



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BIANCA REGINA RIBAS DE ABREU

**PAPEL DOS RECEPTORES P1 E DA CAFEÍNA NA PROLIFERAÇÃO DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO**

Porto Alegre
2014

BIANCA REGINA RIBAS DE ABREU

**PAPEL DOS RECEPTORES P1 E DA CAFEÍNA NA PROLIFERAÇÃO DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO**

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

Orientadora: Profa Dr Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre
2014

BIANCA REGINA RIBAS DE ABREU

**PAPEL DOS RECEPTORES P1 E DA CAFEÍNA NA PROLIFERAÇÃO DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO**

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

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dra Rosane Souza Silva - PUCRS

Dr Pablo Machado – PUCRS

Dra Elizandra Braganhol - UFPEL

Porto Alegre
2014

Dedico esta dissertação aos meus pais Breno e Silvia que pouco tiveram, mas tudo me deram e sempre encontraram uma forma de proporcionar meus estudos, além do extremo amor e dedicação por mim...

Aos meus irmãos Breno e Bruno e Cunhadas Leoni e Sharlene por me apoiarem, incentivarem e sempre estarem ao meu lado...

Ao meu amado marido Bruno que me ensinou muito do que eu sei tanto na área acadêmica como na vida.

AGRADECIMENTOS

Pais: Como eu disse na dedicatória: Pouco tiveram e tudo me deram. Vocês são os melhores pais do mundo, é inacreditável o como vocês conseguiram educar tão bem seus 3 filhos... Com tão pouco, com muita dificuldade que já passamos e vocês sempre deram um jeito de nos manter estudando! E vejam, 3 filhos formados, pós-graduados, casados e felizes... Isso tudo é graças à vocês, vocês são meus maiores exemplos de dedicação! Eu não tenho palavras para explicar o sentimento que eu tenho, por que simplesmente dizer que amo vocês me parece pouco! Obrigada por ser quem são, por acreditar em mim e me apoiarem tanto, eu amo, amo, amo muito vocês e esse título é para vocês!

Bru e Leoni... Meus segundos pais... Nesse tempo todo no RS cuidando de mim, se preocupando sempre, me apoiando, dando conselhos, passando por tudo juntos. É obvio que nem preciso dizer que se não fossem vocês, metade de tudo que me aconteceu não teria acontecido... Obrigada por tudo que vocês já fizeram por mim, eu amo muito vocês!

Bre e Sha... Um pouco mais longe, mas sempre presentes... O Breno dando aquele "chacoalho" quando precisei e a Sha me ouvindo... Sempre me agradando e fazendo de tudo por mim, obrigada por fazerem parte da minha vida, eu amo muito vocês!

Amor, você bem sabe que metade desse título é teu né? Me ajudou tanto, compreendeu quando eu não tinha tempo, vontade ou paciência para sair porque precisava terminar a dissertação... E você sempre ao meu lado, entendendo e ajudando... Não tenho como te agradecer, só queria te dizer o quanto você foi importante para esse mestrado e o quanto é importante para a minha vida! Te amo querido!

Aos amigos Tássia e Rafael por fazerem parte desses anos, por serem tão divertidos e sempre me fazerem rir e ouvirem minhas reclamações. Vocês são muito importantes para mim!

Aos meus primeiros orientadores Paulo Tadeu Campos Lopes, Gabriela Augusta Mateus Pereira, Ana Maria Pujol, Heloísa Helena Rodrigues de Andrade, e em especial Mauricio Lehmann e Rafael Dihl... Se hoje sou uma pesquisadora em potencial devo isso à vocês, por me fazerem me apaixonar pela pesquisa e por me incentivarem e acreditarem no meu potencial.

À minha querida orientadora Fernanda, que aceitou me orientar, mesmo com as dificuldades de horário... Que acreditou em mim e me ensinou tanto!

Aos colaboradores do projeto Talita, Rafael, Professores Maria Martha, Maurício Bogo, sem vocês esse trabalho não seria o mesmo.

Aos colegas e amigos do laboratório de farmacologia, principalmente ao André por toda ajuda, amizade e parceria, ao Rodrigo pelos almoços, conversas e por me agüentar na última disciplina, onde eu já nem tinha mais forças para ler artigos... À Kesi e a Raquel pelos cafés e maravilhosas conversas... Mas em especial um agradecimento eterno à duas pessoas que se tornaram parte da minha vida: Marina e Priscila... Mais do que colegas de laboratório entraram na minha vida e ficaram, e fizeram com que meus dias fossem muito melhores, vocês sabem, eu amo vocês!

RESUMO

O câncer de esôfago é o oitavo câncer mais comum no mundo. O prognóstico para esse tipo de câncer é ruim, geralmente, a taxa de sobrevivência global é de 10-15% com cerca de cinco anos de sobrevida. A adenosina está presente em diferentes tecidos de vários organismos e tem um papel extremamente importante no sistema purinérgico. Ela é produzida direta ou indiretamente através do ATP e tem como alvo receptores purinérgicos P1 que são acoplados à proteína G (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3). A cafeína é um antagonista não seletivo de adenosina e tem baixa afinidade pelos receptores A_3 e grande afinidade pelos receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} . O objetivo deste trabalho foi investigar o papel dos receptores purinérgicos P1 e a ação da cafeína e da adenosina na proliferação de carcinoma de células escamosas de esôfago, utilizando a linhagem humana de carcinoma de células escamosas de esôfago OE21. Primeiro demonstramos que os receptores P1 estão expressos na linhagem celular através de qRT-PCR, e que a expressão do receptor A_{2A} foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) quando essas células foram tratadas com cafeína (100 μ M). Em adição o tratamento com a cafeína também diminuiu significativamente a viabilidade (1, 5 e 10 mM) das células e este efeito foi provavelmente um tipo de morte celular não-apoptótica. De modo semelhante, a adenosina diminuiu a viabilidade celular (1, 5 e 10 mM) e a proliferação (5 mM) através de apoptose, e o dipiridamol (10 μ M) afetou a viabilidade celular e não alterou o tipo de morte causada. Estes resultados demonstram, através de investigação *in vitro*, a ação dos receptores P1 adenosina e da cafeína no câncer de esôfago e este é um primeiro passo para entender de sinalização purinérgica no câncer de esôfago.

Palavras-chave: Cafeína, Câncer de esôfago, Adenosina, Receptores P1

ABSTRACT

Esophageal cancer is the eighth most common cancer worldwide. The prognosis for this cancer is poor, generally, the overall survival rate is 10-15% about five years of survival. Adenosine is present in different tissues of various organisms and plays an extremely important role in the purinergic system. Adenosine is produced directly or indirectly by ATP and its target P1 receptors which are G-protein coupled (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3). Caffeine is a non-selective adenosine antagonist and has low affinity for A_3 great affinity for A_1 , A_{2A} and A_{2B} . The objective of this study was to investigate the role of P1 purinergic receptors and the action of caffeine on the proliferation of squamous cell carcinoma of the esophagus, using the human lineage of squamous cell esophageal OE21. First we demonstrated that P1 receptors are expressed in the cell line by means of qRT-PCR and still A_{2A} receptor expression was significantly reduced when these cells were treated with caffeine (100 μ M). In addition to the caffeine treatment also decreases cell proliferation (1, 5 e 10 mM) and this effect was most likely a type of non-apoptotic cell death. Similarly, adenosine decreases cell viability (1, 5 and 10 mM) and proliferation (5 mM) via apoptosis and dipyridamole (10 μ M) affect cell viability and did not alter the type of death caused. These results demonstrate the *in vitro* investigation of adenosine and caffeine in esophageal cancer receptors and this is a first step to understanding of purinergic signaling in esophageal cancer.

Key-words: Caffeine, Esophageal Cancer, Adenosine, P1 receptors.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
1.1 Câncer de esôfago.....	10
1.2 Sistema Purinérgico.....	12
1.3 Cafeína.....	16
1.4 Câncer, Receptores P1 e Cafeína.....	17
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 Artigo Científico.....	21
4 Considerações Finais.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – Adenosina Desaminase

ADO - Adenosina

ADP – Adenosina 5'- difosfato

AKT – Proteína antiapoptótica

ATP – Adenosina 5'- trifosfato

CAF - Cafeína

cAMP – adenosina 5'-monofosfato cíclico

CD73 – enzima ecto-5"-nucleotidase

ENT – Transportadores de Nucleosídeo Equilibrativas

ESCC - Carcinoma de células escamosas de Esôfago

FDA – *Food and Drug Administration*

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógenos

OE-21 – Células de carcinoma de células escamosas de esôfago

OMS – Organização Mundial da Saúde

p38 – Proteína Cinase ativada por MAPK

P450 – Complexo de enzimas envolvidas em metabolização

UDP – Uridina 5'- difosfato

UTP – Uridina 5'- trifosfato

INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de esôfago

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o câncer é responsável por cerca de 13 % de todas as causas de morte no mundo. Mais de 7 milhões de pessoas morrem dessa doença por ano e com o passar das décadas, o câncer começou a ser considerado um problema de saúde pública e, assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que até 2030 serão cerca de 21,4 milhões de novos casos de câncer, 13 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas por ano viverão com câncer (INCA, 2014).

O câncer de esôfago é o oitavo câncer mais comum no mundo. O prognóstico para esse tipo de câncer é ruim, geralmente, a taxa de sobrevivência global é de 10-15% com cerca de cinco anos de sobrevida, principalmente em casos em que a doença é detectada nos estágios finais e de forma geral as taxas de mortalidade e incidência são parecidas, em função de sua alta letalidade (Parkin, Bray et al. 2005).

Para o câncer de esôfago no Brasil, são esperados 8.010 casos novos em homens e 2.770 em mulheres ao longo do ano de 2014. Isso é o equivalente a um risco de 8,18 casos novos a cada 100 mil homens e 2,70 a cada 100 mil mulheres. O câncer de esôfago na região sul do Brasil tem uma taxa de incidência 15,97 em 100 mil para homens e para mulheres 5,27 a cada 100 mil e afeta cerca de 450 mil pessoas por ano em todo o mundo (Figura 1) (INCA, 2014).

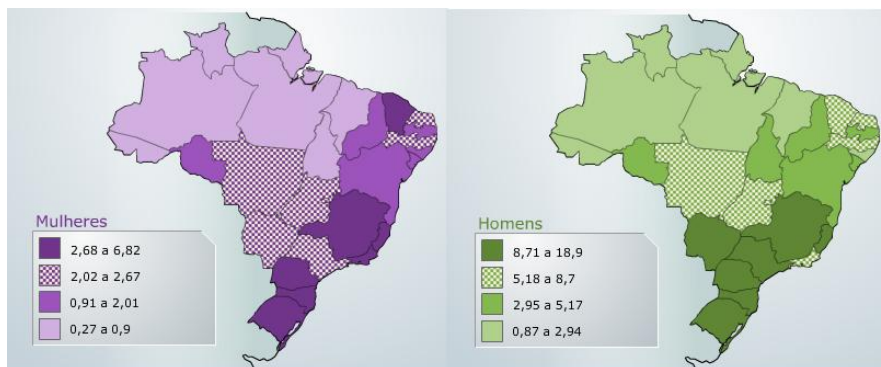


Figura 1. Incidência do câncer de esôfago no Brasil para o ano de 2014 (INCA, 2014)

Os sintomas mais comuns desse tipo de câncer são a disfagia, odinofagia, náuseas e vômitos. O diagnóstico de tumores de esôfago é realizado através de biopsia e análise histológica do tecido, além de prévia endoscopia. Geralmente, os tumores mais localizados são tratados cirurgicamente e nos maiores são aplicados tratamento paliativo, através de quimioterapia, radioterapia ou a combinação entre as duas (Enzinger and Mayer 2003).

