



Título: Análise do papel do receptor ADORA-A2 na via de transdução de sinal da cafeína em cultura de células musculares.

Autor: Caio F. Romeiro; **Orientadores:** Caroline D. Capitani; Fernando M. Simabuco; **Colaboradores:** Isadora C. B. Pavan; Luiz G. S. da Silva; Ana P. Morelli; Vitor X. Crivelin.

Introdução:

A adenosina é uma purina presente em todos os tecidos corporais^{1,2}, originada dos nucleotídeos de adenina e da degradação de ATP. Com a mesma facilidade que ela é gerada, ela é também metabolizada, tornando seus níveis muito flutuantes^{1,3,4}. Sua ação é mediada através de quatro receptores de membrana, os receptores de adenosina (ARs): A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃^{1,2,5}. Todos os ARs são acoplados à proteína G (GPCR)², A₁ e A₃ se ligam à proteína G inibitória (G_i) e os receptores A₂ se ligam à G estimulatória (G_s)²⁻⁴. Isso quer dizer que eles recrutam diferentes vias mediante a ligação com a adenosina¹⁻⁶.

A cafeína é uma substância de origem natural encontrada em fontes vegetais, mas que pode ser encontrada em outros produtos⁷. Com o seu consumo, o único mecanismo que é significativamente afetado é a ligação da molécula aos ARs, em razão da similaridade estrutural com a adenosina, causando o antagonismo às ações dela⁶⁻⁸, o que gera uma diversidade de possíveis aplicações.

A DA é uma das mais comuns doenças neurodegenerativas, responsável por um grande fardo^{9,10}. Nela, o córtex cerebral dos pacientes sofre mudanças no metabolismo de purinas, com a adenosina sendo a mais vulnerável, passando pela queda de seus níveis, assim como pelo aumento da densidade dos A_{2A}¹¹. Além disso, os A_{2A} estão presentes na micróglia, tendo importância na ativação de processos inflamatórios^{9,10,12}.

Posto isso, ao aliarmos a maior densidade dos A_{2A} ao ambiente patologicamente inflamado, propício à formação de adenosina, a inibição dos receptores torna-se um alvo em potencial, podendo conferir efeitos benéficos^{4,10,12,13}. Efeitos estes muito demonstrados na literatura, tanto em modelo animal¹⁴⁻¹⁹, quanto em modelo celular^{14-16,20}, além de suas propriedades antioxidantes^{8,12,13} e a evidência de proteção nos estudos epidemiológicos²¹⁻²⁷.

Materiais e métodos:

O projeto foi inteiramente realizado em cultura de células, com duas linhagens distintas, ambas derivadas de camundongos. Sendo assim, foram utilizadas as células C2C12, de tecido muscular estriado esquelético, e as células Neuro-2a (ou N2a), de tecido neuronal. O protocolo utilizado para mensurar os efeitos foi o *Western Blotting*. Os resultados das revelações foram analisados por meio do ImageJ (NCBI) e passados ao GraphPad Prism, onde foram realizadas as análises estatísticas (One-way ANOVA, com correção de Bonferroni, com nível de significância α de 0,05) e gerados os gráficos.

Resultados e Discussão:

O primeiro experimento foi realizado em células C2C12, com duas doses de adenosina, uma de 10 μ M e outra de 100nM (0,1 μ M), para observar os efeitos dentro das faixas patológica e fisiológica^{1,3,4,28,29}. Para avaliar o antagonismo, foram feitos tratamentos conjuntos: a cafeína era adicionada a fim de ficar 3h, com a adenosina sendo adicionada nos últimos 30 minutos (2h30 do tempo total), portanto. O tratamento com adenosina a 100nM aumentou a fosforilação de ERK, mas sem diferença estatística (* $p < 0,05$) e, com o aumento da dose (10 μ M), a fosforilação diminuiu, quase igualando ao controle, sem a diferença estatística também (* $p < 0,05$). A cafeína não apresentou nenhum efeito visível nos tratamentos (**FIG. 1**).

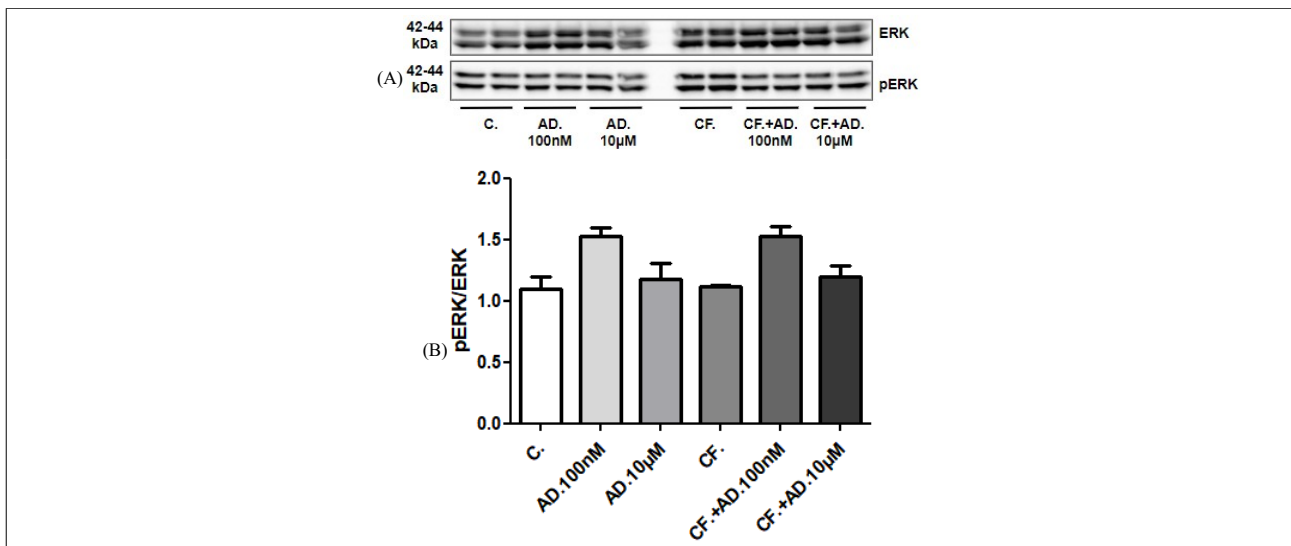


FIG. 1. Fosforilação de ERK em C2C12, mediante tratamento conjunto de cafeína e adenosina. O experimento foi realizado em células C2C12, em duplicata, utilizando duas doses diferentes de adenosina, 100nM (0,1µM) e 10µM, por 30 minutos, e uma de cafeína, 70µM, por 3h, tanto em forma de controle, quanto em tratamentos conjuntos. Além dos controles individuais de cada substância, foi feito um controle diferenciado sem nenhum tratamento, aplicando apenas MD_{C2C12}, também em duplicata (A), com o endógeno de escolha sendo a vinculina. Os tratamentos conjuntos, feitos para avaliar o potencial da cafeína, foram feitos da seguinte maneira: a cafeína foi adicionada às células a 70µM diluída ao MD_{C2C12}, e devolvida à estufa por 2 horas e 30 minutos. Passado o tempo, as placas foram retiradas, o meio aspirado e adicionado cafeína a 70µM e adenosina a 100nM ou 10µM. As placas foram então devolvidas à estufa. Passados 30 minutos, e totalizadas 3 horas, o tratamento foi encerrado. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística (* $p < 0,05$) (B). Aparentemente, o tratamento de 100nM de adenosina foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK, o que não aconteceu na dose de 10µM e nem com a cafeína, seja sozinha ou no tratamento conjunto, tudo isso em comparação ao C.

No segundo experimento, os mesmos parâmetros foram seguidos, mas dessa vez nas N2a. A proteína ERK, no contexto fisiológico, é relacionada a processos pró-vida³⁰, e patologicamente tem ligação com a DA^{31,32}. A via das MAPK, da qual a ERK faz parte³¹, tem a capacidade de ser ativa pela adenosina ao se ligar com os ARs³³. Neste experimento, ela apresentou a tendência de diminuir sua fosforilação quando tratada isoladamente com adenosina, de maneira dose-dependente, comparado ao controle, mas sem diferença estatística (* $p < 0,05$). Tal fato condiz com a situação, uma vez que os níveis patológicos de adenosina se relacionam à diminuição do metabolismo celular^{34,35}, fazendo sentido que uma proteína relacionada à proliferação celular seja suprimida. A cafeína, por outro lado, quando sozinha, quase que dobrou os níveis de fosforilação de ERK em relação aos controles, tanto C., quanto aos controles de adenosina, com diferença estatística (** $p < 0,01$). Uma evidência de aumento de fosforilação de ERK mediante tratamento com cafeína em N2a/APP foi encontrado em Zhou et al., 2014, com doses de 5µM e 10µM, porém os tratamentos eram realizados em combinação com melatonina, podendo ter conferido efeitos adicionais. Nos tratamentos conjuntos, a cafeína reverteu os efeitos causados pela adenosina, aumentando a fosforilação (FIG. 2).

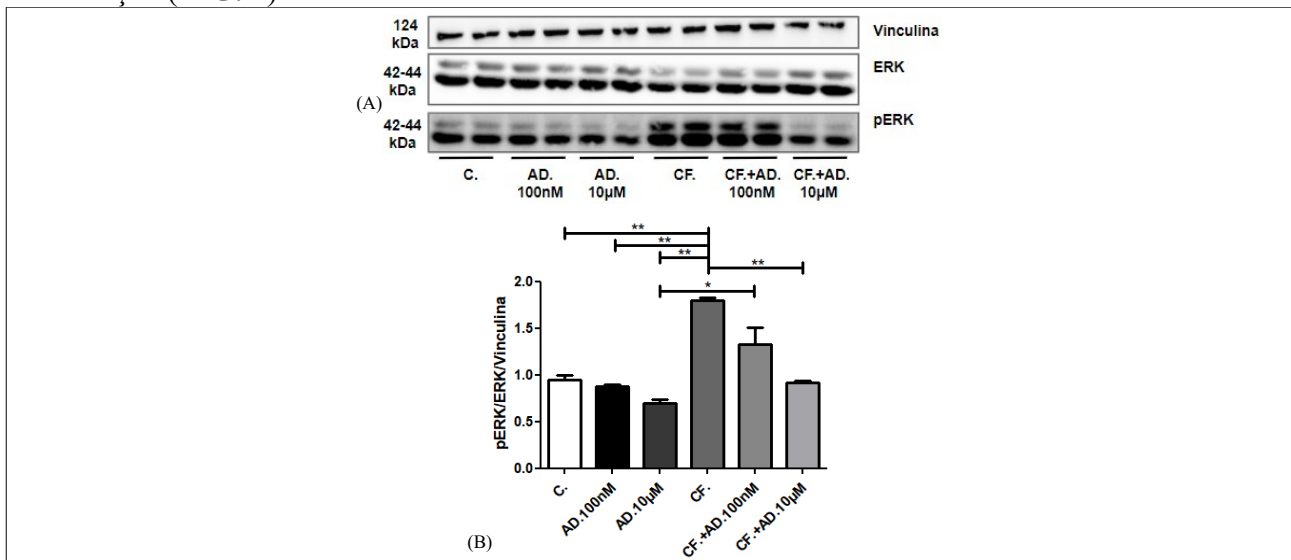


FIG. 2. Fosforilação de ERK em N2a, mediante tratamento conjunto de cafeína e adenosina. O experimento foi realizado em células N2a, seguindo os mesmos passos do experimento anterior (FIG. 1). Também são mostrados os *immunoblots* (A), tendo a vinculina como endógeno. O controle de cafeína 70µM apresentou diferença estatística (** $p < 0,01$) em relação a todos os tratamentos, excetuando-se o tratamento conjunto de cafeína 70µM e adenosina 100nM (CF.+AD.100nM); também foi observada diferença estatística (* $p < 0,05$) entre o controle de adenosina 10µM e CF.+AD.100nM (B).

No último experimento, feito novamente em N2a, foi reproduzido um modelo de dieta hiperlipídica, caracterizada por causar inflamação, uma das bases da DA^{8,9,37,38}. O protocolo foi realizado conforme o descrito por Nakandakari et al., 2019. Sendo assim, foi feito um tratamento de uma semana com palmitato a 25 μ M, além da cafeína, tentando observar seus efeitos protetores, na forma de co-tratamento. A cafeína diminuiu a fosforilação de ERK em relação ao controle, sem diferença estatística (* $p < 0,05$) (**FIG. 3**). Essa diminuição pode ser importante na DA, uma vez que a via das MAPK é ativa em neurônios vulneráveis dos portadores da doença, fosforilando algumas proteínas chave, como a TAU^{31,32}.

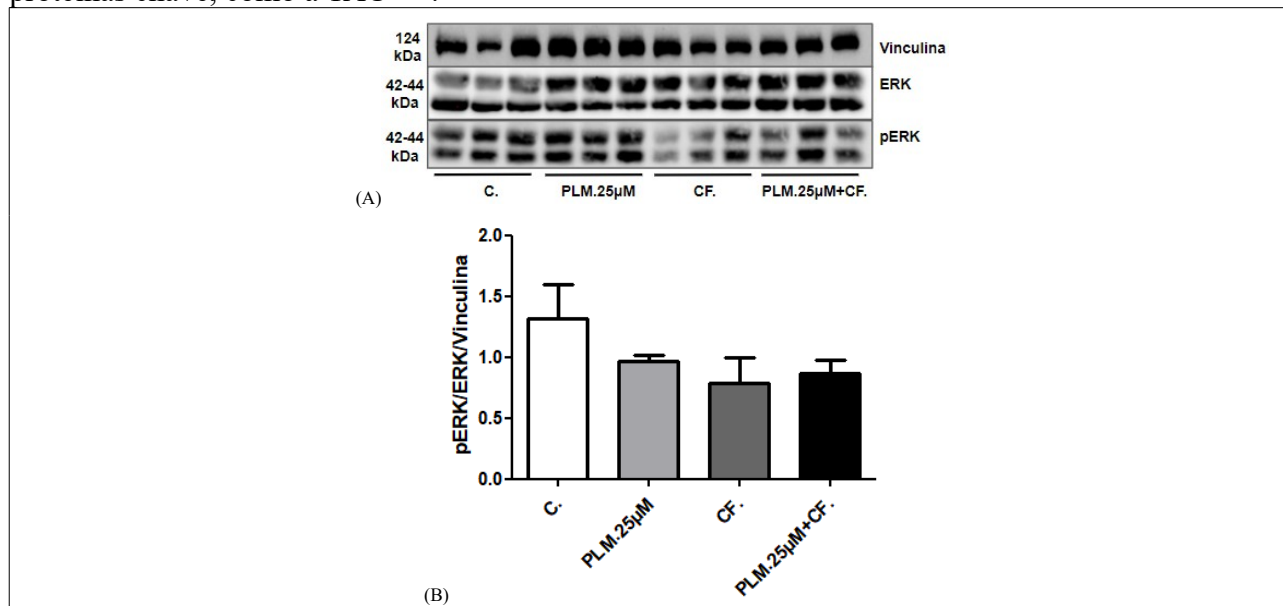


FIG. 3. Tratamento crônico de palmitato e cafeína em N2a - Fosforilação de ERK. O experimento foi realizado em células N2a, em triplicata, utilizando uma dose de 25 μ M de palmitato (A fim de simular uma dieta rica em gorduras saturadas, responsável por causar inflamação, uma das principais marcas da DA) e uma dose de cafeína de 70 μ M, como nos experimentos anteriores. Sendo assim, foram feitos os controles das duas substâncias e mais um diferenciado, recebendo apenas o MD_{N2a} (A), onde o endógeno de escolha para a normalização foi a vinculina. Desta vez, em relação ao tempo, os tratamentos foram feitos cronicamente, sendo as substâncias adicionadas a cada dois dias, por uma semana. Não foram observadas diferenças estatísticas (B). Aparentemente, o tratamento crônico com as duas substâncias foram capazes de diminuir a fosforilação de ERK em comparação ao C., o que, neste contexto, é um sinal benéfico, pelo fato de a proteína estar ligada à marcas da DA, como é o caso da hiperfosforilação de TAU.

Foi observada também a quantidade da proteína TAU fosforilada, um dos marcadores da DA^{9,37,40}. O palmitato aumentou levemente a fosforilação em relação ao controle e, quando junto da cafeína, tal efeito foi atenuado, quase nivelando ao controle. A cafeína sozinha obteve uma fosforilação muito parelha com o controle (**FIG. 4**), porém, não houveram diferenças estatísticas (* $p < 0,05$). A diminuição da fosforilação de TAU também foi observada em Zhou et al., 2014.

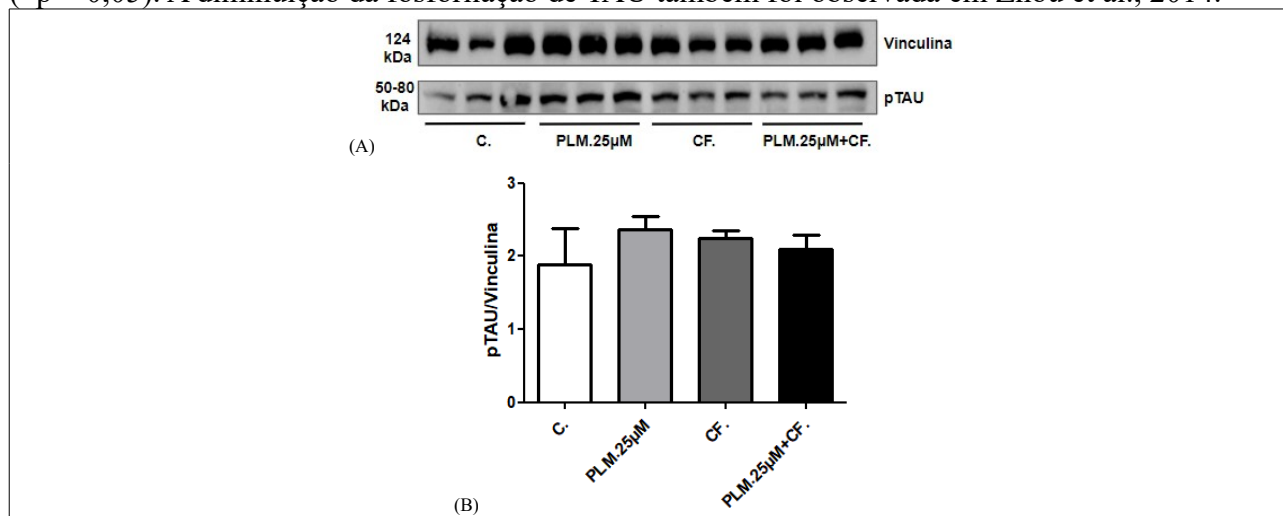


FIG. 4. Tratamento crônico de palmitato e cafeína em N2a - Fosforilação de TAU. Maiores explicações sobre este tratamento estão na legenda da **FIG. 3**. São mostrados os *immunoblots* (A). O tratamento crônico não foi capaz de produzir nenhuma diferença estatística (* $p < 0,05$) entre as amostras, podendo ser observadas apenas algumas leves tendências de aumento ou diminuição (B). Aparentemente, o tratamento crônico de palmitato tem a tendência de aumentar levemente a fosforilação de TAU em relação ao controle, fato que não ocorre quando a cafeína é aplicada no tratamento conjunto, podendo indicar uma leve proteção.

Conclusão:

Os resultados nos mostram diferenças no padrão de fosforilação de ERK entre as linhagens e no tempo de exposição aos tratamentos. Nas linhagens, a diferença pode estar na distribuição dos ARs, assim como na presença de populações distintas de receptores, alterando a sinalização. Em relação ao tempo, mecanismos de adaptação/tolerância podem ser desenvolvidos, alterando as vias, o que fica evidente na comparação da exposição de 3h com a de uma semana à cafeína (**FIGs. 2 e 3**) em N2a. Tal fato pode ser interessante na DA e talvez seja uma das explicações da proteção que ela exerce em humanos quando olhamos o consumo prolongado da substância.

Considerações finais:

Pela contemplação tardia, na 11^a chamada, o escopo do projeto já havia passado por modificações. Porém, as ferramentas e os mecanismos moleculares de interesse, não foram deixados de lado. Além do mais, a pandemia da COVID-19, impediu a realização de todo o planejamento e de novos experimentos, sendo o último deles realizado no final de fevereiro. Assim, fica para o futuro a possibilidade de aprofundamento na DA com o próximo projeto de IC, explorando também alguns dos resultados aqui, como o caso da duração do tratamento.

Referências:

1. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):1-34. doi:10.1124/pr.110.003285
2. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):413-492.
3. Jacobson KA. Introduction to Adenosine Receptors as Therapeutic Targets. In: Wilson CN, Mustafa SJ, eds. *Adenosine Receptors in Health and Disease*. Vol 193. Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg; 2009:1-24. doi:10.1007/978-3-540-89615-9_1
4. Chen J-F, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(4):265-286. doi:10.1038/nrd3955
5. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews.* 2018;98(3):1591-1625. doi:10.1152/physrev.00049.2017
6. Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51(1):83-133.
7. Heckman MA, Weil J, de Mejia EG. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science.* 2010;75(3):R77-R87. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01561.x
8. Fernández SMS, Ribeiro SML. Nutrition and Alzheimer Disease. *Clinics in Geriatric Medicine.* 2018;34(4):677-697. doi:10.1016/j.cger.2018.06.012
9. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports.* 2015;67(2):195-203. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.004
10. Sereniki A, Vital MABF. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev psiquiatr Rio Gd Sul.* 2008;30(1 suppl). doi:10.1590/S0101-81082008000200002
11. Domenici MR, Ferrante A, Martire A, et al. Adenosine A2A receptor as potential therapeutic target in neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Research.* 2019;147:104338. doi:10.1016/j.phrs.2019.104338
12. Kolahdouzan M, Hamadeh MJ. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2017;23(4):272-290. doi:10.1111/cns.12684
13. Rahman A. The Role of Adenosine in Alzheimers Disease. *CN.* 2009;7(3):207-216. doi:10.2174/157015909789152119
14. Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, et al. Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain β -amyloid production. *Neuroscience.* 2006;142(4):941-952. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.07.021
15. Arendash GW, Mori T, Cao C, et al. Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid- β Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice. *JAD.* 2009;17(3):661-680. doi:10.3233/JAD-2009-1087
16. Canas PM, Porciuncula LO, Cunha GMA, et al. Adenosine A2A Receptor Blockade Prevents Synaptotoxicity and Memory Dysfunction Caused by β -Amyloid Peptides via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Neuroscience.* 2009;29(47):14741-14751. doi:10.1523/JNEUROSCI.3728-09.2009

17. Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Caffeine and adenosine A_{2A} receptor antagonists prevent β -amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Experimental Neurology*. 2007;203(1):241-245. doi:10.1016/j.expneurol.2006.08.008
18. Faivre E, Coelho JE, Zornbach K, et al. Beneficial Effect of a Selective Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist in the APP^{swe}/PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:235. doi:10.3389/fnmol.2018.00235
19. Laurent C, Burnouf S, Ferry B, et al. A_{2A} adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol Psychiatry*. 2016;21(1):97-107. doi:10.1038/mp.2014.151
20. Dall'Igna OP, Porciúncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A_{2A} receptor blockade of β -amyloid neurotoxicity. *British Journal of Pharmacology*. 2003;138(7):1207-1209. doi:10.1038/sj.bjp.0705185
21. Cao C, Loewenstein DA, Lin X, et al. High Blood Caffeine Levels in MCI Linked to Lack of Progression to Dementia. *JAD*. 2012;30(3):559-572. doi:10.3233/JAD-2012-111781
22. Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Midlife Coffee and Tea Drinking and the Risk of Late-Life Dementia: A Population-Based CAIDE Study. *JAD*. 2009;16(1):85-91. doi:10.3233/JAD-2009-0920
23. Gelber RP, Petrovitch H, Masaki KH, Ross GW, White LR. Coffee Intake in Midlife and Risk of Dementia and its Neuropathologic Correlates. *JAD*. 2011;23(4):607-615. doi:10.3233/JAD-2010-101428
24. Lindsay J. Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective Analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*. 2002;156(5):445-453. doi:10.1093/aje/kwf074
25. Maia L, de Mendonca A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol*. 2002;9(4):377-382. doi:10.1046/j.1468-1331.2002.00421.x
26. RITCHIE H, ROSER M. Obesity. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/obesity>. Published 2017. Accessed June 27, 2020.
27. van Gelder BM, Buijsse B, Tijhuis M, et al. Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(2):226-232. doi:10.1038/sj.ejcn.1602495
28. Pedata F, Corsi C, Melani A, Bordoni F, Latini S. Adenosine Extracellular Brain Concentrations and Role of A_{2A} Receptors in Ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;939(1):74-84. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03614.x
29. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signalling*. 2003;15(9):813-827. doi:10.1016/S0898-6568(03)00058-5
30. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*. 2012;66(2):105-143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005
31. Kirouac L, Rajic AJ, Cribbs DH, Padmanabhan J. Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *eNeuro*. 2017;4(2):ENEURO.0149-16.2017. doi:10.1523/ENEURO.0149-16.2017
32. Zhu X, Lee H, Raina AK, Perry G, Smith MA. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer's Disease. *Neurosignals*. 2002;11(5):270-281. doi:10.1159/000067426
33. Schulte G, Fredholm BB. Human Adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase 1/2. *Mol Pharmacol*. 2000;58(3):477-482. doi:10.1124/mol.58.3.477
34. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pathological overproduction: the bad side of adenosine: Bad sides of adenosine. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(13):1945-1960. doi:10.1111/bph.13763
35. Fredholm BB. Adenosine—a physiological or pathophysiological agent? *J Mol Med*. 2014;92(3):201-206. doi:10.1007/s00109-013-1101-6
36. Zhou S-F, Zhang L-F, Zhou Z-W, et al. Coffee and caffeine potentiate the anti-amyloidogenic activity of melatonin via inhibition of A β oligomerization and modulation of the Tau-mediated pathway in N2a/APP cells. *DDDT*. Published online December 2014:241. doi:10.2147/DDDT.S71106
37. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59-70. doi:10.1111/ene.13439
38. Yusuf M, Weyandt LL, Piryatinsky I. Alzheimer's disease and diet: a systematic review. *International Journal of Neuroscience*. 2017;127(2):161-175. doi:10.3109/00207454.2016.1155572
39. Nakandakari SCBR, Muñoz VR, Kuga GK, et al. Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2019;79:284-293. doi:10.1016/j.bbi.2019.02.016
40. Kocahan S, Doğan Z. Mechanisms of Alzheimer's Disease Pathogenesis and Prevention: The Brain, Neural Pathology, N-methyl-D-aspartate Receptors, Tau Protein and Other Risk Factors. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017;15(1):1-8. doi:10.9758/cpn.2017.15.1.1