytes (/μL)	3000 ± (449)	2540 ± (326)	2520 ± (579)	2980 ± (868)
Neutrophil (/μL)	617 ± (136) ^a	514,8 ± (53,5) ^a	1920 ± (118) ^b	1187 ± (531) ^b
Lymphocytes(/μL)	2239 ± (331) ^a	2265 ± (193) ^a	1070 ± (150) ^b	983 ± (0,71) ^b
LNR	0,2675 ± (0,03) ^a	0,3858 ± (0,17) ^a	1,78 ± (0,27) ^b	1,733 ± (0,27) ^b
PLR	382 ± (119)	564 ± (239)	561 ± (165)	561 ± 194)

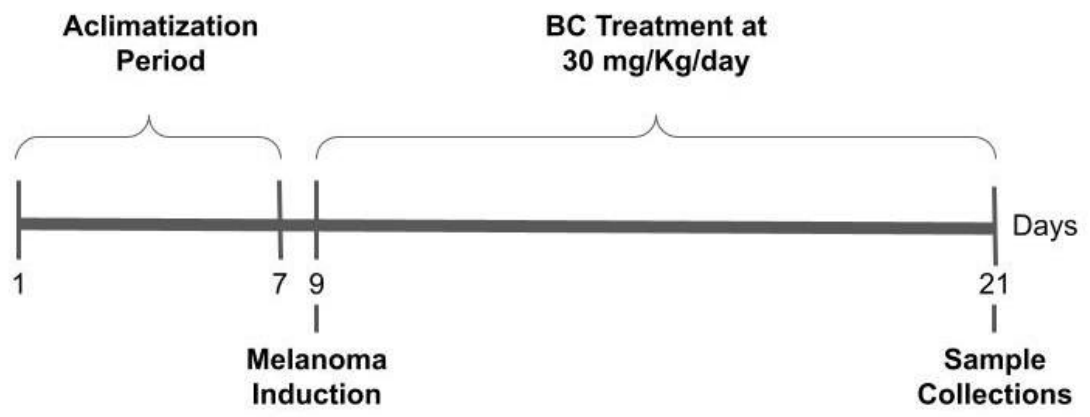