Os fatores de risco apresentam grande heterogeneidade principalmente em função de distribuição geográfica, e de maneira geral, pela idade, histórico familiar, consumo de álcool, fumo, infecções orais por fungos, agentes infecciosos, deficiência de riboflavina e vitamina A, ingestão excessiva em alta temperatura de erva-mate – um hábito comum no sul do Brasil, Argentina e Uruguai – são considerados fatores de risco relacionados ao câncer de esôfago (Ajani, Barthel et al. 2011). Já o uso de aspirina e anti-inflamatórios não esteroidais, alta ingestão de antioxidantes, frutas frescas e vegetais, principalmente crus, são considerados fatores de proteção por estarem associados à diminuição do risco desse câncer (INCA, 2014).

Os cânceres resultantes da mucosa esofágica em sua maioria podem ser classificados em dois principais tipos: adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (ESCC) (Ruschoff 2012). Tem sido relatado na literatura também a presença de sarcomas e carcinomas de células pequenas em menos de 1-2% de todos os casos de câncer de esôfago, e raramente carcinomas do tipo melanomas, leiomiossarcoma, carcinóides, e linfomas têm demonstrado capacidade de se desenvolver no esôfago (Zhang 2013).

O adenocarcinoma é o mais comumente encontrado na América do Norte, Reino Unido, Irlanda e Austrália e está associado a uma melhora prognóstica maior do que o carcinoma de células escamosas (Hongo, Nagasaki et al. 2009). Está frequentemente relacionado com a doença do refluxo gastroesofágico. Neste

tipo, o câncer surge a partir de células glandulares que estão presentes na junção do esôfago e do estômago (Verschuur and Siersema 2010).

O carcinoma de células escamosas é o tipo histológico predominante de câncer de esôfago em todo o mundo (Zhang 2013). Este tipo de câncer surge a partir de células que revestem a parte superior do esôfago e está frequentemente relacionado com o esôfago de Barret (Enestvedt and Ginsberg 2013). O esôfago de Barret é uma lesão pré-cancerígena caracterizada por uma mudança na mucosa esofágica em função de uma exposição crônica e prolongada ao ácido do refluxo gastroesofágico (Haidry, Dunn et al. 2013).

Esta patologia é considerada uma neoplasia maligna incomum e com grande potencial letal. A incidência de ESCC aumenta com idade e é três vezes maior em negros do que em brancos, enquanto adenocarcinomas são mais comuns em homens brancos (Zhang 2013). Geralmente acomete mais homens do que mulheres e ocorre com maior incidência após os 65 anos de idade. Ultimamente, este tipo de câncer de esôfago tem sido relatado como associado a níveis sócio-econômicos mais baixos (Baba, Watanabe et al., 2014).

1.2 Sistema Purinérgico

Purinas (ATP, ADP e ADO) e pirimidinas (UTP e UDP) extracelulares podem atuar como moléculas sinalizadoras participando de vários efeitos e processos biológicos, tais como, neurotransmissão, secreção, resposta imunológica, inflamação, agregação plaquetária, dor, entre outros (Burnstock 2006a).

Existem duas principais famílias de receptores purinérgicos: os receptores de adenosina ou P1 e os receptores P2. Os receptores P2 se dividem em P2X (ionotrópicos) e P2Y (metabotrópicos). Os P2Y por sua vez, dividem-se em P2Y₁, P2Y₂, P2Y₃, P2Y₄, P2Y₅, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, que podem ativar a fosfolipase C e conseqüentemente liberar cálcio intracelular ou, afetar a adenilil ciclase e alterar os níveis de AMPc (Burnstock 2004). Já os receptores P2X são

classificados em P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇ e induzem o influxo de sódio e cálcio, ativando cascatas de sinalização intracelulares dependentes de cálcio, e o efluxo de potássio (Stagg and Smyth 2010).

A adenosina (ADO) está presente em diferentes tecidos de vários organismos e tem um papel extremamente importante no sistema purinérgico. A adenosina é produzida direta ou indiretamente através do ATP e tem grande importância na modulação de diferentes processos fisiológicos como angiogênese, proliferação, apoptose, entre outros (Latini and Pedata 2001). Além disso, a adenosina desempenha um importante papel tanto no controle de resposta imune inata quanto adaptativa, e está comprovado que a desregulação de concentração de adenosina está envolvido em patologias, tais como, epilepsia neurodegenerativa e distúrbios psiquiátricos (Abbracchio, Burnstock et al. 2009).

A adenosina é produzida tanto intra como extracelularmente. Quando produzida intracelularmente a cascata se inicia a partir do seu precursor imediato, 5'-monofosfato de adenosina (5' - AMP), através da enzima 5' - nucleotidase . Além disso, ela pode seguir mais de uma via metabólica. ADO pode ser metabolizada a inosina pela enzima adenosina deaminase (ADA) e posteriormente à hipoxantina, além de poder também ser convertida à ácido úrico pela xantina oxidase. A adenosina também pode ser re-convertida à 5' - AMP por ação da enzima adenosina quinase e em seguida ao ADP e ATP (Sheth, Brito et al. 2014). As enzimas denominadas ectonucleotidases são as enzimas que têm a capacidade de hidrolisar os nucleotídeos extracelulares, que em sua maioria se encontram na superfície celular, mas em alguns casos podem ser encontradas no meio intersticial ou nos fluídos corporais (Zimmermann 2006). Em condições patológicas, como a inflamação, a adenosina é derivada da conversão enzimática de ATP e ADP em AMP através das ectonucleotidases, e após é convertido em adenosina através de outra ectoenzima, a 5' ectonucleotidase (CD73) (Eltzschig, Sitkovsky et al. 2012).

A adenosina pode também ser transportada através de transportadores específicos do tipo equilibrativos (ENT) e concentrativos (CNT) para o espaço

extracelular. Esses transportadores são bidirecionais passivos que atravessam a adenosina pela membrana plasmática por diferença nos gradientes de concentração (Sheth, Brito et al. 2014).

Os receptores P1 são membros da família de receptores acoplados à proteína G (Figura 2), são metabotrópicos e se dividem em 4 subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, de acordo com a estrutura molecular, bioquímica e caracterização farmacológica (Burnstock 2004); (Burnstock 2006b); (Zimmermann 2006); (Verkhatsky and Burnstock 2014). Estes receptores diferem na sua afinidade para adenosina, no tipo de proteína G que eles recrutam (Tabela 1) e nas vias de sinalização que são ativadas na célula alvo (Ciruela, Albergaria et al. 2010). Geralmente, os receptores A₁ e A₃ quando ativados são inibidores da produção de AMP cíclico e também regulam fosfolipases e conseqüentemente a síntese de inositol trifosfato (Fredholm, Irenius et al. 2001).

Tabela 1: Principais agonistas, antagonistas, distribuição tecidual e mecanismos de transdução dos receptores de adenosina. (Adaptado de (Burnstock 2007))

Receptor	Principal distribuição tecidual	Agonistas	Antagonistas	Mecanismos de Transdução
A ₁	Cérebro, Medula espinhal, Testículos, Coração, Terminais nervosos autonômicos	CCPA, CPA, S-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-0840, MRS1754, N-0840, WRC-0571	G _{I/o} ↓ cAMP
A _{2A}	Cérebro, Coração, Pulmões, Baço	CGS 21680, HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261, ZM241385, KW 6002	G _s ↑ cAMP
A _{2B}	Intestino Grosso,	NECA (não-	Emprophylline,	G _s ↑ cAMP

	Bexiga	seletivo)	MRE2029-F20, MRS17541, MRS 1706	
A ₃	Pulmão, Fígado, Cérebro, Testículos e Coração	IB-MECA, 2- CI-IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS 1220, L- 268605, MRS1191, MRS1523, VUF8504	G _{1/o} G _{q/11} ↓ cAMP IP ₃

Receptores A_{2A} e A_{2B} são estimuladores da produção de AMP cíclico. Dependendo do tipo celular, outras combinações de proteína G têm sido reveladas e todos receptores de adenosina tem mostrado capacidade de ativar famílias de proteína-quinases ativadas por mitógenos MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Fredholm, Irenius et al. 2001).

As MAPKs são proteínas quinases ativadas por mitógenos, membros da subfamília de proteínas serina/treonina extremamente importantes na regulação da proliferação e diferenciação celular, apoptose, inflamação, além de respostas a estresse ambiental (Raman, Chen et al. 2007). A p38 MAPK é uma proteína quinase que vem sendo estudada em células de câncer, e a ativação dessas vias de sinalização produz efeitos anti-apoptóticos e/ou proliferativos (Koul, Pal et al. 2013).

Por outro lado, a sinalização celular através da via PI3K/AKT está intimamente envolvida no controle da apoptose e da proliferação celular através da inibição (fosforilação) da proteína BAD e ativação de inúmeros substratos apoptóticos e estes são fatores diretamente relacionados ao câncer (Datta, Brunet et al. 1999).

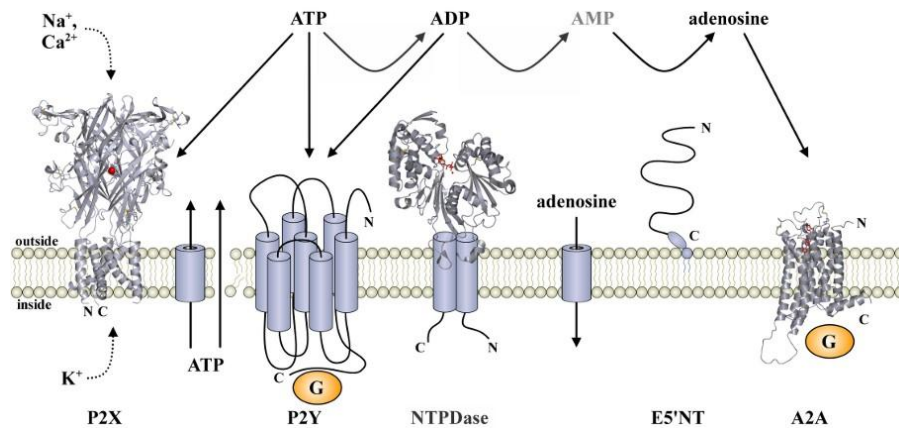


Figura 2. Receptores purinérgicos e cascata de conversão de ATP à Adenosina (Fields and Burnstock 2006)

1.3 Cafeína

A cafeína é amplamente conhecida por atuar no sistema nervoso central causando efeitos estimulantes como o aumento do estado de alerta e diminuição da fadiga. Além disso, é uma das substâncias psicoativas mais consumidas do mundo. Foi primeiramente isolada em 1920, mas sua estrutura foi completamente estabelecida na última década do século XIX. A cafeína é um alcalóide e faz parte do grupo de metilxantinas. Ela está presente em mais de 60 espécies de plantas, geralmente pertencentes à família Rubiaceae, principalmente nas espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (Sawynok 2011a).