Figure 1

Figure 2: MTT Assay

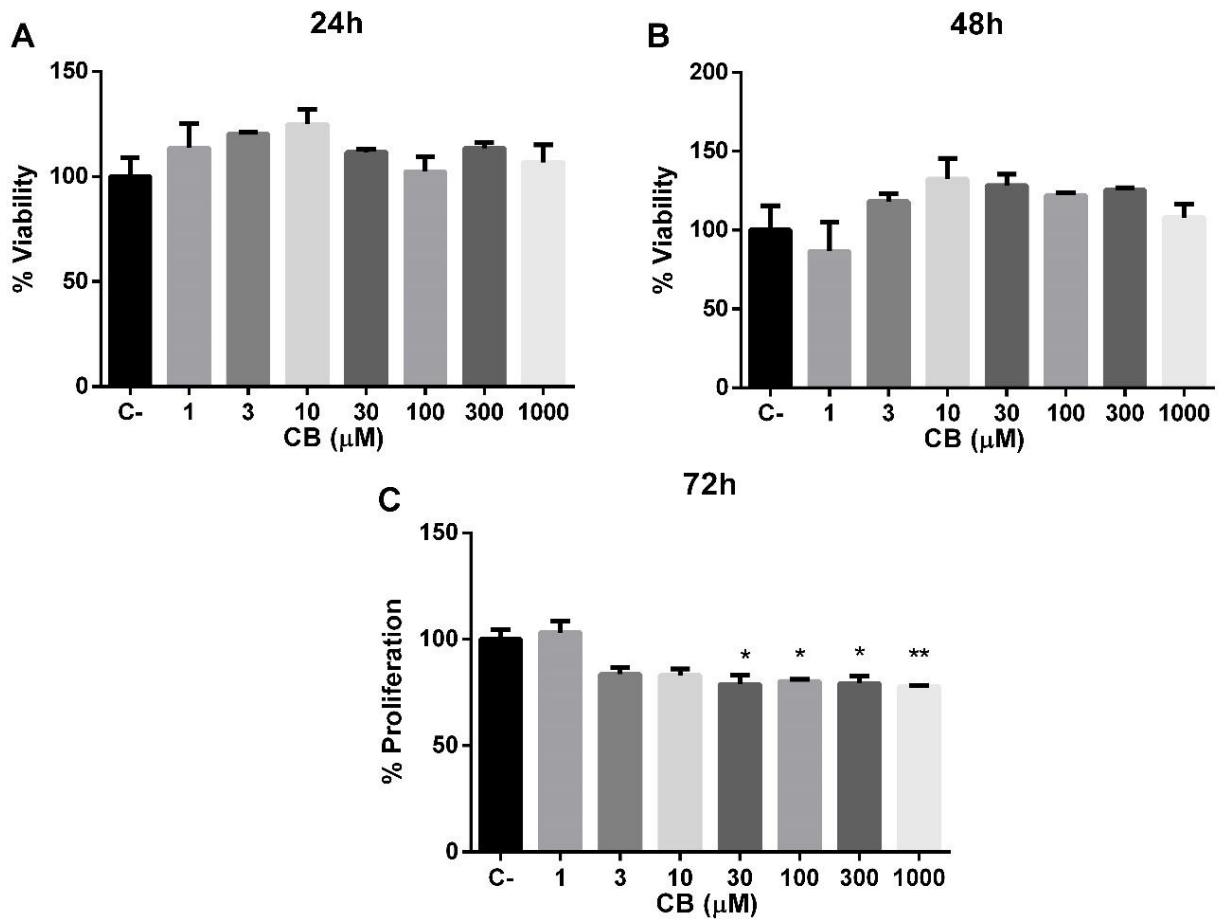


Figure 3: LDH Assay

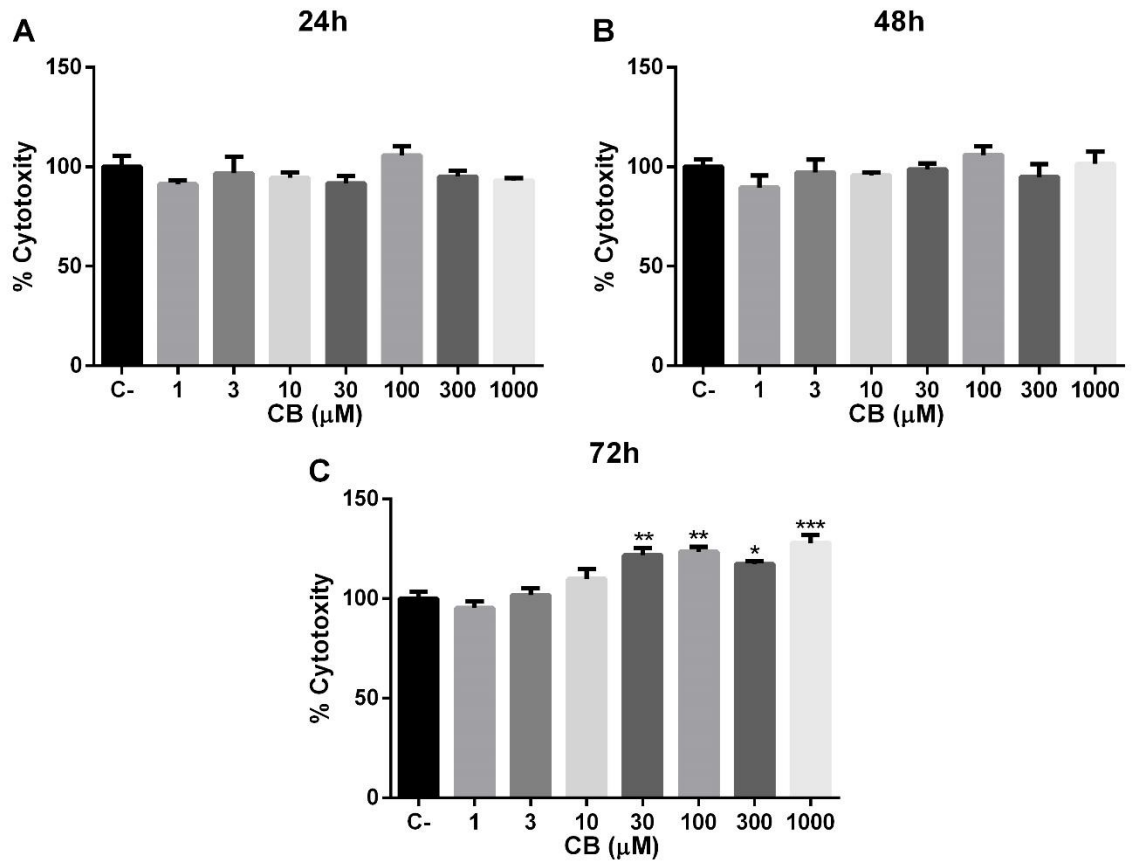


Figure 4: NO Assay

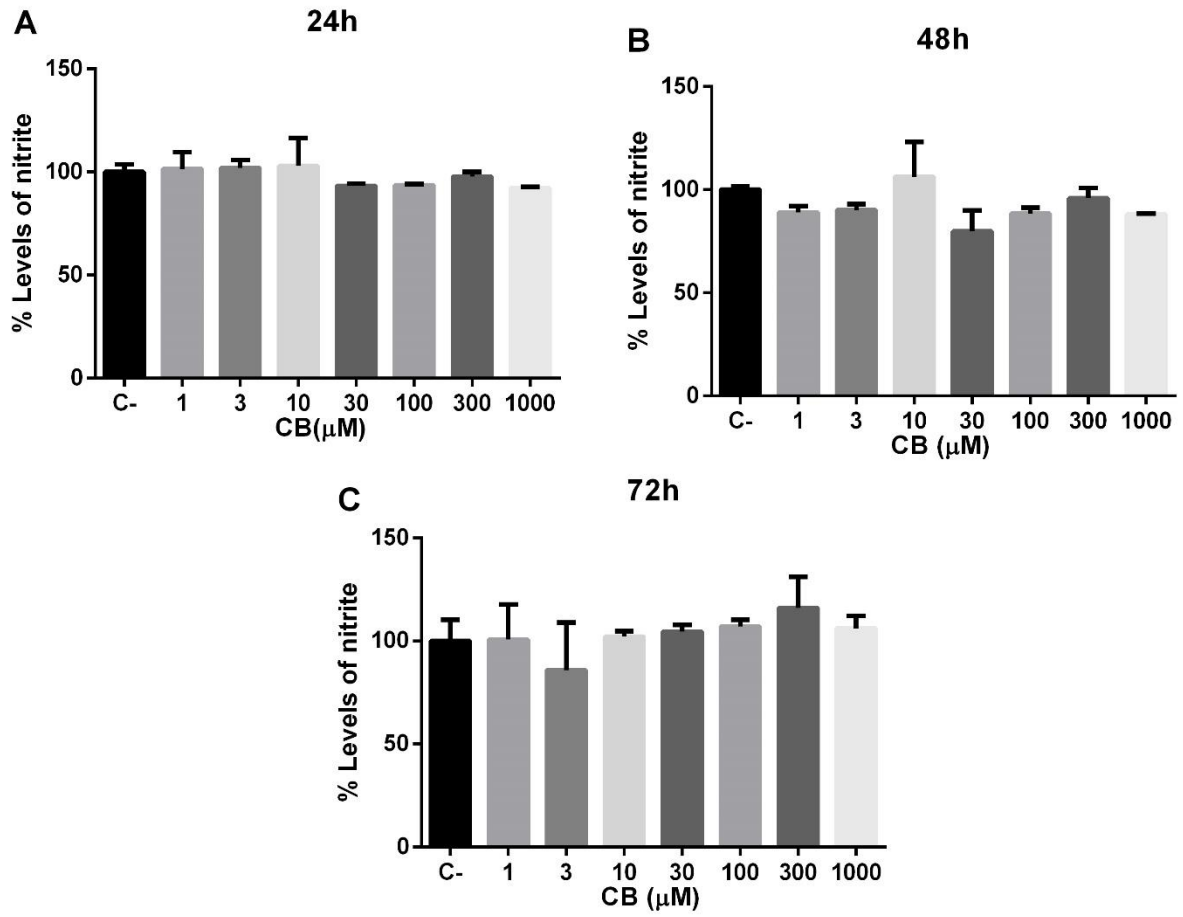


Figure 5: ROS Assay

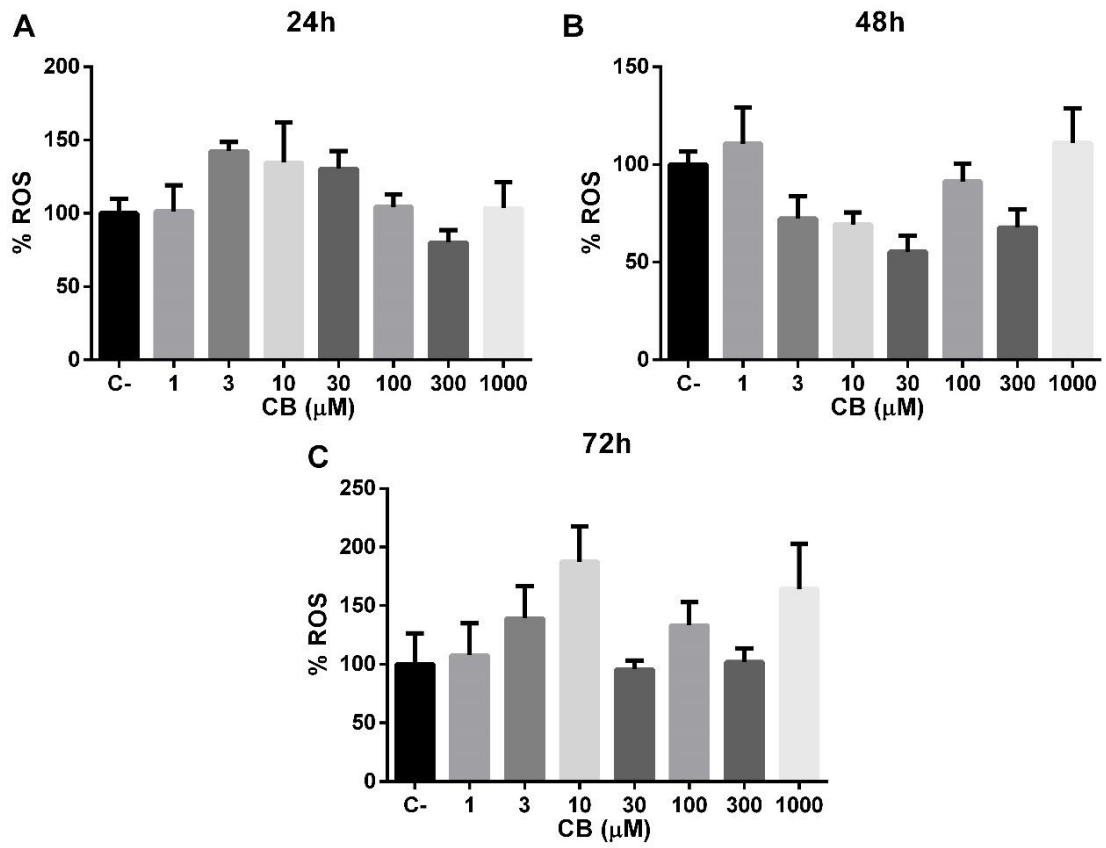


Figure 6: Evaluation of tumor development

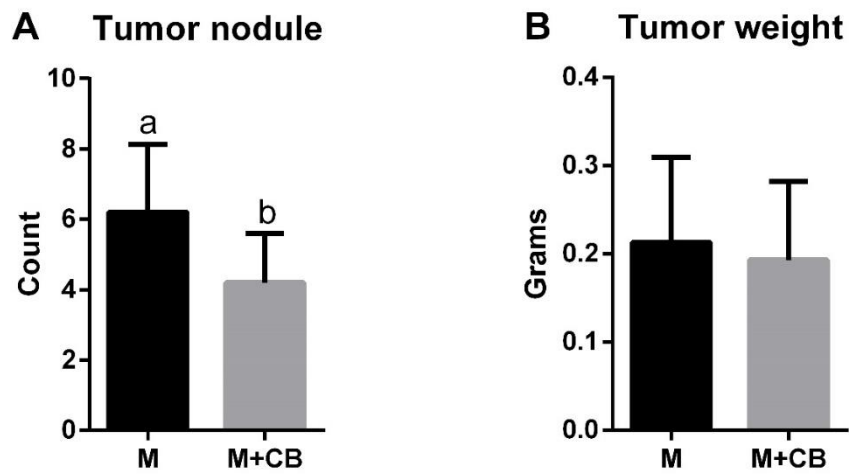


Figure 7: Evaluation of plasma biomarkers