A cafeína é um agente estimulante mundialmente consumido em bebidas como chá, café, refrigerantes e energéticos e também está presente no chocolate. A quantidade de cafeína presente nessas bebidas ou alimentos depende de vários fatores, tais como a espécie e a maneira pela qual a planta foi extraída, o tipo de grão de café, cacau ou folha de chá, a localização geográfica, o clima no qual ela foi cultivada, entre outros (Sawynok 2011a). Pesquisas de base populacional nos EUA demonstram que um adulto consome em média aproximadamente 193 mg por dia de cafeína (Sawynok 2011b).

A cafeína possui propriedades antioxidantes e é muito utilizada na formulação de vários medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios. (Elmenhorst, Meyer et al. 2012). Quando administrada por via oral, a concentração plasmática máxima ocorre de 30 minutos a 2 horas. É absorvida pelo trato gastrointestinal de forma rápida e completa, com biodisponibilidade de 100% e alta solubilidade tanto em água quanto em solventes orgânicos não polares. Por isso atravessa rapidamente as membranas celulares, assim como a barreira hematoencefálica e placentária, atingindo grandes concentrações em todo o corpo, inclusive no encéfalo. Sua ligação a proteínas plasmáticas, principalmente à albumina, é de 10 a 35 % e possui uma constante de inibição (K_i) de 44 e 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Carrillo and Benitez 2000).

Ela é metabolizada por enzimas do complexo P450 como CYP1A2 e é metabolizada em 3 principais compostos: a paraxantina (84 %), a teobromina (12 %) e a teofilina (4 %). Entretanto, na literatura já foram descritos cerca de 25 metabólitos da cafeína. Cabe ressaltar que existem grandes diferenças na concentração plasmática da cafeína em cada indivíduo devido a variabilidade genética presente nos genes que são responsáveis por essa metabolização (Tavares and Sakata 2012).

Devido à semelhança estrutural entre a cafeína e a adenosina, a cafeína tem a capacidade de se ligar e antagonizar não seletivamente os receptores purinérgicos P1 (Tavares and Sakata 2012). A cafeína tem baixa afinidade pelos receptores A_3 tanto em roedores como em humanos e tem grande afinidade pelos receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} (Sawynok 2011) Também pode atuar no sistema nervoso central, interagindo com receptores GABA_A , desempenhando papel como antagonista ou agonista reverso nos locais de ação dos benzodiazepínicos (Daly 2007).

1.4 Câncer, Receptores P1 e Cafeína

Desde 2006, a literatura vem demonstrando estudos em que a adenosina é utilizada clinicamente. O dipiridamol e o metotrexato são exemplos de fármacos que exercem efeitos através da alteração de concentração extracelular e de sinalização de adenosina. Além disso, já estão atualmente em uso medicamentos para o tratamento de taquicardia supraventricular (Adenocard® e Adenoscan®). O Lexiscan (Regadenoson®) é um medicamento usado na clínica que atua como agonista do receptor A_{2A} aprovado pelo FDA e é utilizado para perfusão miocárdica em pacientes com suspeita de doença arterial coronariana. Além disso, vários ensaios clínicos com agonistas de receptores P1 estão sendo conduzidos atualmente (Chen, Eltzhig et al. 2013)

Sabe-se que a adenosina promove a cicatrização de feridas e medeia a angiogênese via receptores A_{2A} (Merighi, Mirandola et al. 2002) e A_{2B} (Feoktistov, Goldstein et al. 2002), e que a angiogênese é um processo fundamental para o crescimento do tumor e metástases (Montesinos, Desai et al. 2002). Também tem sido demonstrada sua participação na redução do crescimento de tumores via apoptose através dos receptores A_1 , A_{2A} e A_3 (Gessi, Merighi et al. 2011).

Diversos efeitos dos receptores P1 foram descritos em vários tipos de câncer, tais como adenocarcinoma de cólon e tecidos peritoniais (Khoo, Ho et al. 1996), leucemias e linfomas (Gessi, Varani et al. 2001; Merighi, Varani et al. 2001), tumores de mama (Mirza, Basso et al. 2005), gliomas (Bauer, Langen et al. 2005), entre outros, entretanto, não há relatos em carcinoma de células escamosas de esôfago.

Não é de hoje que a relação entre a cafeína e o câncer tem apresentado grande interesse. Muitas pessoas em todo o mundo consomem cafeína em doses que são capazes de antagonizar receptores de adenosina. Este interesse está centrado principalmente na variedade de compostos encontrados no café – a forma mais consumida da cafeína. O café possui dois diterpenos, o cafestol e o kahweol, que podem produzir efeitos biológicos compatíveis com atividades anticâncer. Além disso, contém polifenóis, flavonóides e ácido clorogênico que contribuem para o efeito antioxidante (Nkondjock 2009).

Estudos epidemiológicos recentes sugerem que o consumo de café diminui o risco de alguns tipos de cânceres, como câncer de cólon, fígado, mama, endométrio e hepatocelular (Gallus, Bertuzzi et al. 2002); (Larsson and Wolk 2007); (Bravi, Bosetti et al. 2007); (Je, Liu et al. 2009); (Tang, Zhou et al. 2009). Além disso, existem estudos que sugerem que a cafeína melhora as respostas anti-tumorais através da inibição da angiogênese, mediada por adenosina (Ohta, Gorelik et al. 2006).

Atualmente, várias tentativas têm sido realizadas para desenvolver um tratamento para o câncer baseando-se em alvos mais específicos, ou seja, alvos que sejam principalmente expressos no tumor, e não em células normais. A adenosina é encontrada no fluido intersticial do tumor em concentrações que são capazes de modular o crescimento do mesmo interagindo com os receptores purinérgicos P1. Deste modo, já que os receptores P1 estão expressos diferentemente em células normais e em células tumorais, torna-se de grande interesse investigar a ação da adenosina e do antagonista não seletivo, cafeína, em células de câncer de esôfago.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel dos receptores purinérgicos P1 e a ação da cafeína na proliferação de carcinoma de células escamosas de esôfago, utilizando a linhagem humana OE21.

2.2 Objetivos Específicos

a. Avaliar a expressão dos receptores P1 na linhagem humana de carcinoma de células escamosas de esôfago OE21, utilizando a técnica de PCR quantitativo em tempo real (q-RT-PCR);

b. Comparar a ação da adenosina, da cafeína (antagonista não-seletivo de receptores P1), e dos antagonistas seletivos dos receptores purinérgicos P1 na viabilidade e proliferação da linhagem de carcinoma de células de esôfago (OE21) através do ensaio MTT e do teste de exclusão pelo azul de tripan;

c. Avaliar a ação do dipiridamol (inibidor de transporte de adenosina) na viabilidade da linhagem de carcinoma de células de esôfago (OE21) através do ensaio MTT;

d. Avaliar o tipo de morte celular causada pelo agonista, antagonistas dos receptores P1 e pelo dipiridamol na linhagem OE21, utilizando citometria de fluxo;

e. Investigar as vias de sinalização intracelular (Akt e p38), por citometria de fluxo, nas linhagens de câncer de esôfago humano estimuladas pela cafeína, pela adenosina e pelo dipiridamol.

3. ARTIGO CIENTÍFICO:

ROLE OF P1 RECEPTORS AND CAFFEINE ON PROLIFERATION OF
ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELLS CARCINOMA

Será submetido ao periódico “European Journal of Pharmacology”
Fator de Impacto 2.778

ROLE OF P1 RECEPTORS AND CAFFEINE ON PROLIFERATION OF ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELLS CARCINOMA

Bianca Regina Ribas de Abreu^a, Marina Petersen Gehring^a, André Avelino dos Santos Junior^a, Luis Felipe Ribeiro Pinto^b, Talita Carneiro Brandão Pereira^c, Rafael Fernandes Zanin^a, Mauricio Reis Bogo^{a,c}, Fernanda Bueno Morrone^{a,c,d}

^a Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular PUCRS
Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C, Sala 110, Partenon
Porto Alegre, RS, Brazil 90619-900

^b Coordenação de Pesquisa em Oncologia, INCA
Rua Andre Cavalcante 37, 2º andar, Fátima
Rio de Janeiro, RJ - Brazil 20231-050

^c Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS
Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C, Sala 172, Partenon,
Porto Alegre, RS, Brazil 90160-090

^d Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS,
Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C, Sala 101, Partenon,
Porto Alegre, RS, Brazil 90619-900

Corresponding author:

Fernanda Bueno Morrone

Laboratório de Farmacologia Aplicada, PUCRS,

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12C, Sala 148, Partenon,

Porto Alegre, RS, Brazil 90619-900

e-mail: fbmorrone@gmail.com ou fernanda.morrone@puers.br

Abstract: Esophageal cancer is the eighth most common cancer worldwide. The prognosis for this cancer is poor; generally, the overall survival rate is 10-15% about five. Adenosine is present in different tissues of various organisms and it plays an important role in the purinergic system. Adenosine is produced directly or indirectly by ATP hydrolysis, and its target P1 receptors are G-protein coupled (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3). Caffeine is a non-selective P1 antagonist that has low affinity for A_3 and great affinity for A_1 , A_{2A} and A_{2B} . The aim of this study was to investigate the role of P1 purinergic receptors and the action of caffeine on the proliferation of esophageal squamous cells carcinoma, using the human cell line OE21. First, we have shown that the mRNA of P1 receptors are expressed in this cell line by means of RT-qPCR, and that A_{2A} mRNA expression was significantly reduced when these cells were treated with caffeine. In addition, caffeine treatment also decreases cell viability, and this effect was most likely a non-apoptotic cell death. Furthermore, Ado can inhibit OE-21 cell proliferation and reduce viability. These results show the effect of P1 receptors and caffeine in esophageal cancer and propose a first step to understanding of purinergic signaling in esophageal cancer.

Keywords: Caffeine, Esophageal Cancer, Adenosine, P1 receptors.

1. Introduction

Esophageal cancer is the eighth more common cancer in the world and the sixth most deadly cancer (Zhang, Pan et al. 2014). In southern Brazil it has an incidence rate of 15.97 per 100 thousand for men and 5.27 per 100 thousand for women, and affects about 450,000 people a year worldwide (INCA, 2014). Tumors originated in the esophageal mucosa are classified into two major types: adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. This classification is based on the type of cells which originate the tumor, where adenocarcinoma refers to glandular cells and squamous cell carcinoma is originated from epithelial cells (Ruschoff 2012). The esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) comprehends more than 90% of esophageal cancers and the prognosis for this cancer is poor (Wu, Herman et al. 2014; Xue, Yang et al. 2014).

Adenosine (Ado) is produced directly or indirectly by ATP hydrolysis, and it is an important signaling molecule that activates specific transmembrane receptors in most cell types and can generate diverse biological effects. Ado receptors are called P₁ and four subtypes have been identified, A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃, all G protein coupled receptors, with distinct tissue distribution and pharmacological properties (Schiedel, Lacher et al. 2013). These receptors differ in their affinity to adenosine: A₁, A_{2A} and A₃ exhibit high affinity, while A_{2B} displays low affinity for adenosine (Jarvis 2013).

Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis via A_{2A} (Merighi, Mirandola et al. 2002) and A_{2B} (Feoktistov, Goldstein et al. 2002) receptors, and it is known that angiogenesis is a critical process for tumor growth and metastasis (Montesinos, Desai et al. 2002). It has also been demonstrated its involved in the reduction of tumor growth via apoptosis through A₁, A_{2A} and A₃ receptors (Gessi, Merighi et al. 2011). Moreover, A_{2B} receptor has been reported to exhibit inhibitory activity on phosphorylation of ERK, cell migration, and capillary tube formation (Grant, Davis et al. 2001). Numerous effects of P₁ receptors have been described in several cancer types, such as colon adenocarcinoma, peritoneal tissues (Khoo, Ho et al. 1996), leukemias and lymphomas (Gessi, Varani et al. 2001; Merighi, Varani et al. 2001), breast tumors (Mirza, Basso et al. 2005), gliomas (Bauer, Langen et al. 2005), among others.

Caffeine is an alkaloid present in more than 60 plant species and belongs to the group of methylxanthines (Sawynok 2011). It is a non-selective P1 antagonist (Elmenhorst, Garibotto et al. 2011), and it is a stimulant agent widely consumed in beverages like tea and coffee. Furthermore, it has been used in the formulation of various analgesic and anti-inflammatory drugs. A recent meta-analysis demonstrated that the consumption of coffee decreases the risk of certain cancers such as bladder, breast, buccal, colorectal, endometrium, esophagus, hepatocellular, leukemia, pancreas and prostate (Yu, Bao et al. 2011).

Therefore, this study aimed to investigate the role of P1 receptors and its antagonist, caffeine, on the proliferation of esophageal carcinoma cells, in order to provide a better understanding of the purinergic signaling in this type of cancer.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Adenosine, caffeine and dipyrindamole were obtained from Sigma Aldrich (EUA). Antagonists for A₁ (DPCPX - Cat: 0439), A_{2A} (ZM241385 - Cat. No. 1036) and A₃ (MRS1220 - Cat: 1217) receptors were obtained from TOCRIS (UK) and antagonist of A_{2B} (MRS1754 - SC-301174) from Santa Cruz Biotechnology (USA).

2.2 Cell culture

OE-21 cell line is an esophageal squamous cell carcinoma THAT was obtained from donation FROM INCA (National Institute of Cancer - Brazil) and the cells were grown in RPMI (GIBCO) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin and amphotericin, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air at 37°C. Cells were detached by 0.25% trypsin/0.02% EDTA.

2.3 RT-qPCR assay

To verify the expression of adenosine receptors in OE-21 cell lines, RT-qPCR was performed. Therefore, 2 x 10⁵ cells/well were seeded in a 6-well plates and then were

treated. After treatment, total RNA was isolated with Trizol LS (Invitrogen). cDNA was synthesized by ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). Quantification was done by SYBR Green I (Invitrogen). Expression level was were determined with 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems Software v.2.0.6 (Applied Biosystems) and each sample efficiency were calculated by LinRegPCR Software. To determine relative expression of RNA, $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used. Through GeNorm 3.5 Software we analyzed the stability of reference genes 18S and GAPDH. The primers sequences are show in Table 1.

2.4 Cell Proliferation

Cells treated with adenosine or caffeine were evaluated through Trypan Blue exclusion test. Accordingly 2×10^4 cells/well were seeded in a 24 well plates and remained proliferating for 24 hours. Thereafter, cells were treated with Caffeine or Adenosine (100 μ M, 1 mM, 5 mM) and after 24 hours cells were counted by Neubauer's chamber with Trypan Blue.

2.5 Cell Viability

OE-21 cells were seeded at a density of 5×10^3 cells/well in a 96-well plate with 100 μ l of culture medium. After, the cells were treated with different concentrations of adenosine (100 μ M, 1 mM, 5 mM and 10 mM) or caffeine (100 μ M, 1 mM, 5 mM and 10 mM), in 24, 48 and 72 hours. Thereafter, the cells were then incubated at 37°C with 10 μ l of MTT (5 mg/ml) for 3 h in a 5% of CO₂ incubator. The medium was removed and 100 μ l of DMSO was added to each well. The optical density of each well was read at 595 nm using a microplate reader (Spectra MaxM2, Soft Max Pro 5 - Molecular Devices). To assess cell viability, the percentage of independent basal levels (MTT intensities from cells untreated) were calculated and used as control.

2.6 Cell Death Quantification

For cell death quantification, 2×10^5 cells/well were seeded in a 6-well plates and grown for 24 hours. Cells were treated with Adenosine (5 mM), caffeine (5 mM),

dipyridamole (10 μ M) or a combination of them. Dead cells were quantified by propidium iodide (PI) - Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences) 24 h after treatment, according to the manufacturer's instructions. Experiments were performed on FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences) and the results were analyzed using Flow Jo Software (Tree Star).

2.7 Cell Signaling

To determine the capacity of caffeine to activate intracellular signaling pathways, Akt and p38 MAPK, 2×10^5 cells/well were seeded in a 6-well plate and allowed to grow for 24 hours. To stop cell cycle, the cells were incubated for more 24 hours with RPMI with 0.5% of FBS and then were treated with Caffeine 100 μ M. After 0, 15 and 30 minutes of incubation, the cells were detached with trypsin solution incubated with Phosflow Fix Buffer (BD) for 10 min, and permeabilized with Phosflow Perm Buffer III (BD). The cells were incubated during 30 minutes with antibodies for Akt and p38 MAPK. Analysis was performed on flow cytometer (FACSCanto II) and the results analyzed using Flow Jo Software (Tree Star).

2.8 Statistical analyses

The statistical test used was t-test for PCR assay and one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) for other experiments, followed by Tukey or Bonferroni post hoc. Results are presented as mean and standard error of the mean. P values less than 0.05 (* P <0.05) for significance were considered. GraphPad Prism 5.0® program was used to generate graphs.

3. Results

Firstly, we used qRT-PCR to evaluate the expression of P1 receptors in the esophageal cancer cells treated or not with caffeine. Real-time PCR measurements confirmed the presence of all four P1 receptors subtypes in the investigated cells, although at different expression levels. As shown in Figure 1, OE-21 cells expressed A₁, A_{2A}, A_{2B},

A₃ receptors, and when the cells were treated with caffeine (100 μM), A_{2A} receptor had its expression levels decreased in comparison with non-treated cells.

Thereafter, we aimed to assess the role of P1 receptors and caffeine on the proliferation of esophageal tumor cells. Caffeine and Ado (100 μM and 1 mM) were not capable to alter cell proliferation capacity. However, only Ado at the highest concentration (5 mM) was able to significantly inhibit cell proliferation (Fig. 2). Next, we investigated the effect of P1 receptors antagonists on the esophageal cancer cell viability by MTT assay. As seen in Figure 3, reduction of cell viability was observed when cells were exposed to Ado and caffeine at different concentrations. The treatment with Ado (1, 5 and 10 mM) for either 24 h or 48 h was able to reduce the viability of OE-21 cells, while the cells treated for 72 h showed a reduced viability only with the two highest concentrations used. Interestingly, Ado at 100 μM increased cell growth after 48 h of treatment, but did not affect the cells after 72 h of treatment (Fig. 3A). Similarly, caffeine (1, 5 and 10 mM) decrease cell viability after 24 h and 48 h, while at 72h Caf only had effect at 5 and 10 mM (Fig 3B). However, treatment with caffeine 100 μM was able to increase cell growth after 24 h, but did not affect the cells after 48 h and 72 h.

We also evaluated the effect of a pre-treatment with selective antagonists of P1 receptors, A₁-AR (DPCPX), A_{2A}-AR (ZM 241385), A_{2B}-AR (MRS 1754), A₃-AR (MRS 1220), dipyridamole, and caffeine in 10 min before Ado (5 mM) treatment (Fig. 3). Our results demonstrated no difference in the viability when the cells were treated with the selective and non-selective antagonists of P1 receptors. However, after 24, 48 and 72 h of treatment with dipyridamole, the effect caused by Ado 5 mM on OE21 cells was prevented (Figure 3C).

Further, we analyzed the type of cell death caused by adenosine, caffeine, and adenosine plus the transporter inhibitor dipyridamole, through flow cytometry using PI and annexin V-FITC. Our results showed that when OE21 cells were treated with Ado 5 mM, 47.1% of cell population was annexin V-positive (Fig. 4B), indicating apoptosis. We also evaluated the cells pretreated with dipyridamole 10 μM plus Ado 5 mM, and 41.2% of the treated cells were positivity for annexin V (Fig. 4C). Moreover, only 7.4% of cells were stained with PI and annexin V-FITC after caffeine (5 mM) treatment.

Finally, we investigated the effect of caffeine 100 μ M on activation of p38 MAPK and Akt signaling pathways. Our data demonstrated that p38 was not activated by caffeine (Fig. 5A), and Akt was activated after 0, 15 and 30 minutes in OE-21 cell line (Fig. 5B).

4. Discussion

The understanding of purinergic signaling in esophageal squamous cells carcinoma is important to set up opportunities for treating this kind of cancer. In this study, we demonstrated that adenosine receptors P1 were expressed in OE-21 cells, a established lineage of esophageal squamous cells carcinoma and caffeine is capable of negatively modulate the expression of A_{2A} receptor in OE-21 cell.

The classical signaling mechanism of A_{2A} receptors relies on the stimulation of adenylyl cyclase by G_s or G_{oif}, resulting in the activation of protein kinase A (PKA) and phosphorylation of cyclic AMP. The activation of A_{2A} can also phosphorylate protein kinase C (PKC) in a cyclic AMP-dependent manner (Sheth, Brito et al. 2014). A_{2A} was found to be over-expressed in several cancer cell lines such as MCF-7 human breast cancer cells, Jurkat T-cell leukemia, A375 melanoma cells, U87MG human glioblastoma cells, HT29 and DLD-1 colon carcinoma cells, SH-SY5Y neuroblastoma cells, and non-small cell lung cancer cells (Sheth, Brito et al. 2014). Interestingly, in our study caffeine was able to decrease A_{2A} receptor expression, indicating a possible role of this compound in the growth of esophageal squamous cells carcinoma tested.

Further, we showed that Ado significantly reduced cell viability and proliferation. Our data are in agreement with previous reports showing that Ado can decrease cell proliferation on HeLa, A549, MCF7 cell lines (Li, Li et al. 2013). Similar data was found in human hepatoma 7404 cell viability in a dose and time dependent manner (Ma, Zhang et al. 2014). Moreover, in lymphatic endothelial cells (LEC) the cell viability was not affected by Ado for low concentrations (Lenoir, Wagner et al. 2014). In other study with human esophageal carcinoma TE-13 cells, it showed that cells proliferation was significantly inhibited in a dose and time dependent manner for adenosine (Wang, Ren et al. 2005). The same authors showed that Ado reduces proliferation of human gastric carcinoma cell line (HGC-27) and induces apoptosis (Wang and Ren 2006). Likewise, in esophageal carcinoma

EC109 cell line, cell proliferation was inhibited when cells were exposed to Ado for different times and concentrations (Wu, Wei et al. 2012). Maaser, Hopfner et al. (2002) showed no effects of Ado treatment on cellular proliferation of esophageal cell lines KYSE-140 in low concentrations, but at a high adenosine concentration (500 μ M), it was seen a growth inhibitory effect (Maaser, Hopfner et al. 2002).