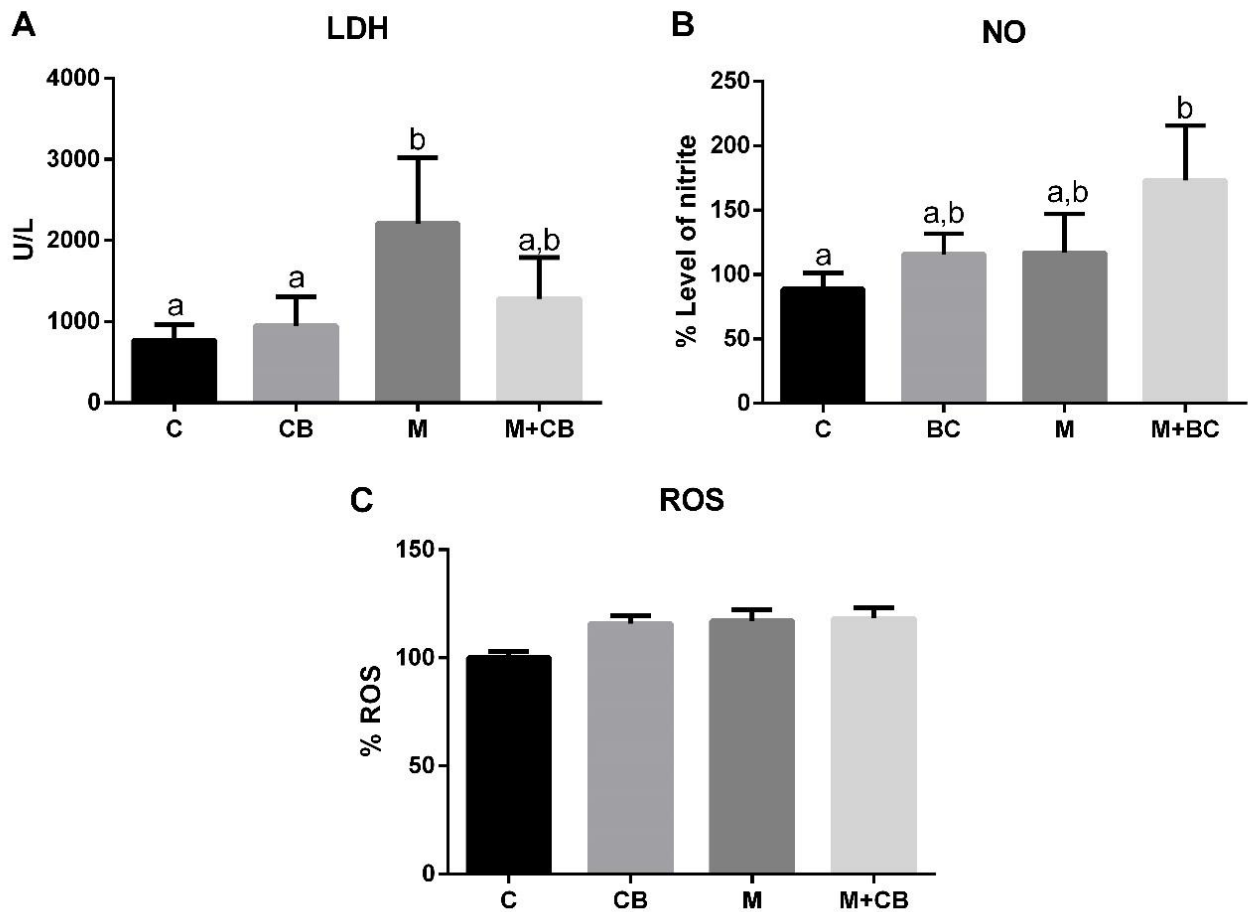


Figure 8: E-NTPDase and 5'-Nucleotidase activity in Platelets

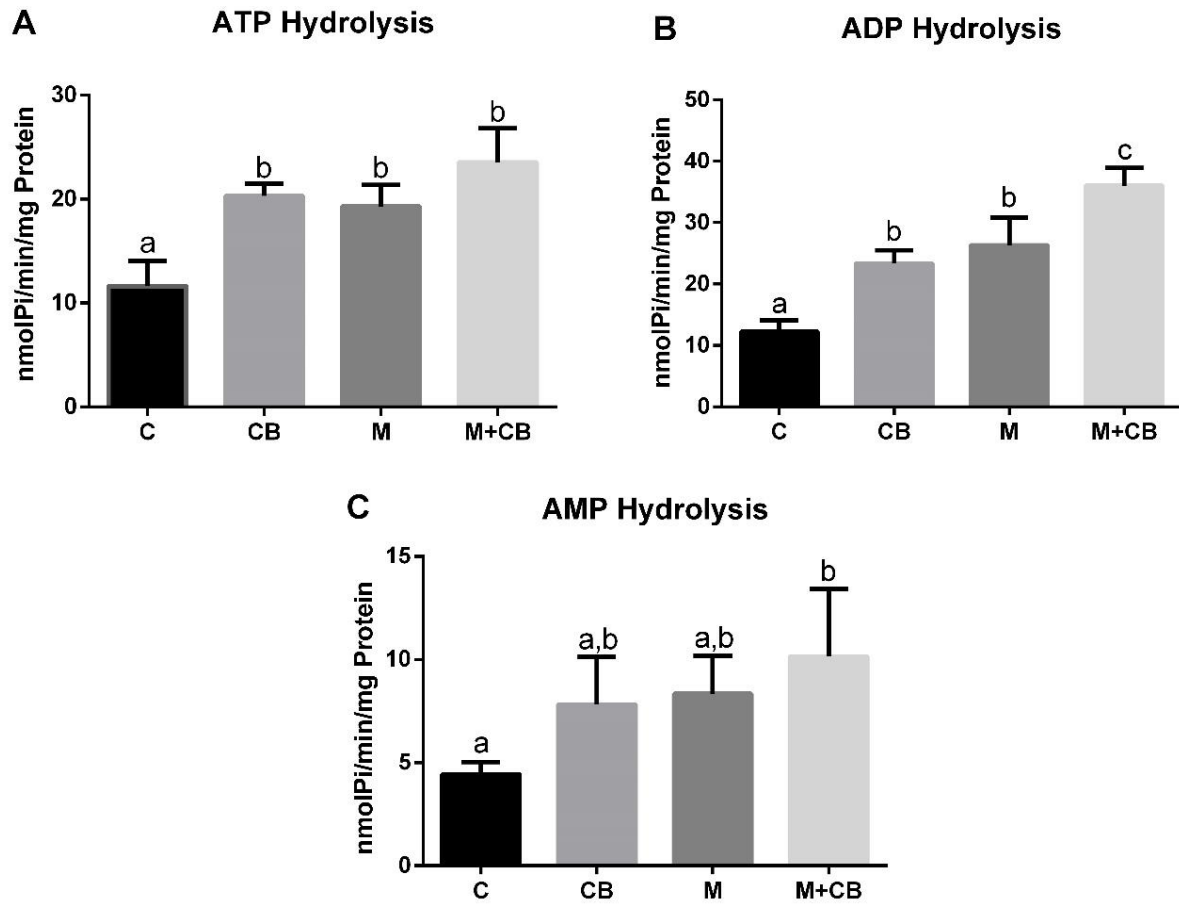
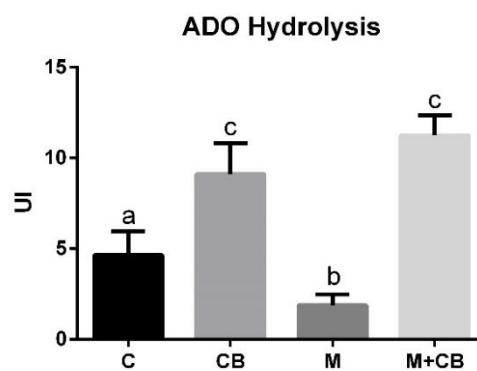


Figure 8: E-ADAactivity in Platelets



4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, podem ser feitas as seguintes conclusões:

- O Bissulfato de Clopidogrel agiu sobre as culturas de células do melanoma promovendo uma diminuição da viabilidade e aumento da citotoxicidade nas células B16-F10 em 72h.

- O tratamento com bissulfato de clopidogrel promoveu uma redução dos números de nódulos tumorais, que refletem a metástase, provavelmente através de sua ação sobre a inibição das plaquetas, que então, apresentam uma menor ativação de proteínas de ligação e secreção de moléculas que podem ter relação com progressão do câncer.

- A indução do melanoma promoveu alterações no peso dos órgãos e sua relação com peso corporal, no entanto, o tratamento com o bissulfato de clopidogrel não foi eficiente em promover uma melhora desses indicadores.

- O bissulfato de clopidogrel não teve uma ação frente aos efeitos sistêmicos da indução do melanoma, refletidos pelas alterações dos parâmetros do hemograma, mantendo assim, as alterações encontradas e o prognóstico desfavorável dos animais.

- A indução do melanoma promoveu alterações nos marcadores de inflamação e o tratamento com bissulfato de clopidogrel promoveu uma redução do LDH e alteração no ON, provavelmente devido a seu efeito anti-inflamatório e sua ação de inibição da ativação das plaquetas.

- O tratamento modulou a atividade das enzimas purinérgicas das plaquetas, de modo a aumentar a atividade das enzimas e assim, possivelmente, reduzindo as moléculas sinalizadoras, contribuindo para inibição da ativação das plaquetas de uma forma ainda mais efetiva e também, reduzindo a influência das plaquetas sobre a ativação de outras células e sua influência na progressão do câncer.

REFERÊNCIAS

ALEXANDROV, L. B. *et al.* **Signatures of mutational processes in human cancer.** Nature, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 2013.

A.S.C. What is Melanoma Skin Cancer?. American Cancer Society. <Disponível em: www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer>. Acessado em 2022.

BOURS, M. J. L. *et al.* **Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation.** Pharmacology and Therapeutics, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

BOZZA, F. A. *et al.* **Amicus or adversary: platelets in lung biology, acute injury, and inflammation.** American journal of respiratory cell and molecular biology, v. 40, n. 2, p. 123–134, 2009.

BROWN, D. 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, G. and DI VIRGILIO, F. **Purinergic signalling and cancer.** Purinergic signalling, v. 9, n. 4, p. 491–540, 2013.

CAMILLI, M. *et al.* **Platelets: the point of interconnection among cancer, inflammation and cardiovascular diseases.** Expert review of hematology, v. 14, n. 6, p. 537–546, 2021.

CASTRO, H. C. *et al.* **Plaquetas: ainda um alvo terapêutico.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 42, n. 5, p. 321–332, 2006.

CLARK JR, W. H. *et al.* **A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.** Human pathology, v. 15, n. 12, p. 1147–1165, 1984.

COLGAN, S. P. *et al.* **Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73).** Purinergic signalling, v. 2, n. 2, p. 351, 2006.