The data available in literature demonstrate that Ado acts in the cells mainly through specific activation of P1 receptors or it can be uptaked by transmembrane transporter proteins (Wu, Li et al. 2006). Our data indicate that the cytotoxic effects of Ado observed in OE-21 cell line could be mediated by increasing the intracellular adenosine concentration, since this effect was inhibited by dipyridamole, an inhibitor of adenosine reuptake.

In this study, we found that the predominant cause of cell death induced by Ado was by apoptosis. In agreement with this, Maaser, Hopfner et al. (2002) demonstrated that the apoptosis in human esophageal squamous carcinoma cell line KYSE-140 is due by caspase-3 activation. Similarly, Ma, Zhang et al. (2014) found that extracellular Ado suppresses the cell growth by induction of apoptosis in BEL-7404 liver cancer cells. This effect of cell growth suppression induced by adenosine was also observed in human gastric cell line HGC-27 (Wang and Ren 2006), in SBC-3 human lung cancer cells (Kanno, Nakano et al. 2012), in OVCAR-3 human ovarian cancer cell line (Shirali, Aghaei et al. 2013) and in human hepatocellular carcinoma line HepG2 (Wu, Li et al. 2006).

The signaling pathways that mediate the inhibitory effects of caffeine on cancer cells remain obscure. In our study, caffeine 100 μ M did not activate the p38 MAPK pathway. There are few studies correlating the action of caffeine with the blockage or activation of p38 pathway. In a study using rat hepatic stellate cells HSC-T6, caffeine inhibited p38 pathway (Wang, Guan et al. 2014). Ravi, Muniyappa (2008) demonstrated inhibitory activity of p38 MAPK activation by caffeine in A2058 melanoma cells. Previous study has shown that when p38 is blocked, apoptosis is also blocked (Tudor, Marchese et al. 2009). This confirms the results presented here that the death caused by caffeine observed in esophageal cancer cells was not via apoptosis.

Indeed, in a study with human breast cancer cell line (MCF-7) related that caffeine was capable of activating two different forms of cell death, apoptosis and non-apoptosis, even though apoptosis was the predominant cause of death (Niknafs 2011).

According to previous data, when Akt signaling pathway is activated, it phosphorylates and inactivates BAD, a very important apoptosis suppressor protein (Song, Ouyang et al. 2005). Moreover, in SH-SY5Y cells, treatment with 10 mM of caffeine inhibits the Akt signalling pathway (Saiki, Sasazawa et al. 2011). On the other hand, caffeine has a cytoprotective effect by activation of the PI3K/Akt pathways in the same type of cells at 100 μ M concentration (Nakaso, Ito et al. 2008). In our study we also used 100 μ M of caffeine to evaluate Akt pathway, and we have found that caffeine activated this pathway. In contrast, other study using hepatocellular carcinoma (HCC), pancreatic cancer adenocarcinoma (PDAC) (Edling, Selvaggi et al. 2014), caffeine at higher concentrations inhibited cell proliferation by inhibiting Akt pathway.

In summary, the present study shows that Ado at high concentrations can inhibit OE-21 cell proliferation and reduce viability. Despite our data demonstrating that mRNA of P1 receptors genes are expressed in OE-21 cells, Ado mechanism of action does not seem to be via activation of P1 receptors. In addition, the expression of A_{2A} receptor was significantly diminished when the cells were treated with caffeine. On the other hand, cell viability was increased after caffeine (100 μ M) treatment, by the activation of Akt pathway. The results reported herein showed, the involvement of P1 adenosine receptors and caffeine in esophageal squamous cancer cells proliferation and this is a first step to understand the role of purinergic signaling in esophageal cancer.

Acknowledgements: We thank Dr Rosane Souza Silva for the donation of the antagonist ZM241385, Dr Cristina Bonorino for the use of the equipment flow cytometer BD FACSCANTO II, Dr Maria Martha Campos and Carla Denise Bonan for her help.

References:

Bauer A, Langen KJ, Bidmon H, Holschbach MH, Weber S, Olsson RA, et al. 18F-CPFPX PET identifies changes in cerebral A1 adenosine receptor density caused by glioma invasion. *J Nucl Med.* 2005; 46(3):450-4.

Edling CE, Selvaggi F, Ghonaim R, Maffucci T, Falasca M. Caffeine and the analog CGS 15943 inhibit cancer cell growth by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cancer Biol Ther.* 2014; 15(5):524-32.

Elmenhorst D, Garibotto V, Prescher A, Bauer A. Adenosine A(1) receptors in human brain and transfected CHO cells: Inhibition of [(3)H]CPFPX binding by adenosine and caffeine. *Neurosci Lett.* 2011; 487(3):415-20.

Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, et al. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res.* 2002; 90(5):531-8.

Gessi S, Merighi S, Fazzi D, Stefanelli A, Varani K, Borea PA. Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2011; 20(12):1591-609.

Gessi S, Varani K, Merighi S, Morelli A, Ferrari D, Leung E, et al. Pharmacological and biochemical characterization of A3 adenosine receptors in Jurkat T cells. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(1):116-26.

Grant MB, Davis MI, Caballero S, Feoktistov I, Biaggioni I, Belardinelli L. Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(9):2068-73.

INCA Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:< <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em:15/06/2014.

Jarvis MF. Characterization of P1 (adenosine) purinoceptors. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013; 8(62).

Kanno T, Nakano T, Fujita Y, Gotoh A, Nishizaki T. Adenosine induces apoptosis in SBC-3 human lung cancer cells through A(3) adenosine receptor-dependent AMID upregulation. *Cell Physiol Biochem.* 2012; 30(3):666-77.

Khoo HE, Ho CL, Chhatwal VJ, Chan ST, Ngoi SS, Moochhala SM. Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa. *Cancer Lett.* 1996; 106(1):17-21.

Lenoir B, Wagner DR, Blacher S, Sala-Newby GB, Newby AC, Noel A, et al. Effects of adenosine on lymphangiogenesis. *PLoS One.* 2014; 9(3).

Li S, Li X, Guo H, Liu S, Huang H, Liu N, et al. Intracellular ATP concentration contributes to the cytotoxic and cytoprotective effects of adenosine. *PLoS One*. 2013; 8(10).

Ma Y, Zhang J, Zhang Q, Chen P, Song J, Yu S, et al. Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 13(14):007.

Maaser K, Hopfner M, Kap H, Sutter AP, Barthel B, von Lampe B, et al. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *Br J Cancer*. 2002; 86(4):636-44.

Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN, et al. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2002; 119(4):923-33.

Merighi S, Varani K, Gessi S, Cattabriga E, Iannotta V, Ulouglu C, et al. Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line. *Br J Pharmacol*. 2001; 134(6):1215-26.

Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, et al. RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther*. 2005; 4(12):1355-60.

Miwa S, Sugimoto N, Yamamoto N, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, et al. Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF-kappaB and MAPK pathways. *Anticancer Res*. 2012; 32(9):3643-9.

Montesinos MC, Desai A, Chen JF, Yee H, Schwarzschild MA, Fink JS, et al. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. *Am J Pathol*. 2002; 160(6):2009-18.

Nakaso K, Ito S, Nakashima K. Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2008; 432(2):146-50.

Niknafs B. Induction of apoptosis and non-apoptosis in human breast cancer cell line (MCF-7) by cisplatin and caffeine. *Iran Biomed J*. 2011; 15(4):130-3.

Rho HW, Lee BC, Choi ES, Choi IJ, Lee YS, Goh SH. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC Cancer*. 2010; 10(240):1471-2407.

Ruschoff J. Adenocarcinoma of the GEJ: gastric or oesophageal cancer? *Recent Results Cancer Res*. 2012; 196:107-13.

Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, et al. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy*. 2011; 7(2):176-87.

Sawynok J. Caffeine and pain. *Pain*. 2011a; 152(4):726-9.

Schiedel AC, Lacher SK, Linnemann C, Knolle PA, Muller CE. Antiproliferative effects of selective adenosine receptor agonists and antagonists on human lymphocytes: evidence for receptor-independent mechanisms. *Purinergic Signal*. 2013; 9(3):351-65.

Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(2):2024-52.

Shirali S, Aghaei M, Shabani M, Fathi M, Sohrabi M, Moeinifard M. Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tumour Biol*. 2013; 34(2):1085-95.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005; 9(1):59-71.

Tudor C, Marchese FP, Hitti E, Aubareda A, Rawlinson L, Gaestel M, et al. The p38 MAPK pathway inhibits ristretaprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett*. 2009; 583(12):1933-8.

Wan WJ, Cui DM, Yang X, Hu JM, Li CX, Hu SL, et al. Expression of adenosine receptors in human retinal pigment epithelium cells in vitro. *Chin Med J*. 2011; 124(8):1139-44.

Wang H, Guan W, Yang W, Wang Q, Zhao H, Yang F, et al. Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway. *PLoS One*. 2014; 9(3).

Wang MX, Ren LM. Growth inhibitory effect and apoptosis induced by extracellular ATP and adenosine on human gastric carcinoma cells: involvement of intracellular uptake of adenosine. *Acta Pharmacol Sin*. 2006; 27(8):1085-92.

Wang MX, Ren LM, Shan BE. Inhibitory effects of extracellular adenosine triphosphate on growth of esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(38):5915-9.

Wu L, Herman JG, Brock MV, Wu K, Mao G, Yan W, et al. Silencing DACH1 Promotes Esophageal Cancer Growth by Inhibiting TGF-beta Signaling. *PLoS One*. 2014; 9(4).

Wu LF, Li GP, Feng JL, Pu ZJ. Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2006; 27(4):477-84.

Wu LF, Wei BL, Guo YT, Ye YQ, Li GP, Pu ZJ, et al. Apoptosis induced by adenosine involves endoplasmic reticulum stress in EC109 cells. *Int J Mol Med*. 2012; 30(4):797-804.

Xue L, Yang L, Jin ZA, Gao F, Kang JQ, Xu GH, et al. Increased expression of HSP27 inhibits invasion and metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2014; 20:20.

Yu X, Bao Z, Zou J, Dong J. Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer*. 2011; 11(96):1471-2407.

Zhang Y, Pan T, Zhong X, Cheng C. Nicotine upregulates microRNA-21 and promotes TGF-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer cells. *Tumour Biol*. 2014; 23:23.

Table 1: Human primer sequences

ADORA1 ^a	F 5'-CCT CCA TCT CAG CTT TCC AG-3' R 5'-AGT AGG TCT GTG GCC CAA TG-3'
ADORA2A ^a	F 5'-CCT TCA TCT ACG CCT ACC G-3' R 5'-TGG GAC TCT TGG GCA CTC-3'
ADORA2B ^a	F 5'-CTC CAT CTT CAG CCT TCT GG-3' R 5'-ACA AGG CAG CAG CTT TCA TT-3'
ADORA3 ^a	F 5'-GAC ACA GGG AAC CAG CTC AT-3' R 5'-TGC AGC TTC TGG TTT TGT TG-3'
18S ^b	F 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT -3' R 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3'
GAPDH ^b	F 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA -3' R 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3'

F: Forward; R: Reverse; ^a (Wan, Cui et al. 2011) ^b (Rho, Lee et al. 2010)

Figure Legends:

Figure 1. Relative gene expression profile of P1 receptors on esophageal cancer cell lines treated and no treated to caffeine 100 μ M. A) A₁ receptor B) A_{2A} receptor C) A_{2B} receptor D) A₃ receptor. Overall results from 4 independent experiments. Each column represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ for comparison versus control, as determined by Student's t test.

Figure 2. Effect of treatment with Ado (100 μ M, 1 mM and 5 mM) (A) and Caffeine (100 μ M, 1 mM and 5 mM) (B) on cell proliferation (count cell) of human esophageal carcinoma cell lines after 24 h treatment. The experiments were carried out at least three times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ for comparison versus control, as determined by ANOVA/Tukey test.

Figure 3. Effect of P1 receptors antagonists on the esophageal cancer cell viability by MTT assay. OE21 cells cultured for 24, 48 and 72 h in the presence of Adenosine (A), Caffeine (B) and specific antagonists A₁-AR (DPCPX), A_{2A}-AR (ZM241385), A_{2B}-AR (MRS 1754), A₃-AR (MRS 1220) and Dipyridamole (C). The experiments were carried out at least three times in triplicate. Each column represents the mean \pm SEM. *** $p < 0.001$ for comparison versus control, and # $p < 0.05$; ## $p < 0.001$ for comparison of Ado versus Dip + Ado as determined by ANOVA Two way/Bonferroni test.

Figure 4. Dot plot with percentage of Annexin V/PI positive OE21 cells — 24 h after treatment. Each sample has 50,000 cells. Data shown is representative of at least two independent experiments. A) Control. B) Ado 5 mM. C) Dipyridamole 10 μ M plus Ado 5 mM. D) Caffeine 5 mM. E) Dipyridamole 10 μ M.

Figure 5. Effects of Caffeine on p38 MAPK (A) and Akt (B) activation, following addition of cell culture medium supplemented with 5% FBS. Cells were treated with Caffeine (100 μ M) during 15 and 30 min. The gray line represents the negative control, and the solid black line indicates the positive control with 5% FBS plus DMSO 0.01%.

Figure 1.

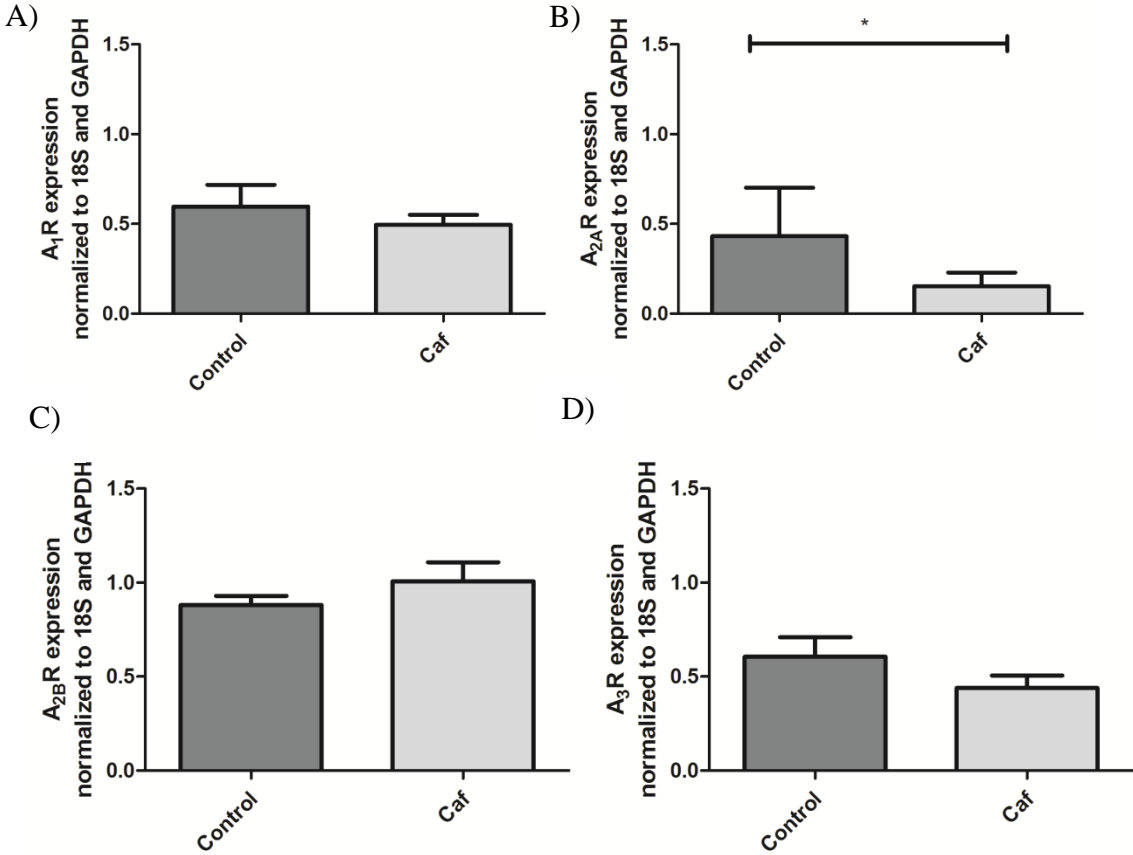


Figure 2.

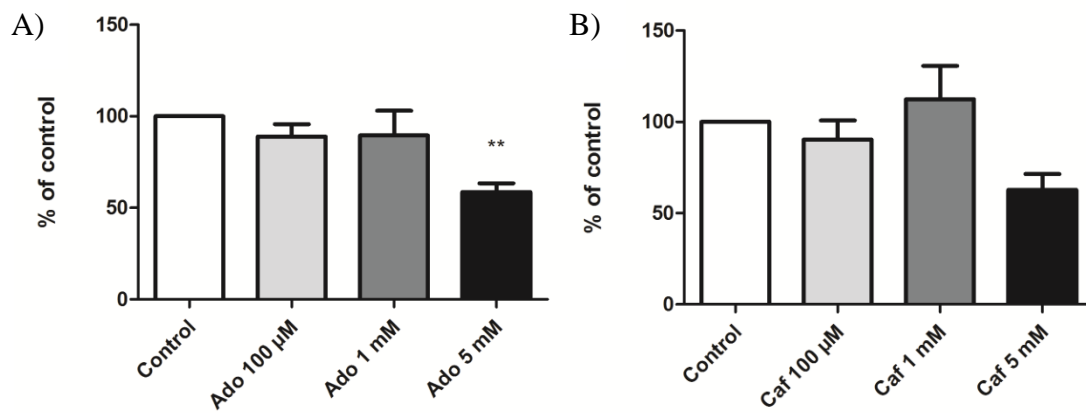


Figure 3.

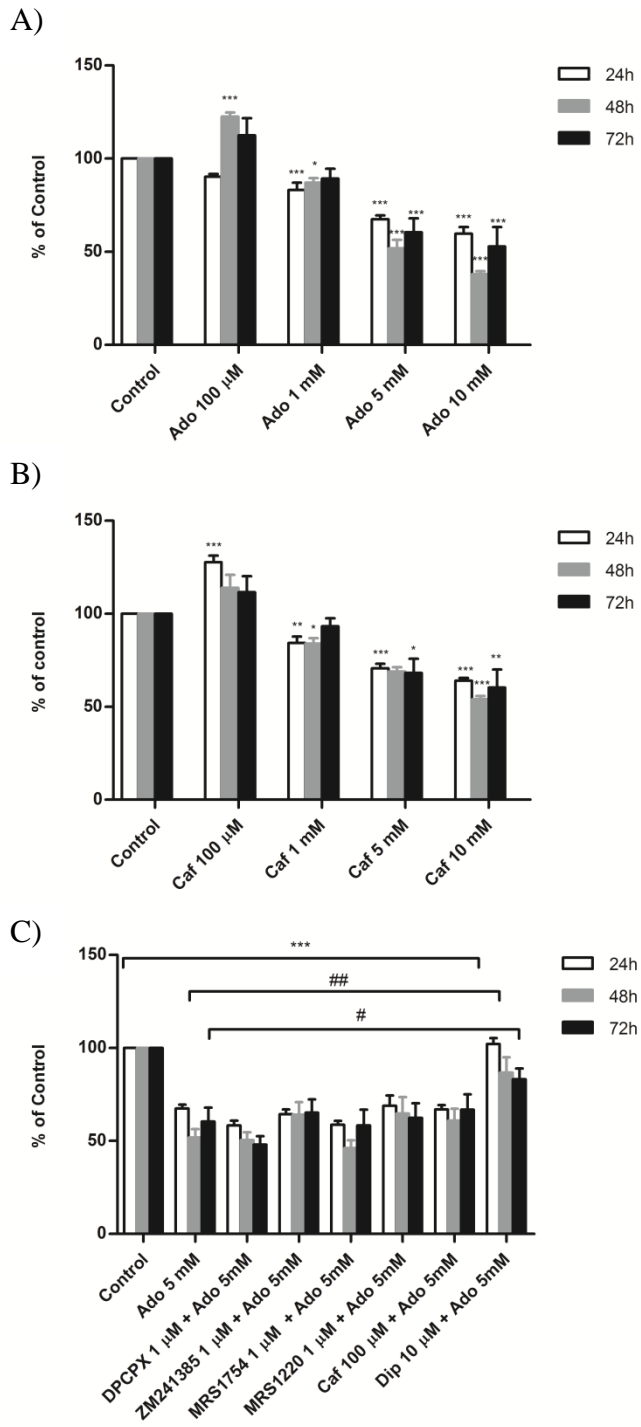


Figure 4.

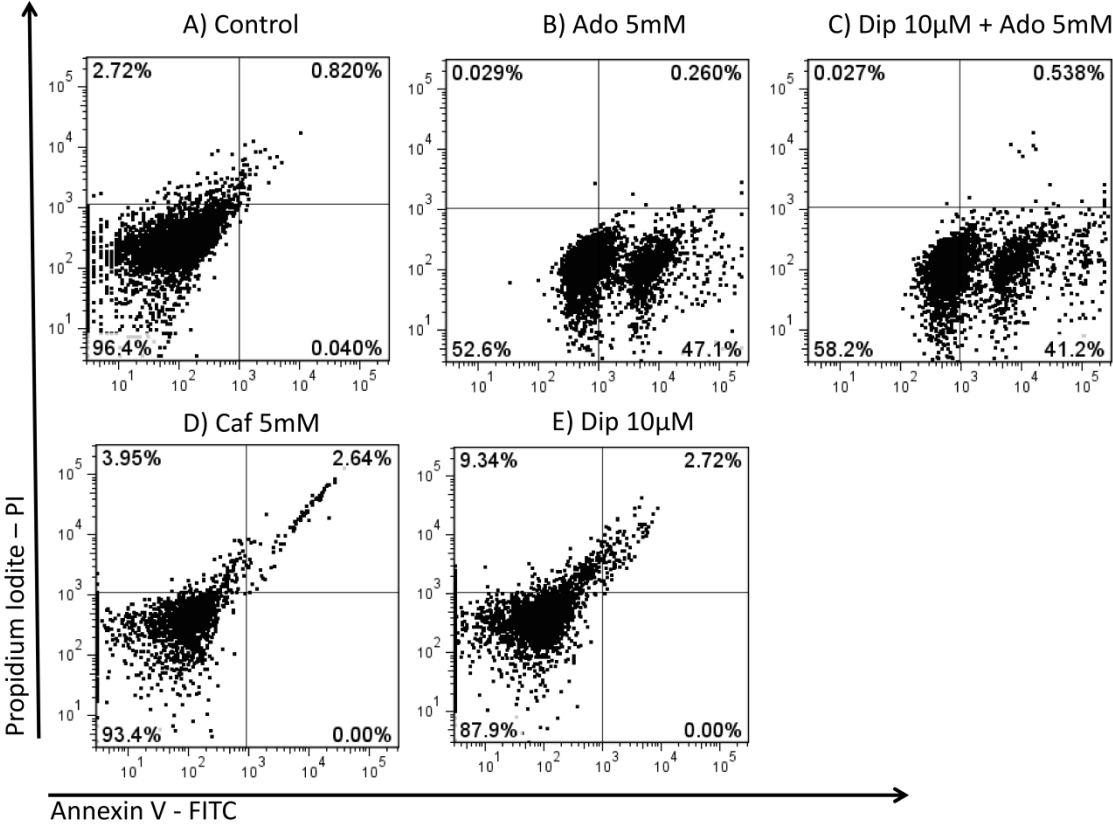
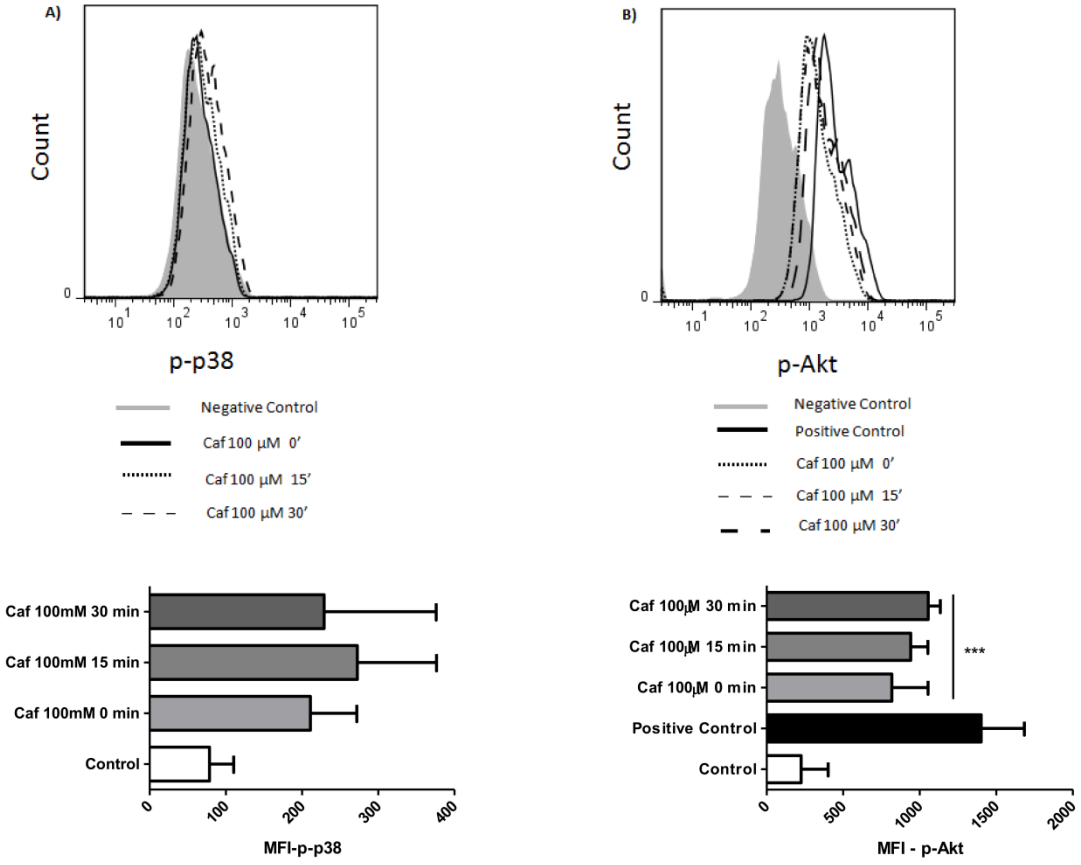


Figure 5.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de esôfago do tipo carcinoma de células escamosas acomete um grande número de pessoas em todo o mundo e é extremamente maligno (Zhang 2013). Além disso, é um câncer associado a níveis sócio-econômicos mais baixos e ainda não possui um tratamento específico. Portanto se torna imprescindível a avaliação de novas técnicas para se tentar criar uma terapia eficaz contra esse tipo de câncer (Baba, Watanabe et al.).

Poucos são os estudos relacionando o carcinoma de células escamosas de esôfago com o sistema purinérgico, mais especificamente com os receptores P1 de adenosina e com a cafeína. Já se sabe que a sinalização purinérgica está intimamente relacionada com o desenvolvimento de tumores, tais como melanomas, carcinoma epitelial, intestinal e gliomas (Morrone, Jacques-Silva et al. 2003); (White and Burnstock 2006); (Gehring, Pereira et al. 2012). Sendo assim, na primeira parte desse estudo buscamos avaliar em células OE21, se estes receptores se encontravam expressos. De fato, através da metodologia de PCR em tempo real pudemos comprovar a expressão desses receptores e interessantemente, quando tratamos essas células com a cafeína, o nível de expressão dos receptores A_{2A} foi significativamente diminuído.

Não é de hoje que a relação entre a cafeína e o câncer tem apresentado grande interesse. Este interesse está centrado principalmente na capacidade da cafeína produzir efeitos biológicos compatíveis com atividades anticâncer. (Nkondjock 2009). Além disso, existem estudos que sugerem que a cafeína melhora as respostas antitumorais através da inibição da angiogênese, mediada por adenosina (Ohta, Gorelik et al. 2006). E de fato, a cafeína é um antagonista de receptores P1 e a semelhança estrutural entre a cafeína e a adenosina pode permitir que ela se associe com os receptores de adenosina (Tavares and Sakata 2012).

A próxima etapa foi avaliar através dos ensaios de contagem celular e MTT se os tratamentos com a cafeína e com adenosina teriam algum efeito significativo sobre viabilidade e proliferação nas células de carcinoma de esôfago. De fato, o

tratamento com a adenosina diminuiu significativamente a proliferação na concentração de 5 mM. Com relação à proliferação celular, a adenosina foi capaz de impedir a viabilidade celular da linhagem OE21 quando tratada com altas concentrações (1, 5 e 10 mM) após 24, 48 e 72h. Além disso, esses efeitos não foram modificados quando foram aplicados tratamentos com os antagonistas seletivos para os receptores P1 e pela cafeína.

Entretanto, quando realizamos o tratamento com Dipiridamol, um inibidor da recaptação de adenosina, um efeito de prevenção foi observado. A cafeína demonstrou um comportamento semelhante com relação à proliferação celular e não afetou a viabilidade celular. Interessantemente, em um tratamento com baixa concentração de cafeína (100 μ M) observou-se um aumento de proliferação celular. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, em células de carcinoma esofágico humano TE-13 (Wang, Ren et al. 2005), EC109 (Wu, Wei et al. 2012), KYSE-140 (Maaser, Hopfner et al. 2002) e em uma linhagem celular de carcinoma gástrico humano (HGC-27) (Wang and Ren 2006).

Em seguida, através de citometria de fluxo, pudemos demonstrar que o tratamento com dipiridamol leva à morte por apoptose, relacionando assim os resultados encontrados no ensaio de MTT em que se observou uma diminuição da viabilidade quando as células foram tratadas com este composto. Já a cafeína, apesar de demonstrar diminuição de viabilidade e proliferação celular em altas concentrações, mostrou apenas 7% de células foram positivas para os marcadores para necrose e apoptose através da citometria de fluxo, o que nos leva a pensar que o efeito observado no ensaio de MTT e no ensaio de contagem celular pode estar relacionado a algum outro tipo de morte. De modo semelhante, em estudo com a linhagem de células de câncer de mama humano (MCF-7), foi relatado que a cafeína foi capaz de ativar diferentes tipos de morte celular tanto apoptóticas como não apoptóticas (Niknafs 2011).

Como o tratamento com cafeína em baixa concentração foi o único a demonstrar atividade proliferativa aumentada, investigamos se as vias de sinalização das MAPK e AKT poderiam estar envolvidas neste processo. De fato,

quando as células OE-21 foram tratadas com 100 μ M de cafeína, a AKT demonstrou-se ativada, ao passo que a via p38 não mostrou ativação. Isso confirma que o processo que está ocorrendo nessas células tratadas com a cafeína não é apoptótico, uma vez que quando a via da AKT está ativa, geralmente ocorre uma inibição de apoptose e quando a via p38 MAPK está bloqueada a apoptose também é bloqueada (Tudor, Marchese et al. 2009).

Há poucos estudos correlacionando a ação da cafeína com bloqueio ou ativação da via p38, porém, em um estudo com células estreladas hepáticas de ratos (HSC-T6), a cafeína inibiu esta via (Wang, Guan et al. 2014), e (Ravi, Muniyappa et al. 2008) também demonstraram atividade inibidora de p38.

Com relação à via AKT, em células SH-SY5Y o tratamento com cafeína foi capaz de inibir a via de sinalização de AKT (Saiki, Sasazawa et al. 2011). No entanto, a cafeína tem um efeito citoprotetor por ativação das vias de PI3K/Akt no mesmo tipo celular (Nakaso, Ito et al. 2008). Outros estudos em células de carcinoma hepatocelular (HCC), adenocarcinoma pancreático (PDAC) (Edling, Selvaggi et al. 2014) e osteossarcoma (Miwa, Sugimoto et al. 2012) demonstram que a cafeína inibiu a proliferação celular através da inibição da Akt.

Com base nesses dados, podemos dizer que a adenosina atua nas células de carcinoma de células escamosas de esôfago através de apoptose e sua atividade não é diretamente mediada pelos receptores P1 de adenosina. A cafeína atua aumentando a viabilidade celular em baixas concentrações, diminui a viabilidade celular em altas concentrações e não altera a proliferação celular. Além disso, pudemos observar que o efeito de bloqueio de proliferação celular não se dá através de apoptose.

Esta dissertação mostra, pela primeira vez, a interação entre adenosina, cafeína e os receptores P1 na linhagem celular OE-21. O entendimento destes mecanismos trará uma melhor compreensão da biologia do carcinoma de células escamosas de esôfago e poderá apresentar novas idéias para o desenvolvimento de terapias mais específicas para o tratamento desse tipo de câncer.

REFERÊNCIAS

- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, et al. (2009). "Purinergic signalling in the nervous system: an overview." Trends Neurosci **32**(1): 19-29.
- Ajani, J. A., J. S. Barthel, et al. (2011). "Esophageal and esophagogastric junction cancers." J Natl Compr Canc Netw **9**(8): 830-887.
- Baba, Y., M. Watanabe, et al. Neoadjuvant treatment for esophageal squamous cell carcinoma, World J Gastrointest Oncol. 2014 May 15;6(5):121-128.
- Bauer, A., K. J. Langen, et al. (2005). "18F-CPFPX PET identifies changes in cerebral A1 adenosine receptor density caused by glioma invasion." J Nucl Med **46**(3): 450-454.
- Bravi, F., C. Bosetti, et al. (2007). "Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis." Hepatology **46**(2): 430-435.
- Burnstock, G. (2004). "Introduction: P2 receptors." Curr Top Med Chem **4**(8): 793-803.
- Burnstock, G. (2006 a). "Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling." Pharmacol Rev **58**(1): 58-86.
- Burnstock, G. (2006 b). "Purinergic signalling--an overview." Novartis Found Symp **276**: 26-48.
- Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission." Physiol Rev **87**(2): 659-797.
- Carrillo, J. A. and J. Benitez (2000). "Clinically significant pharmacokinetic interactions between dietary caffeine and medications." Clin Pharmacokinet **39**(2): 127-153.
- Chen, J. F., H. K. Eltzschig, et al. (2013). "Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?" Nat Rev Drug Discov **12**(4): 265-286.
- Ciruella, F., C. Albergaria, et al. (2010). "Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling." Biochim Biophys Acta **1**: 9-20.
- Daly, J. W. (2007). "Caffeine analogs: biomedical impact." Cell Mol Life Sci **64**(16): 2153-2169.
- Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**(22): 2905-2927.
- Edling, C. E., F. Selvaggi, et al. (2014). "Caffeine and the analog CGS 15943 inhibit cancer cell growth by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway." Cancer Biol Ther **15**(5): 524-532.
- Elmenhorst, D., V. Garibotto, et al. (2011). "Adenosine A(1) receptors in human brain and transfected CHO cells: Inhibition of [(3)H]CPFPX binding by adenosine and caffeine." Neurosci Lett **487**(3): 415-420.
- Elmenhorst, D., P. T. Meyer, et al. (2012). "Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET." J Nucl Med **53**(11): 1723-1729.
- Eltzschig, H. K., M. V. Sitkovsky, et al. (2012). "Purinergic signaling during inflammation." N Engl J Med **367**(24): 2322-2333.
- Enestvedt, B. K. and G. G. Ginsberg (2013). "Advances in endoluminal therapy for esophageal cancer." Gastrointest Endosc Clin N Am **23**(1): 17-39.
- Enzinger, P. C. and R. J. Mayer (2003). "Esophageal cancer." N Engl J Med **349**(23): 2241-2252.

- Feoktistov, I., A. E. Goldstein, et al. (2002). "Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation." Circ Res **90**(5): 531-538.
- Fields, R. D. and G. Burnstock (2006). "Purinergic signalling in neuron-glia interactions." Nat Rev Neurosci **7**(6): 423-436.
- Fredholm, B. B., E. Irenius, et al. (2001). "Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells." Biochem Pharmacol **61**(4): 443-448.
- Gallus, S., M. Bertuzzi, et al. (2002). "Does coffee protect against hepatocellular carcinoma?" Br J Cancer **87**(9): 956-959.
- Gehring, M. P., T. C. Pereira, et al. (2012). "P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line." Purinergic Signal **8**(4): 729-739.
- Gessi, S., S. Merighi, et al. (2011). "Adenosine receptor targeting in health and disease." Expert Opin Investig Drugs **20**(12): 1591-1609.
- Gessi, S., K. Varani, et al. (2001). "Pharmacological and biochemical characterization of A3 adenosine receptors in Jurkat T cells." Br J Pharmacol **134**(1): 116-126.
- Grant, M. B., M. I. Davis, et al. (2001). "Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(9): 2068-2073.
- Haidry, R. J., J. M. Dunn, et al. (2013). "Radiofrequency ablation and endoscopic mucosal resection for dysplastic barrett's esophagus and early esophageal adenocarcinoma: outcomes of the UK National Halo RFA Registry." Gastroenterology **145**(1): 87-95.
- Hongo, M., Y. Nagasaki, et al. (2009). "Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity." J Gastroenterol Hepatol **24**(5): 729-735.
- INCA Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em: 15/06/2014.
- Jarvis, M. F. (2013). "Characterization of P1 (adenosine) purinoceptors." Curr Protoc Pharmacol **8**(62).
- Je, Y., W. Liu, et al. (2009). "Coffee consumption and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies." Int J Cancer **124**(7): 1662-1668.
- Kanno, T., T. Nakano, et al. (2012). "Adenosine induces apoptosis in SBC-3 human lung cancer cells through A(3) adenosine receptor-dependent AMID upregulation." Cell Physiol Biochem **30**(3): 666-677.
- Khoo, H. E., C. L. Ho, et al. (1996). "Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa." Cancer Lett **106**(1): 17-21.
- Koul, H. K., M. Pal, et al. (2013). "Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors." Genes Cancer **4**(9-10): 342-359.
- Larsson, S. C. and A. Wolk (2007). "Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis." Gastroenterology **132**(5): 1740-1745.
- Latini, S. and F. Pedata (2001). "Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations." J Neurochem **79**(3): 463-484.

- Lenoir, B., D. R. Wagner, et al. (2014). "Effects of adenosine on lymphangiogenesis." PLoS One **9**(3).
- Li, S., X. Li, et al. (2013). "Intracellular ATP concentration contributes to the cytotoxic and cytoprotective effects of adenosine." PLoS One **8**(10).
- Ma, Y., J. Zhang, et al. (2014). "Adenosine induces apoptosis in human liver cancer cells through ROS production and mitochondrial dysfunction." Biochem Biophys Res Commun **13**(14): 007.
- Maaser, K., M. Hopfner, et al. (2002). "Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors." Br J Cancer **86**(4): 636-644.
- Merighi, S., P. Mirandola, et al. (2002). "Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells." J Invest Dermatol **119**(4): 923-933.
- Merighi, S., K. Varani, et al. (2001). "Pharmacological and biochemical characterization of adenosine receptors in the human malignant melanoma A375 cell line." Br J Pharmacol **134**(6): 1215-1226.
- Mirza, A., A. Basso, et al. (2005). "RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis." Cancer Biol Ther **4**(12): 1355-1360.
- Miwa, S., N. Sugimoto, et al. (2012). "Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF-kappaB and MAPK pathways." Anticancer Res **32**(9): 3643-3649.
- Montesinos, M. C., A. Desai, et al. (2002). "Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors." Am J Pathol **160**(6): 2009-2018.
- Morrone, F. B., M. C. Jacques-Silva, et al. (2003). "Extracellular nucleotides and nucleosides induce proliferation and increase nucleoside transport in human glioma cell lines." J Neurooncol **64**(3): 211-218.
- Nakaso, K., S. Ito, et al. (2008). "Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells." Neurosci Lett **432**(2): 146-150.
- Niknafs, B. (2011). "Induction of apoptosis and non-apoptosis in human breast cancer cell line (MCF-7) by cisplatin and caffeine." Iran Biomed J **15**(4): 130-133.
- Nkondjock, A. (2009). "Coffee consumption and the risk of cancer: an overview." Cancer Lett **277**(2): 121-125.
- Ohta, A., E. Gorelik, et al. (2006). "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(35): 13132-13137.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Raman, M., W. Chen, et al. (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene **26**(22): 3100-3112.
- Ravi, D., H. Muniyappa, et al. (2008). "Caffeine inhibits UV-mediated NF-kappaB activation in A2058 melanoma cells: an ATM-PKCdelta-p38 MAPK-dependent mechanism." Mol Cell Biochem **308**(1-2): 193-200.

- Rho, H. W., B. C. Lee, et al. (2010). "Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR." BMC Cancer **10**(240): 1471-2407.
- Ruschoff, J. (2012). "Adenocarcinoma of the GEJ: gastric or oesophageal cancer?" Recent Results Cancer Res **196**: 107-113.
- Saiki, S., Y. Sasazawa, et al. (2011). "Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition." Autophagy **7**(2): 176-187.
- Sawynok, J. (2011a). "Caffeine and pain." Pain **152**(4): 726-729.
- Sawynok, J. (2011b). "Methylxanthines and pain." Handb Exp Pharmacol **200**: 311-329.
- Schiedel, A. C., S. K. Lacher, et al. (2013). "Antiproliferative effects of selective adenosine receptor agonists and antagonists on human lymphocytes: evidence for receptor-independent mechanisms." Purinergic Signal **9**(3): 351-365.
- Sheth, S., R. Brito, et al. (2014). "Adenosine receptors: expression, function and regulation." Int J Mol Sci **15**(2): 2024-2052.
- Shirali, S., M. Aghaei, et al. (2013). "Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3." Tumour Biol **34**(2): 1085-1095.
- Song, G., G. Ouyang, et al. (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med **9**(1): 59-71.
- Stagg, J. and M. J. Smyth (2010). "Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer." Oncogene **29**(39): 5346-5358.
- Tang, N., B. Zhou, et al. (2009). "Coffee consumption and risk of breast cancer: a metaanalysis." Am J Obstet Gynecol **200**(3): 27.
- Tavares, C. and R. K. Sakata (2012). "Caffeine in the treatment of pain." Rev Bras Anesthesiol **62**(3): 387-401.
- Tudor, C., F. P. Marchese, et al. (2009). "The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages." FEBS Lett **583**(12): 1933-1938.
- Verkhatsky, A. and G. Burnstock (2014). "Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance." Bioessays **30**(10): 201400024.
- Verschuur, E. M. and P. D. Siersema (2010). "[Diagnostics and treatment of esophageal cancers]." Ned Tijdschr Tandheelkd **117**(9): 427-431.
- Wan, W. J., D. M. Cui, et al. (2011). "Expression of adenosine receptors in human retinal pigment epithelium cells in vitro." Chin Med J **124**(8): 1139-1144.
- Wang, H., W. Guan, et al. (2014). "Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway." PLoS One **9**(3).
- Wang, M. X. and L. M. Ren (2006). "Growth inhibitory effect and apoptosis induced by extracellular ATP and adenosine on human gastric carcinoma cells: involvement of intracellular uptake of adenosine." Acta Pharmacol Sin **27**(8): 1085-1092.
- Wang, M. X., L. M. Ren, et al. (2005). "Inhibitory effects of extracellular adenosine triphosphate on growth of esophageal carcinoma cells." World J Gastroenterol **11**(38): 5915-5919.

- White, N. and G. Burnstock (2006). "P2 receptors and cancer." Trends Pharmacol Sci **27**(4): 211-217.
- Wu, L., J. G. Herman, et al. (2014). "Silencing DACH1 Promotes Esophageal Cancer Growth by Inhibiting TGF-beta Signaling." PLoS One **9**(4).
- Wu, L. F., G. P. Li, et al. (2006). "Molecular mechanisms of adenosine-induced apoptosis in human HepG2 cells." Acta Pharmacol Sin **27**(4): 477-484.
- Wu, L. F., B. L. Wei, et al. (2012). "Apoptosis induced by adenosine involves endoplasmic reticulum stress in EC109 cells." Int J Mol Med **30**(4): 797-804.
- Xue, L., L. Yang, et al. (2014). "Increased expression of HSP27 inhibits invasion and metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma." Tumour Biol **20**: 20.
- Yu, X., Z. Bao, et al. (2011). "Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies." BMC Cancer **11**(96): 1471-2407.
- Zhang, X. M. and M. Z. Guo (2010). "The value of epigenetic markers in esophageal cancer." Front Med China **4**(4): 378-384.
- Zhang, Y. (2013). "Epidemiology of esophageal cancer." World J Gastroenterol **19**(34): 5598-5606.
- Zhang, Y., T. Pan, et al. (2014). "Nicotine upregulates microRNA-21 and promotes TGF-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition of esophageal cancer cells." Tumour Biol **23**: 23.
- Zimmermann, H. (2006). "Ectonucleotidases in the nervous system." Novartis Found Symp **276**: 113-128.