- COSTA, M. M. C. and FREITAS, P. F. **Tendência temporal da mortalidade por melanoma cutâneo no Brasil no período de 2001 a 2013.** Medicina-Pedra Branca, 2018.
- COUKELL, A. J. and MARKHAM, A. **Clopidogrel.** Drugs, v. 54, n. 5, p. 745–750, 1997.
- DE SANTI, M. *et al.* **Cutaneous melanoma in a red-footed tortoise (*Chelonoidis carbonaria*).** Journal of Exotic Pet Medicine, v. 34, p. 44–47, 2020.
- DI VIRGILIO, F. and VUERICH, M. **Purinergic signaling in the immune system.** Autonomic Neuroscience, v. 191, p. 117–123, 2015.
- DORSAM, R. T. and KUNAPULI, S. P. **Central role of the P2Y 12 receptor in platelet activation.** The Journal of clinical investigation, v. 113, n. 3, p. 340–345, 2004.
- ELTZSCHIG, H. K. *et al.* **Purinergic signaling during inflammation.** New England Journal of Medicine, v. 367, n. 24, p. 2322–2333, 2012.
- GARCÍA, M. e COMA, C. **Características estructurales y funcionales de las plaquetas.** Rev Cubana Angiol y Cir Vasc, v. 1, n. 2, p. 132–141, 2000.
- GEBREMESKEL, S. *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.
- GILABERTE, Y. *et al.* **Anatomy and Function of the Skin.** In: Nanoscience in Dermatology. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 1–14.
- GRIVENNIKOV, S. I. *et al.* **Immunity, inflammation, and cancer.** Cell, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.
- HOADLEY, K. A. *et al.* **Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin.** Cell, v. 158, n. 4, p. 929–944, 2014.
- HODIS, E. *et al.* **A landscape of driver mutations in melanoma.** Cell, v. 150, n. 2, p. 251–263, 2012.

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

INCA. **incidência de câncer no Brasil.** *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 60, n. 1, p. 63–64, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é Câncer.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **No Melanoma.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>> 2020.

JIANG, X.-L. *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*, v. 82, p. 64–78, 2016.

JUNGER, G. J. **Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling.** *Nature Reviews Immunology*, v.11, p. 201-2012, 2011.

KAJIGAYA, H. *et al.* **Metastatic melanoma appearing to originate from the beak of a racing pigeon (*Columba livia*).** *Avian diseases*, v. 54, n. 2, p. 958–960, 2010.

KAZUI, M. *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.

KHAVKIN, J. and ELLIS, D. A. F. **Aging skin: histology, physiology, and pathology.** *Facial Plastic Surgery Clinics*, v. 19, n. 2, p. 229–234, 2011.

KOPP, H.-G. *et al.* **Platelet-derived transforming growth factor- β down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity.** *Cancer research*, v. 69, n. 19, p. 7775–7783, 2009.

KOSZAŁKA, P. *et al.* **CD73 on B16F10 melanoma cells in CD73-deficient mice promotes tumor growth, angiogenesis, neovascularization, macrophage**

infiltration and metastasis. The international journal of biochemistry & cell biology, v. 69, p. 1–10, 2015.

LABELLE, M. *et al.* **Platelets guide the formation of early metastatic niches.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 111, n. 30, p. E3053–E3061, 2014.

LIN, W.-W. and KARIN, M. **A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer.** The Journal of clinical investigation, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.

MANICA, A. *et al.* **High levels of extracellular ATP lead to chronic inflammatory response in melanoma patients.** Journal of cellular biochemistry, v. 119, n. 5, p. 3980–3988, 2018.

MARKOVIC, S. N. *et al.* **Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis.** Mayo Clinic Proceedings. Anais...Elsevier, 2007

MENTER, D. G. *et al.* **Platelet “first responders” in wound response, cancer, and metastasis.** Cancer and Metastasis Reviews, v. 36, n. 2, p. 199–213, 2017.

MILLER, A. J. and MIHM JR, M. C. **Melanoma.** New England Journal of Medicine, v. 355, n. 1, p. 51–65, 2006.

MITRUGNO, A. *et al.* **The role of coagulation and platelets in colon cancer-associated thrombosis.** American Journal of Physiology-Cell Physiology, v. 316, n. 2, p. C264–C273, 2019.

NAGY JR, B. *et al.* **Contribution of the P2Y12 receptor-mediated pathway to platelet hyperreactivity in hypercholesterolemia.** Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 9, n. 4, p. 810–819, 2011.

OLEKSOWICZ, L. and DUTCHER, J. P. **Adhesive receptors expressed by tumor cells and platelets: novel targets for therapeutic anti-metastatic strategies.** Medical Oncology, v. 12, n. 2, p. 95–102, 1995.

OLIVEIRA, I. *et al.* **Plaquetas: Papéis tradicionais e não tradicionais na**

hemostasia, na inflamação e no câncer. ABCS Health Sciences, v. 38, n. 3, 2013.

PLACKE, T. *et al.* **Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells.** Cancer research, v. 72, n. 2, p. 440–448, 2012.

PSATY, E. L. and HALPERN, A. C. **Current and emerging technologies in melanoma diagnosis: the state of the art.** Clinics in dermatology, v. 27, n. 1, p. 35–45, 2009.

RIES, L. A. G. *et al.* **The annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1997, with a special section on colorectal cancer.** Cancer, v. 88, n. 10, p. 2398–2424, 2000.

ROBSON, S. C. *et al.* **The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance.** Purinergic Signalling, v. 2, n. 2, p. 409–430, 2006.

SAHOO, N. 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.

SANDOZ. **Bula do Bissulfato de Clopidogrel.** Indústria Farmacêutica, 1999

SANTANA, P. T. *et al.* **P2Y12 receptor antagonist clopidogrel attenuates lung inflammation triggered by silica particles.** Frontiers in pharmacology, v. 11, 2020.

SAVI, P. *et al.* **P2Y12, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel.** Biochemical and biophysical research communications, v. 283, n. 2, p. 379–383, 2001.

SCHADENDORF, D. *et al.* **Melanoma.** The Lancet, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 2018.

SHAIN, A. H. *et al.* **The genetic evolution of melanoma from precursor lesions.** New England Journal of Medicine, v. 373, n. 20, p. 1926–1936, 2015.

SMYTH, M. J. *et al.* **Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor**

immunogenicity. *Advances in immunology*, v. 90, p. 1–50, 2006.

SONG, W.-M. *et al.* **Network models of primary melanoma microenvironments identify key melanoma regulators underlying prognosis.** *Nature communications*, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2021.

SULLIVAN, J. V. and MYERS, S. **Skin Structure and Function, Wound Healing and Scarring.** In: *Plastic Surgery-Principles and Practice*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 1–14.

SUN, X. *et al.* **CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression.** *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 29, n. 4, p. 709–722, 2010.

SUNG, H. *et al.* **Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.** *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWEET, M. *et al.* **Evidence of melanoma in wild marine fish populations.** *PloS one*, v. 7, n. 8, p. e41989, 2012.

TANIGUCHI, K. and KARIN, M. **NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age.** *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 5, p. 309, 2018.

UK, N. C. C. FOR C. **Suspected cancer: recognition and referral.** 2015.

WANG, Y. *et al.* **Platelet P2Y12 is involved in murine pulmonary metastasis.** *PloS one*, v. 8, n. 11, p. e80780, 2013.

WATTS, C. G. *et al.* **Clinical practice guidelines for identification, screening and follow-up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review.** *British Journal of Dermatology*, v. 172, n. 1, p. 33–47, 2015.

WOULFE, D. *et al.* **ADP and platelets: the end of the beginning.** *The Journal of clinical investigation*, v. 107, n. 12, p. 1503–1505, 2001.

YAGERMAN, S. and MARGHOOB, A. **Melanoma patient self-detection: a review of efficacy of the skin self-examination and patient-directed educational efforts.** *Expert review of anticancer therapy*, v. 13, n. 12, p. 1423–1431, 2013.

YAN, M. and JURASZ, P. **The role of platelets in the tumor microenvironment: from solid tumors to leukemia.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 3, p. 392–400, 2016.

YEGUTKIN, G. 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.

ZENG, H. *et al.* **The evolution of melanoma—moving beyond binary models of genetic progression.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 140, n. 2, p. 291–297, 2020.

ZILAKOS, N. P. and TSONIS, P. A. **A spontaneous melanoma-like tumor in the adult newt *Triturus cristatus*.** *Tumor biology*, v. 12, n. 2, p. 120–124, 1991.

ZIMMERMANN, H. **Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature.** *Drug Development Research*, v. 52, n. 1-2, p. 44–56, 2001.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da inibição do receptor P2Y12 em plaquetas na carcinogênese e sinalização purinérgica em modelo experimental de melanoma em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 8630040820 (0003167), sob a responsabilidade de **Daniela Bitencourt Rosa Leal** e equipe; *Matheus Henrique Jantsch; Jean Lucas Gutknecht da Silva; Alessandra Guedes Manzoni; Jaime Sardá Aramburú Júnior; Pedro Henrique Doleski* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 01/09/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of P2Y12 receptor inhibition in carcinogenesis, and purinergic signaling in the experimental model of melanoma", utilizing 44 isogenics mice (44 males), protocol number CEUA 8630040820 (0003167), under the responsibility of **Daniela Bitencourt Rosa Leal** and team; *Matheus Henrique Jantsch; Jean Lucas Gutknecht da Silva; Alessandra Guedes Manzoni; Jaime Sardá Aramburú Júnior; Pedro Henrique Doleski* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/01/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 01/2021 a 12/2023

Área: Departamento de Microbiologia E Parasitologia

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 7 semanas](#)

N: [44](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Local do experimento: Labíbio prédio 20 sala 4229

Santa Maria, 11 de maio de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria