



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JUSSARA DE LIMA

**AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DA CAFEÍNA EM LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA - SK-MEL-28**

CHAPECÓ - SC
2023

JUSSARA DE LIMA

**AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DA CAFEÍNA EM LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA SK-MEL-28**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Moreno e coorientação da Prof^a Dra. Margarete Dulce Bagatini

**CHAPECÓ-SC
2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Av. Fernando Machado, 108 E
Centro, Chapecó, SC – Brasil
Caixa Postal 181 CEP 89802-112

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Jussara de Lima
AÇÃO ANTINEOPLÁSICA DA CAFEÍNA EM LINHAGEM CELULAR DE
MELANOMA - SK-MEL-28 / Jussara de Lima . -- 2023.
54 f.

Orientador: DOUTOR Marcelo Moreno
Co-orientadora: DOUTORA Margarete Dulce Bagatini
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

1. CAFEÍNA. 2. CÂNCER. 3. MELANOMA CUTÂNEO. I.
Moreno, Marcelo, orient. II. , Margarete Dulce Bagatini,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JUSSARA DE LIMA

Ação antineoplásica da Cafeína em linhagem celular de melanoma - SK-Mel-28

Defesa de Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, apresentado para banca examinadora em 23/02/2023.

Aprovado em: 23/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof: Dr.Marcelo Moreno – UFFS¹

Orientador

Documento assinado digitalmente



MARGARETE DULCE BAGATINI

Data: 09/10/2023 11:14:32-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Margarete Dulce Bagatini – UFFS

Presidente da banca/coorientadora

Documento assinado digitalmente



SARAH FRANCO VIEIRA DE OLIVEIRA MACIEL

Data: 06/10/2023 14:04:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra Sarah F. V. de Oliveira Maciel – UFFS

Membro titular

Documento assinado digitalmente



ZULEIDE MARIA IGNACIO

Data: 08/10/2023 18:29:11-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra Zuleide Maria Ignácio – UFFS

Membro titular

Chapecó-SC, 23 de fevereiro de 2023.

¹Marcelo Moreno (UFFS) é o professor orientador deste trabalho, porém no momento da defesa encontrava-se em licença capacitação. Dessa forma, Profa. Margarete Dulce Bagatini foi responsável pelos encaminhamentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto clínico de um melanoma cutâneo

Figura 2. Aspecto dermatoscópico de um melanoma cutâneo

Figura 3. Aspecto histológico de uma micrometastase de melanoma cutâneo

Figura 4. Captura longitudinal de exame de PET-SCAN de um paciente com melanoma

Figura 5. Ilustração células de Melanoma Sk-Mel-28

Figura 6. Viabilidade Celular- MTT.

Figura 7. Hidrólise dos Nucleotídeos ATP e ADP e AMP

Figura 8. Hidrólise dos Nucleotídeos ATP e ADP e AMP

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – adenosina desaminase
ADO – adenosina
ADH - hormônio antidiurético
ADP – adenosina difosfato
AMP – adenosina monofosfato
AMPC – adenosina monofosfato cíclico
ATP – trifosfato de adenosina
BRAF - é um gene humano que produz uma proteína chamada B-Raf
CGA - Ácido clorogênico
COX - cicloxigenase
CT - teste controle
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
EUA - Estados Unidos da América
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
IFN- γ – interferon gama
IL – interleucina
INCA - Instituto Nacional do Câncer
iNOS – óxido nítrico sintase
LPS – lipopolissacarídeo
MC - Melanoma cutâneo
mRNA – RNA mensageiro
mM - Milimolar
MTT – é um método rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular
NF- κ B – fator de transcrição nuclear kappa B
NO - óxido nítrico
OH - radical hidroxila
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS - phosphatebuffered saline
PKA - proteinkinase A
RNS - espécie reativa de nitrogênio (
ROS – reactiveoxygenspecies
SDS – sodiumdodecylsulfate TCR – T-cell receptor
Th – T helper
TNF – fator de necrose tumoral
UV - radiação ultravioleta

RESUMO

Entre as neoplasias malignas humanas, o melanoma cutâneo (MC) possui maior capacidade de disseminação sistêmica quando comparado com os cânceres mais prevalentes. O melanoma é originado da proliferação desordenada dos melanócitos causada por inúmeros fatores que resultam em mutações genéticas cumulativas, responsáveis pela agressividade da doença. Melanomas cutâneos diagnosticados com espessura de invasão maior podem ser de difícil controle no tratamento local e sistêmico, apesar do desenvolvimento de novas terapias. Com isso, busca-se constantemente por alternativas terapêuticas para auxiliar no tratamento dessa doença. Atualmente os compostos naturais estão sendo utilizados para auxiliar no tratamento tumoral, entre eles está a cafeína. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da cafeína no sistema purinérgico e estresse oxidativo em células de MC, utilizando a linhagem celular SK-MEL-28, proveniente do banco de células do Rio de Janeiro cultivadas em meio DMEM a uma atmosfera de 5% de CO₂. As mesmas foram tratadas com diferentes concentrações de cafeína e analisada a viabilidade celular, sistema purinérgico e estresse oxidativo. Os resultados deste trabalho evidenciaram a capacidade de a cafeína diminuir a expressão gênica e protéica das ectonucleotidases CD39 e CD73 e regular a quantidade de ATP extracelular induzindo a morte celular. Dessa forma, a cafeína surge como um promissor coadjuvante terapêutico no melanoma cutâneo.

Palavras-chave: Cafeína. Melanoma Cutâneo. Antioxidante. Antimutagênica.

ABSTRACT

Among human malignant neoplasms, cutaneous melanoma has a greater capacity for systemic dissemination when compared to the most prevalent cancers. Melanoma originates from the disordered proliferation of melanocytes caused by numerous factors that result in cumulative genetic mutations, responsible for the aggressiveness of the disease. Cutaneous melanomas diagnosed with greater invasive thickness can be difficult to control in local and systemic treatment, despite the development of new therapies. Therefore, there is a constant search for therapeutic alternatives to help in the treatment of this disease. Currently, naturally extracted products are being used to aid in tumor treatment, among them is caffeine. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the effects of caffeine on the purinergic system and oxidative stress in cutaneous melanoma cells. using the SK-MEL-28 cell line from the Rio de Janeiro cell bank cultivated in DMEM medium at 5% CO₂. They were treated with different concentrations of caffeine and subsequent analysis of cell viability, purinergic system and oxidative stress. The results of our work showed a decrease in the gene and protein expression of the CD39 and CD73 ectonucleotidases and, with that, regulate the amount of extracellular ATP in the purinergic cascade and induce cell death. Thus, caffeine appears as a promising therapeutic adjuvant in cutaneous melanoma.

Keywords: Caffeine, cutaneous melanoma; antioxidant and antimutagenic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Melanoma cutâneo	12
3.2 Cafeína	16
3.3 Ação da cafeína em células neoplásicas	17
3.4 Ação da cafeína em células de melanoma	18
3.5 Estresse oxidativo e inflamação	19
3.6 Ação da cafeína no sistema purinérgico	21
4. MANUSCRITO	24
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6. REFERENCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Diagnósticos de melanoma cutâneo (MC) aumentaram rapidamente nos últimos anos em todas as partes do mundo, ainda é incerto se devido ao número de casos novos ou seria devido à procura por serviços médicos de forma mais frequente e precoce (WELCH,2021). Mesmo assim, o MC diagnosticado em estágios avançados se comporta como uma neoplasia agressiva, sendo uma das principais causas de morte por câncer de pele devido ao potencial metastático (ABBAS et al., 2014).

Tanto o desenvolvimento do MC ou do câncer de pele não melanoma, está associado à exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), principalmente quando ocorrem durante a infância e/ou adolescência. Outros fatores de risco como: a cor clara dos olhos, cabelos e pele, história familiar ou pessoal prévia de câncer de pele, imunodepressão, seja por doenças ou por uso de imunossupressores, e, para o melanoma em específico, a presença de muitos nevos, ou de nevos atípicos também devem ser considerados como adjuvantes no desenvolvimento desta doença (SGARBI et al., 2007, SOUZA et al., 2009).

No Brasil, o MC representa apenas 3% das neoplasias malignas, mas nas regiões Sul e Sudeste a doença é mais incidente devido às características fenotípicas da população associadas à localização geográfica dessas áreas. A cirurgia é o tratamento inicial que pode ser complementada com radioterapia e imunoterapia, dependendo do estágio patológico da doença. A imunoterapia vem sendo usada como tratamento sistêmico nos últimos anos e apresenta taxas de resposta melhores em pacientes com MC com estágios III ou IV, quando comparada às terapias anteriormente utilizadas como o quimioterápico dacarbazina, interferon e até mesmo terapias alvo como moléculas inibidoras de BRAF. Mesmo assim, os ICIs ainda apresentam taxas de resposta em torno de 30%, o que faz manter a demanda por novas formas de tratamento dessa doença potencialmente fatal. (BRASIL, 2020; LUKE et al., 2017).

Dentro das inúmeras buscas por novas formas de tratamento, estudos que avaliam a ação de substâncias naturais em células neoplásicas, continuam sendo desenvolvidos. Geralmente, essas abordagens são motivadas por estudos observacionais populacionais onde são encontradas associações entre o uso de determinada substância, encontrada em alimentos comuns àquela região, e a baixa incidência ou mortalidade por determinada doença. Uma dessas substâncias, bebida com grande consumo e referenciada pela população, bem como citada na literatura, é a cafeína. Inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* (com modelos animais) documentaram a ação antineoplásica dessa substância em diferentes linhagens de células

neoplásicas, e vias metabólicas, ou ação sobre genes e/ou proteínas relacionadas com ciclo celular. (DE MARIA; GOMIDE, 2019).

Considerando esses aspectos, abaixo estão descritos os objetivos relacionados ao presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antineoplásica da cafeína em linhagem celular de melanoma cutâneo SK-Mel-28.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar os efeitos da cafeína sobre indicadores de viabilidade e migração celular em células SK-Mel-28;
- Verificar a ação da cafeína sobre os marcadores de estresse oxidativo;
- Avaliar os efeitos da cafeína na expressão protéica e na ação das ectonucleotidases, bem como nos níveis de ATP extracelular.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Melanoma cutâneo

Entre as neoplasias já conhecidas o MC se destaca pela capacidade de metastização, Nos Estados Unidos, a incidência continua a aumentar, tendo dobrado nas últimas 4 décadas. Em 2019, aproximadamente 96.480 pacientes foram diagnosticados com MC, representando 5,5% de todos os novos casos de câncer (SIEGEL, 2020).

Sendo o câncer de pele mais agressivo, proveniente da perda dos mecanismos genéticos de controle celular, causando uma proliferação de melanócitos atípicos na camada basal da epiderme. Estes danos são causados principalmente pelas radiações UVA e UVB (KIURU e KLAUS,2017). No Brasil, o câncer de pele não melanoma é considerado o mais frequente e corresponde a cerca de 31.3% de todos os tumores malignos registrados no país. No entanto, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas (MÂNICA & LANG, 2017; MOREIRA, 2017; NEVES, 2018; BRASIL, 2023).

A última estimativa divulgada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2020, no Brasil foram estimados 83.770 novos casos de câncer de pele não melanoma em homens, e 93.170 novos casos de câncer de pele não melanoma em mulheres. Esperava-se que a região Sul, nominando Santa Catarina, alcançasse maiores números de novos casos, com pequena diferença entre os sexos, e as regiões Norte e Nordeste possuíam estimativa de menor número de novos casos (BRASIL,2020). Em 2020, ocorreram 324.635 novos casos e 57.043 mortes no mundo, e considerando essas taxas, pode-se prever que até o ano de 2040 mais de 500.000 novos casos. Isto tem sido fortemente associado à exposição à luz solar de forma excessiva, causando danos à pele pelos raios UV (FERLAY et al., 2022; CARL, 2020).

O diagnóstico do MC é realizado pela excisão da lesão suspeita pela clínica e/ou dermatoscopia (Figuras 1 e 2). Após, a confirmação da suspeita clínica, é realizado o estadiamento da doença; que se dá pela associação das informações do microestadiamento (índice de Breslow, número de mitoses/mm², ulceração etc) com os exames laboratoriais e radiológicos. Com isso, a doença pode ser classificada (resumidamente) em estágio 0 (melanoma *in situ*), estágio I (doença restrita a derme superficial); estágio II (doença restrita a derme ou hipoderme e/ou com fatores de mau prognóstico associados como ulceração); estágio III (com comprometimento linfonodal regional associado) (Figura 3); e estágio IV (com metástase à distância), (Figura 4) (MILLER; MIHM 2006).

O tratamento para pacientes com MC em estágios 0, I e II é ressecção cirúrgica da lesão primária (com margem de segurança e pesquisa de linfonodo sentinela orientados pela espessura de Breslow); paciente com estágio III de modo geral são submetidos a cirurgia associada a imunoterapia/terapia alvo sistêmica com ou sem radioterapia (dependendo do comprometimento linfonodal associado). Já os pacientes com estágio IV são tratados basicamente com terapia sistêmica, associada ou não a cirurgia e radioterapia, dependendo da localização das metástases (exemplo metástase cerebral), (CHABNER, 2005; DEVITA, 2008).

Com o conhecimento do genoma humano e a apropriação das vias metabólicas em células neoplásicas, foram desenvolvidas moléculas que interferem diretamente em vias responsáveis pelo controle de crescimento e divisão celulares, as quais foram denominadas de “terapia alvo” como os inibidores BRAF e MEK (COLOMBINO, 2012; FLAHERTY, 2012). No entanto, somente parte dos pacientes com melanoma podem ser beneficiados com esses inibidores, pois para obterem resposta é necessário que os genes envolvidos nessas vias sejam mutados (KWAK, 2007). Com o desenvolvimento da imunoterapia, outras moléculas denominadas “inibidores dos pontos de bloqueio do sistema imune” (ou inibidores de checkpoint) (ICI), como pembrolizumabe e nivolumabe (inibidores proteína-1 de morte celular programada [PD-1]), e ipilimumabe (inibidor do antígeno-4 de linfócito T citotóxico [CTLA-4]); vêm sendo usadas em rotina clínica como tratamentos adjuvantes e neoadjuvantes em pacientes com melanomas com fatores prognósticos associados à pior sobrevida. Os resultados são animadores, uma vez que as taxas de respostas são altas e duradouras, o que sinaliza para o papel no aumento da sobrevida desses pacientes (LEACH, 1996; NAKAMAURA, 2019; KABALSI, 2020).

No entanto, alguns pacientes apresentam progressão da doença ou pouca resposta clínica depois do uso de ICI (ORLOFF, 2016). Com isso, é de fundamental importância conhecer que fatores moleculares poderiam prever os pacientes que não teriam resposta a esse tipo de tratamento, além de realizar a caracterização molecular e genômica abrangente através da análise de DNA de tumor circulante como ferramentas preditivas para a aplicação clínica.



Foto: arquivo pessoal Marcelo Moreno.

Figura 1 - Aspecto clínico de um melanoma cutâneo: lesão assimétrica, bordas irregulares, cores escuras, que variam do marrom escuro e predominando o preto, diâmetro > que 6 mm. Nesse caso, era de uma paciente de 25 anos e que referia aumento progressivo da lesão em um período de 6 meses.

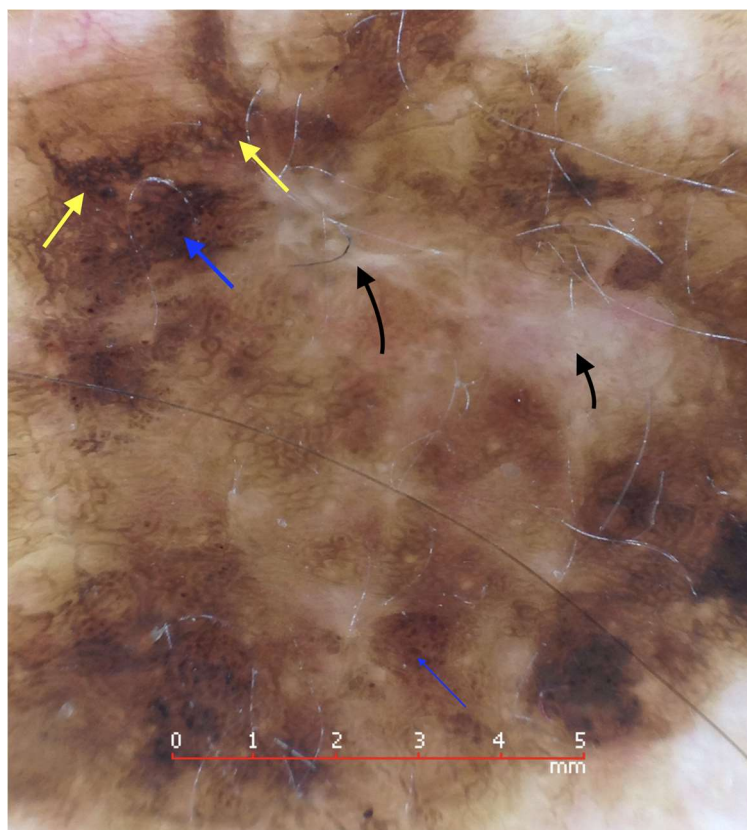


Foto: arquivo pessoal Marcelo Moreno.

Figura 2 - Aspecto dermatoscópico de um melanoma cutâneo (20 XX): presença de rede pigmentar irregular (seta amarela); áreas hiperpigmentadas sem estruturas e/ou com pontos irregulares (seta azul); regiões excêntricas amorfas e esbranquiçadas ou com tons cinzas (seta preta).

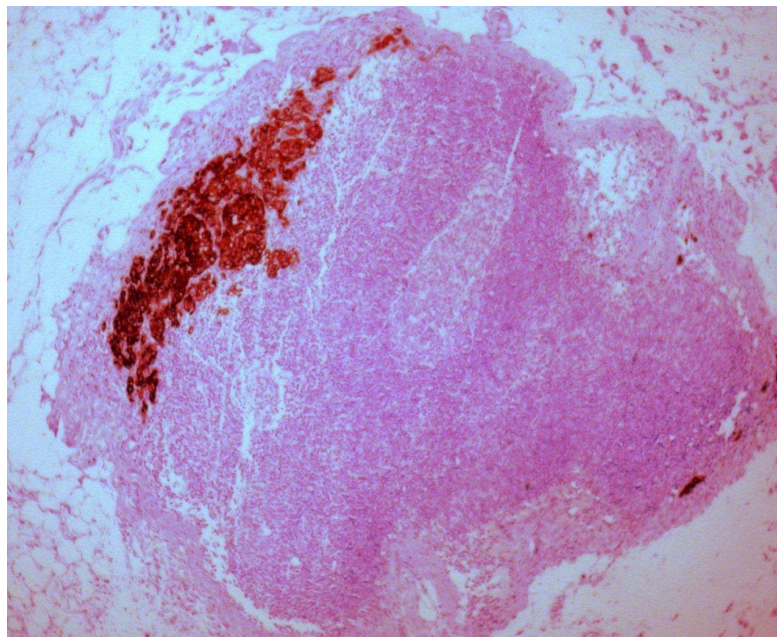


Foto: arquivo pessoal Marcelo Moreno.

Figura 3 - Aspecto histológico de uma micrometastase de melanoma cutâneo identificada pela coloração de Melan A (área escura excêntrica), em um linfonodo sentinela, configurando assim um estágio III (40XX).

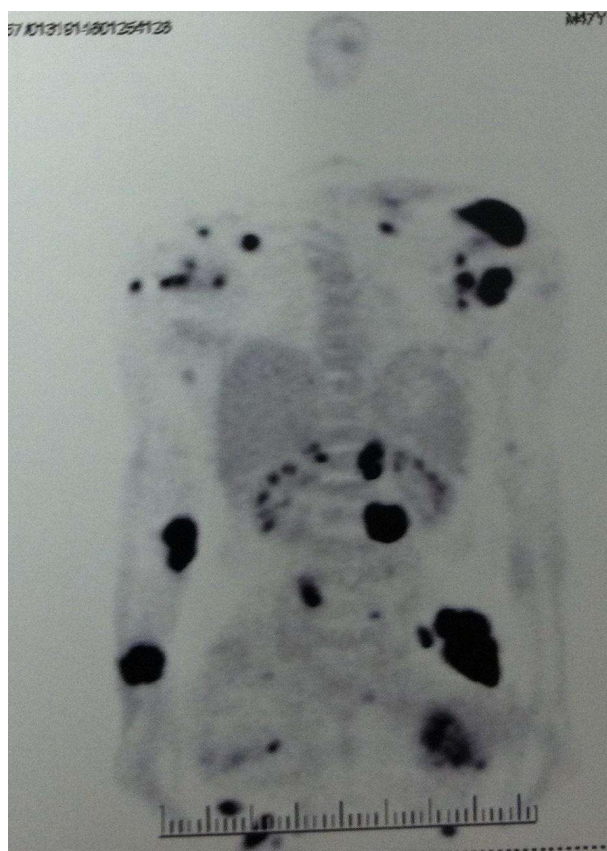


Foto: arquivo pessoal Marcelo Moreno.

Figura 4 - Captura longitudinal de exame de PET-SCAN de um paciente com melanoma cutâneo metastático (estágio IV), onde é possível verificar doença secundária em diferentes sítios anatômicos (áreas escuras)

3.2 Cafeína

A cafeína, um alcalóide de xantina, foi identificada no café nos séculos XV e XVI, sendo introduzida na Europa Ocidental através da Turquia. A mesma foi descoberta pelos monges através do uso do café para reduzir a fadiga e aumentar o estado de alerta para poder passar a noite em orações. Atualmente, o café produzido no Brasil é cultivado em São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo e Paraná, cada região se destaca dependendo do clima, sendo cultivado da espécie de café Arábica e Conilon (GUERRA et al., 2000, EMBRAPA,2021).

Considerada como um estimulante natural mais consumido no mundo apresenta diversas propriedades moleculares benéficas. Seus efeitos fisiológicos são mediados pela rápida absorção pelo trato gastrointestinal quando consumidos mais comumente em bebidas cafeinadas. A cafeína tem várias ações moleculares, incluindo a capacidade de atuar como inibidor da fosfodiesterase, rianodina e antagonista do receptor de adenosina, além de inúmeras propriedades citoprotetoras por meio de seu papel antioxidante e capacidade de inibir a carcinogênese (VISCONTI; HAIDARI; FELDMAN, 2020).

A cafeína também é encontrada em diversas plantas, presentes em grãos, folhas e frutos, em bebidas, e alimentos, sendo amplamente utilizada em dietas alimentares em consumo regular com efeito benéfico. No café, pode ocorrer atividade farmacológica por ação de um antagonista de receptores de adenosina, acoplados em proteínas G pela ingestão através de infusão dos grãos. Em bebidas, como energizantes, pode ocorrer o mesmo efeito dependendo da concentração e dose. Também é adicionada na fórmula de vários medicamentos, como na associação com paracetamol ou ácido acetilsalicílico em antipiréticos e com as ergotaminas (antiemética) (MARX et al., 2016, DE MARIA; GOMIDE, 2019).

Vários mecanismos de ação foram documentados, incluindo a desintoxicação de agentes cancerígenos, inibição da carcinogênese, indução de apoptose de células cancerígenas, bem como supressão do estresse oxidativo e alterações no DNA. (WU et al.,2015, YEY et al.,2016).

Do ponto de vista farmacológico, a cafeína exerce seus principais efeitos através da intermediação de um antagonismo competitivo de receptores de adenosina, receptores acoplados a proteínas G dos quais existem vários tipos: A1, A2a, A2b, A3. Os receptores A1 e A2 estão amplamente distribuídos por todo o organismo, particularmente em células do sistema nervoso central, brônquios, vasos, pêlos e rins. Participam de múltiplas funções fisiológicas e

patológicas (CHEN et al., 2013). Outra ação importante da cafeína é o estímulo à diurese, devido inibir o hormônio ADH estimulante (GUERRA,2000).

Atualmente encontramos análises do potencial da cafeína no organismo, associado ao consumo, possibilitando a diminuição dos riscos metabólicos na diabetes e obesidade por sua ação no metabolismo lipídico, por ser um antagonista do receptor de adenosina atuando como neuromodulador no gasto energético. Considerando as orientações do Departamento da Agricultura dos EUA, e pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar é indicado o consumo entre 50 e 380 mg (100 ml) da bebida regular de café, o que pode modificar conforme a extração e processamento da bebida (FARIAS et al.; 2019; BELAYNEH, 2020).

A cafeína é considerada pela Organização Mundial da Saúde, como uma droga estimulante do sistema nervoso central, juntamente com as anfetaminas, a nicotina e a cocaína (OMS, 2019). Os mecanismos de ação ocorrem pela antagonização aos receptores da adenosina (ADO), aumentando o metabolismo energético, ativando os neurônios da noradrenalina podendo comprometer a liberação da dopamina. Estes efeitos podem estar associados a ação da metilxantina nos neurônios de serotonina, demonstrando com intensidade efeitos sobre ansiedade e sono, oscilando de acordo com a sensibilidade ao componente (ALHOWAIL, 2019).

Em uma metanálise, os autores sugerem que a cafeína, devido ao seu efeito vasoconstritor decorrente do bloqueio dos receptores de adenosina, possa ser útil no alívio da cefaléia (SAWYNOK, 2010). Desde 2012, as pesquisas relacionam os efeitos do consumo de café ou cafeína na redução de fibrose hepática e de desenvolvimento de lesões hepáticas (pré-cancerígenas e cancerígenas). Doenças deste tipo chegam a atingir cerca de 4,3 milhões de pessoas todo ano e causam, aproximadamente, 3 milhões de mortes, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012; WRZESNIOK, 2018).

Os estudos em relação ao uso do café, evidenciam a redução de várias doenças, neurológicas, neurodegenerativas, cardiovasculares e diabetes tipo 2. Com maior relevância, as análises de que o café em maior consumo tem diminuído a mortalidade de origem cancerígena, incluindo o MC, colorretal, próstata, pulmão, fígado e câncer de mama (CAINI et al.,2017; MACKINTOSH et al.; 2020).

3.3 Ação da cafeína em células neoplásicas

Em estudo realizado por (ROSENDAH et al.,2015), foi verificado que a ingestão moderada à alta de café em pacientes em tratamento quimioterápico para câncer de mama teve

relação com menor proliferação tumoral em relação às pacientes que faziam pouco consumo de café. Descrevendo a nível celular o aumento das doses de cafeína suprimiu significativamente a proliferação tumoral e número total de células de câncer de mama.

O impacto da cafeína na carcinogênese foi amplamente estudado e foi originalmente investigado em camundongos (HUANG et al., 1997). A cafeína preveniu a carcinogênese induzida por UVB quando administrada oralmente a camundongos, e esses efeitos foram perdidos com a remoção da cafeína do chá verde ou preto. Quando aplicada a células humanas, a cafeína induz apoptose em queratinócitos que foram infligidos com dano UVB e bloqueou as vias oncogênica AKT e COX-2 críticas na tumorigênese da pele após a exposição UVB (HAN; MING; HE, 2011).

Em análise feita por (ALMATROODI et al., 2020), destaca-se a potencialidade anti-inflamatória por inibir o fator de necrose tumoral. Sendo possível observar sua viabilidade em vários tipos de câncer por inibir a superexpressão da ciclooxigenase (COX) -2, sem afetar a expressão de COX-1 em ambos os níveis de mRNA e proteína, em células LNCaP sensíveis a andrógenos e células de carcinoma de próstata humano PC-3 insensíveis a andrógenos (WANG et al., 2014; GUPTA, et al., 2004).

3.4 Ação da cafeína em células de melanoma

Em um estudo *in vitro* foi observado que a substância cafeína quando exposta as células do melanoma B16F10 reduziram significativamente a sua viabilidade, demonstrando ser potencialmente eficaz contra o melanoma, reduzindo a atividade metabólica e o crescimento das células do melanoma metastático (DA SILVA et al., 2021).

Em 2015, Wu e colaboradores identificaram uma associação inversa significativa entre o aumento da ingestão de cafeína e o risco de melanoma geral. Os participantes na categoria de ingestão de cafeína mais alta (≥ 393 mg/d) tiveram um risco 22% menor de melanoma em comparação com aqueles na categoria de ingestão mais baixa (< 60 mg/d). A associação inversa com a ingestão de cafeína e o consumo de café com cafeína foi mais aparente em mulheres do que em homens, e mais aparente para melanomas ocorridos na cabeça, pescoço e extremidades do que para melanomas ocorridos no tronco.

A cafeína pode inibir a carcinogênese induzida por UV através de vários mecanismos biológicos. Existe uma plausibilidade biológica convincente de que a ingestão de cafeína pode desempenhar um papel importante na prevenção do MC pois, a administração de cafeína aumenta a apoptose induzida por UV por mecanismos dependentes e independentes de p53; a

administração oral de café teve um efeito estimulador semelhante na apoptose induzida por UV 10; por interromper o ciclo celular no checkpoint G2 e radiosensibilizar preferencialmente as células tumorais pela inibição das atividades da proteína quinase da ataxia telangiectasia mutada e relacionada à Rad3 (ART); e inibir o crescimento de células de melanoma *in vitro* e *in vivo*; além de prevenir a neovascularização, aumentar a apoptose destas células (WU et al., 2015).

Análise de viabilidade celular em estudo realizado por RESPONDEK et al., (2018), demonstrou o efeito da cafeína na viabilidade de células de melanoma COLO829 e C32 evidenciando a diminuição celular em ambas linhagens. Com maior efeito na linhagem COLO829, onde a cafeína atua na regulação do crescimento de células através da citoestase em vez de citotoxicidade. Conforme revisão sistemática com metanálise sobre o consumo de café em melanoma, foram descritos os mecanismos de ação do composto bioativo cafestol. Onde os indivíduos que consumiram café regularmente tiveram uma redução de 25% no risco de melanoma em comparação com aqueles que consumiram café com pouca frequência (CAINI et al., 2017).

Em uma revisão bibliográfica realizada no período de 07 anos, analisando 91 artigos, evidenciou que o uso da cafeína previne a carcinogênese provada por UV. Contextualizando diferentes estudos de coorte prospectivo nos Estados Unidos, do National Institutes of Health-AARP, realizado com 447.357 participantes, foi avaliado por meio de questionário de frequência alimentar (QFA), o consumo de café. Demonstrando (≥ 4 xícaras / dia) onde a maior ingestão de café foi relacionada a menor probabilidade de desenvolvimento de câncer de fígado, ovário, tireóide e endometrial e MC. Um maior consumo de cafeína, >393 mg/dia, e de café com cafeína estavam associados a redução de 22% de risco de melanoma maligno cutâneo comparado com um consumo menor, <60 mg/dia, onde a cafeína pode inibir a carcinogênese induzida por UV. A associação de café e melanoma pode ser mediado por vários mecanismos, incluindo desintoxicação de agentes cancerígenos, inibição da carcinogênese, indução de apoptose de células cancerígenas, promovendo maior evidências da ação dos compostos bioativo cafestol em relação ao MC (BATISTA et al.; 2020).

3.5 Estresse oxidativo e inflamação

Tendo a influência dos radicais livres com processos de envelhecimento, desenvolvimento de câncer, mutações e morte celular, através de alterações químicas, nas bases nitrogenadas, na ribose do DNA e na quebra de suas ligações. As espécies reativas de oxigênio

(EROS) podem infligir danos celulares quando a geração é aumentada e os mecanismos de defesa antioxidantes são sobrecarregados. Esta condição de desequilíbrio de um agente pró-oxidante/antioxidante é definida como estresse oxidativo (SANDER, 2004).

A propriedade antioxidante está relacionada à estrutura química das catequinas, sendo potencializada pela presença de radicais ligados aos anéis e à presença de grupos hidroxila. As catequinas podem capturar as EROS, como o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, considerados extremamente danosos aos lipídios, proteínas e DNA, atuando na transferência de elétrons para EROS, envolvendo os radicais flavônicos menos reativos (DA, et al., 2008, SENGER, 2010).

Estudos têm relatado que EROS desempenham um papel importante na ativação da apoptose por muitos medicamentos e tratamentos de radiação. Envolvidos de agentes fotossensibilizantes de tratamento do câncer, mostrando que as células de melanoma mutante BRAF podem apresentar aumento do metabolismo oxidativo e aumento da dependência das mitocôndrias para a sobrevivência (BEBEROK, 2020).

Segundo Manica e Lang (2017), os radicais livres estão envolvidos, em todas as fases de desenvolvimento do câncer. Devido aos efeitos potencialmente nocivos das EROS, as células utilizam vários mecanismos para modular os níveis intra e extracelulares, incluindo a expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. E um descontrole entre a geração e remoção de radicais livres pode resultar em estresse oxidativo ou um estado pró-oxidante, resultando em um aumento da proliferação, adaptação, injúria celular, apoptose, envelhecimento celular, citotoxicidade e morte celular.

Considerando a glutathione (GSH), o tiol não protéico mais abundante nas células de mamíferos, o qual desempenha um papel importante em uma infinidade de processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. (TRAVERSO et al., 2013). A cafeína pode controlar o metabolismo do GSH. Estudos mostraram que a cafeína 5mg/kg (em duas doses diárias por sete dias consecutivos) melhorou os níveis plasmáticos de GSH e a capacidade antioxidante total, além de diminuir os níveis de hidroperóxidos lipídicos e malondialdeído em voluntários saudáveis do sexo masculino. A melhora dos níveis de GSH pode ser explicada pelo aumento da captação de cisteína na presença de cafeína, causando impacto no sistema antioxidante por estar associado aos receptores de adenosina. Os quais são os principais alvos moleculares da cafeína e estão envolvidos na regulação da produção de EROs (METRO et al., 2017).

Evidências sugerem que as substâncias do café estão envolvidas nesse efeito benéfico ao aumentar as defesas antioxidantes endógenas. A cafeína foi eficaz na proteção do cristalino

de camundongos contra o dano oxidativo induzido pelo ferro. A ação antioxidante da cafeína tem sido atribuída ao aumento dos níveis de glutathiona (GSH) e sua capacidade de eliminar as EROS (CHOI; JUNG; KO, 2018).

Sendo considerado que a base dos efeitos moleculares da cafeína pode derivar da atividade antioxidante e da inibição da fosfodiesterase. Por apresentar melhora na função da barreira transepidermica, previne danos mediados por radicais livres e inibe a peroxidação lipídica e necrose celular. Além de proteger os queratinócitos a exposição à radiação, induzindo apoptose em células danificadas por UV não reparadas (VISCONTI; HAIDARI; FELDDMAN, 2020). No entanto, os radicais livres estão envolvidos em aproximadamente 150 doenças humanas, dentre elas: aterosclerose e doenças cardiovasculares, desordens autoimunes e neurodegenerativas e também no câncer (IBANEZ et al., 2011).

Levando em consideração que a inflamação está ligada ao desenvolvimento do câncer, estudos epidemiológicos mostram que os alimentos anti-inflamatórios estão associados a um efeito protetor para alguns tipos de câncer, evidenciando que o café é o único alimento anti-inflamatório consistentemente associado a um efeito protetor para o MC. através de mecanismos da inibição da COX-2 e conseqüentemente da inibição da prostaglandina E2 que mitiga a inflamação (FORTES, 2020).

Sugere-se que os efeitos da cafeína sobre o sistema imune sejam dependentes da dosagem administrada. Deste modo, a cafeína pode apresentar efeitos tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios. Sendo que respostas inflamatórias ativadas estimulam a sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um dos principais fatores de transcrição da inflamação, que inicia a resposta inflamatória através do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1-beta (IL-1 β) e(iNOS). Óxido nítrico sintase induzível (LU et al., 2008 e MI, 2007).

3.6 Ação da cafeína no sistema purinérgico

Diante de diversos papéis fisiológicos e patológicos o câncer vem ganhando destaque quanto ao potencial terapêutico que os componentes do sistema purinérgico possam desempenhar. O sistema purinérgico é constituído por nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina e suas ações através da ligação aos receptores purinérgicos (purina receptores) na superfície celular e ao controle de suas ações pelas enzimas purinérgicas (DI VIRGÍLIO et al., 2001). Moléculas como os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) funcionam como DAMPs, e após liberadas por células imunes desempenham papel central na sinalização do processo

inflamatório, sendo regulados por meio das enzimas que os hidrolisam no meio extracelular, as ectonucleotidasas CD39, CD73 e E-ADA (ZIMMERMANN, ZEBISCH e STRATER, 2012).

No entanto, a resposta pró-inflamatória desencadeada pelo ATP no meio extracelular é regulada principalmente pela ação conjunta das ectonucleotidasas, enzimas de membrana que hidrolisam ATP a adenosina. As principais ectonucleotidasas são ecto-NTPDase (CD39), responsável por hidrolisar ATP a ADP e, posteriormente, a AMP; e a ecto-5'-nucleotidase (CD73), que hidrolisa o AMP a adenosina (LINDEN; KOCH-NOLTE; DAHL, 2019).

De acordo com estudos recentes a cafeína pode desencadear ou inibir a via da adenosina, dependendo do tipo de receptor purinérgico envolvido. Tem sido demonstrado que a adenosina pode ser acumulada em tecidos hipóxicos, incluindo o microambiente tumoral a qual desempenha um papel importante na regulação de processos como imunossupressão, angiogênese, proliferação, tônus vascular, permeabilidade endotelial e inflamação atuando nos receptores de adenosina (UMANSKY,2014; SITCOVSKY,2008 e MOUSAVI, 2015).

O ATP extracelular juntamente com a adenosina são moléculas sinalizadoras que atuam através de seus receptores específicos, os purinoceptores, P1 para nucleosídeos e P2 para nucleotídeos. Eles regulam muitos processos patológicos, uma vez que a adenosina, por exemplo, pode limitar os danos causados pelo ATP na excitotoxicidade das células neuronais (STEFANELLO et al., 2019).

Por ser o sistema purinérgico um importante via regulatória de diferentes tecidos, incluindo o sistema nervoso central e vascular, pâncreas e ossos. Composto por nucleosídeos e nucleotídeos, bem como pelas enzimas e receptores onde essas moléculas se ligam. A sinalização purinérgica está envolvida em condições fisiológicas e fisiopatológicas e alterações neste sistema podem estar envolvidas na resistência à insulina, lesão vascular, agregação plaquetária, inflamação e cognição (GUTIERRES et al., 2014). Recentemente, têm se demonstrado o envolvimento entre compostos naturais e o sistema purinérgico. Alguns compostos, como antocianinas, ácido cafeico, resveratrol, quercetina, cafeína e CGA, bem como vinho tinto, suco de uva e café, demonstraram regular os componentes do sistema purinérgico (MACIEL et al., 2016).

A cafeína antagoniza a ação da adenosina nos locais pré e pós-sinápticos nos receptores A1 e A2A em doses moderadas e baixas, diminuindo o efeito inibitório da adenosina. O bloqueio dos receptores A1 e A2A da adenosina pode ser obtido com quantidades que variam de 40 a 180 mg de cafeína, níveis que podem estar presentes em uma xícara de café. Concentrações de cafeína muitas vezes superiores às necessárias para o bloqueio dos receptores

de adenosina exerce outros efeitos na sinalização celular, como liberação de cálcio, inibição da fosfodiesterase e do receptor A do ácido γ -aminobutírico (FREDHOLM et al., 1999).

Conforme Silva e colaboradores (2012), em estudo de administração aguda de 30mg/kg de cafeína promove um aumento da hidrólise de ATP e ADP nos sinaptossomas de hipocampo e estriado, respectivamente. No entanto, a exposição crônica à cafeína de 0,3 e 1g/L na água por 14 dias foi incapaz de modificar as atividades de NTPDase e 5'-nucleotidase no hipocampo e sinaptossomas estriados de ratos a cafeína alterou a hidrólise de nucleotídeos e a expressão da ectonucleotidase no hipocampo de ratos (nas primeiras 3 semanas de vida pós-natal) após o consumo materno de cafeína. Assim, parece que altas concentrações agudas de cafeína podem modular a via da ectonucleotidase, que poderia produzir um aumento nos níveis de adenosina para neutralizar as ações antagonistas da cafeína.

4. MANUSCRITO

Nesta seção será apresentado o manuscrito proveniente desta dissertação, onde são evidenciadas as metodologias utilizadas, resultados e discussão. O manuscrito intitulado como “Caffeine modulates the CD39/CD73 axis, reduces viability and inhibits migration of metastatic melanoma cells” passou pelo processo de tradução para a língua inglesa e revisão, e foi submetido para a revista “European Journal of Pharmacology”.

Caffeine modulates the CD39/CD73 axis, reduces viability and inhibits migration of metastatic melanoma cells

Abstract: cutaneous melanoma is an aggressive cancer that is difficult to treat when it presents with visceral dissemination. Recently, several researches have evidenced an antineoplastic potential of natural compounds that act in blocking the dissemination of neoplasm cells, such as those of melanoma. We aimed with this study to evaluate the antineoplastic effect, modulatory potential on the purinergic system, as well as assess the redox profile in cutaneous melanoma cells treated with caffeine. The melanoma metastatic human cells lineage SK-MEL-28 and CCD-1059sk were treated for 24 hours with different concentrations of caffeine. The viability of the cells was evaluated by MTT assay and fluorescence microscopy. Cell migration was assessed by wound-healing assay. Redox evaluation was assessed by ROS, NOx, PSH and NPSH markers levels. Gene and protein expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases was assessed respectively through qPCR and flow cytometry. Enzymatic activities of CD39 and CD73 were evaluated by their capacities in hydrolyzation of nucleotides ATP, ADP and AMP. Extracellular ATP levels were assessed by a sensitive bioluminescent assay. Caffeine significantly reduced the SK-MEL-28 cell viability and migration, and had no effect on non-tumoral CCD-1059sk cells. At higher concentrations, caffeine increased ROs levels and improved PSH antioxidant levels. In addition, caffeine reduced gene and protein expression of ectonucleotidases CD39 and CD73, as well as decreases in ATP, ADP and AMP nucleotide hydrolysis. High extracellular ATP levels were detected on TME after treatment of SK-MEL-28 cells with caffeine. For the first time we found that caffeine reduces metastatic cutaneous melanoma cells viability and migration. Furthermore, caffeine reduces gene and protein expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases, and consequently hydrolytic activity, which results in a displacement of CD39/CD73 axis toward extracellular ATP increases. Thus, this xanthine would be an option for use in clinical trials with the CD39/CD73 axis as a therapeutic target.

Keywords: Skin cancer. Natural compound. Xanthine. Purinergic system. Ectonucleotidase. ATP.

Highlights:

- Several researches have been pointed the antineoplastic effect of caffeine and some cell pathways involved in this process;
- We found that caffeine has antineoplastic on SK-MEL-28 cells by means purinergic signaling modulation, reducing cell viability and migration;
- Caffeine downregulates gene and protein expression, as well as enzymatic activity of CD39 and CD73 ectonucleotidases in CM cells;
- CD39/CD73 axis displaced towards greater extracellular ATP accumulation may activate P2X receptors and lead to cell death;
- Caffeine can be an interesting antineoplastic compound to be used as adjuvant therapy.

1 INTRODUCTION

Cutaneous melanoma (CM) is one of the most aggressive skin cancer types due to its highly metastatic and low survival rates [1]. The incidence of this disease is increasing. In 2020, 324.635 new cases and 57.043 deaths occurred in the world, and considering these rates, it can be predicted that by the year 2040 more than 500.000 new cases [2,3]. It has been strongly linked to excessive sunbathing, due to harms caused by ultraviolet (UV) radiation [4].

Nowadays, the immune system checkpoint inhibitor, such as pembrolizumab and nivolumab (programmed cell death protein-1 [PD-1] inhibitors), and ipilimumab (cytotoxic T lymphocyte antigen-4 [CTLA-4] inhibitor), have been routinely used as adjuvant and neoadjuvant treatments in melanoma patients with prognostic factors associated with poor survival [5]. In addition, inhibitor molecules with direct action on the pathways responsible for controlling cell growth and division have emerged, which have been called "targeted therapy", such as BRAF and MEK inhibitors, which can be used in patients with neoplasms that have these mutated genes [6]. However, only 20% to 30% of patients show complete and lasting response with this type of therapy; and no biomarkers have been defined yet that can predict who will benefit from the use of these drugs [7,8].

An essential signaling pathway related recently to CM is the purinergic system, which interferes with mechanisms such as disordered cell proliferation, promotion of angiogenesis, and failure of mechanisms controlling apoptosis. The orchestration among the components is regulated by ectonucleotidases in the neoplasia microenvironment (TME), involving of the concentrations of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) nucleotides and adenosine (Ado)

nucleoside molecules, as well as expression of the P1 and P2 receptors [9-11] Manica et al. [12] showed that Ecto-NTPDase (CD39) and Ecto-5'-nucleotidase (CD73) are enzymes involved in the pathophysiology of CM and may be an important target in anticancer therapies, since these enzymes acts in enzymatic-axis, controlling the hydrolysis of the key purinergic signaling molecule, the ATP.

In this context, several bioactive compounds have been studied to be applied as adjuvant therapies given the cost-effectiveness, such as rosmarinic acid [13] and caffeic acid [14]. Another interesting substance is a methylxanthine coffee-derived, the caffeine (1,3,7-trimethylxantina) which is easily find on coffee grains, as in *Coffea arabica*, tea leaves of *Camellia sinensis* and cacao powder [15] which has been shown as a promissory antineoplastic natural compound. It showed that caffeine is able to mitigate the growth, migration, invasion and progression of neoplastic cells [16,17] in addition acting as antagonist in A2A receptors, exhibiting antineoplastic effect [18]. Some studies have found that caffeine also seems to be involved in redox balance [19].

Given this suggestive evidence in the literature about the potential of caffeine, in this study we aimed to evaluate its possible antineoplastic effect. Our hypothesis is that caffeine may have antitumor potential against CM cells by modulating gene and protein expression of components involved in purinergic signaling, in addition to inducing oxidative stress.

2 Material and Methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used for this study were analytical grade purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and Merck (Darmstadt, Germany). Caffeine (1,3,7-Trimethylxanthine) was purchased from Sigma-Aldrich (CAS Number: 58-08-2, EC Number: 200-362-1, PubChem Substance ID: 24900939, anhydrous, purity \geq 99%, molecular weight 194.19 g/mol). The cells SK-MEL-28 and CCD-1059sk were purchased from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ), Brazil. Cell culture plates and flasks used for culture procedures were obtained from Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA) and Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). The Master Mix for qPCR was purchased from Promega Corporation®, and primers were synthesized from Thermo Fisher Scientific (Grand Island, NY, USA). Anti-human CD39 and CD73 antibodies were purchased from BD Pharmingen™, and the readers were made by flow cytometry (BD ACCURI C6). For fluorescence assays was used a microscope Nikon® Eclipse TS2-FL

2.2 Cell culture and caffeine exposure

Both tumoral and non-tumoral cells were grown in flasks with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - high glucose and L-glutamine) containing antibiotic and antifungal (penicillin/streptomycin)

and supplemented with 10% fetal bovine. The cells were grown in adequate conditions by using a humidified and controlled atmosphere of 5% carbon dioxide (CO₂) at 37°C. Caffeine was dissolved in an adequate culture medium to obtain different concentrations and the cells were treated for 24 hours with concentrations of 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM; 4,0 mM and 6,0 mM, based on previous study [17]. The negative control group (CT) cells received only the culture medium and the tumoral positive cell group was treated with antineoplastic Dacarbazin at 1 mg/mL.

2.3 Cell viability by MTT assay

The MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay was used according to a study carried out by Mosmann [20]. Briefly, SK-MEL-28 and CCD-1059sk cells were seeded in 96-well plates, in 4 replicates, at densities of 1×10^5 cells/well and treated with different concentrations of caffeine. After the exposure times, the supernatant was removed and the cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) (0.1 M, pH 7.4) to avoid any interference from the compound used in the treatment. The MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reagent (5 mg/ml) dissolved in PBS was added and plates were incubated for 2 hours at 37 °C. Subsequently, the supernatant was discarded and 200 µL of DMSO was added in order to dissolve the formazan crystals generated by the reduction of the MTT salt by the viable cells. The absorbance was measured at 570 nm using a SpectraMax® i3 Multimode Plate Reader 96 microplates (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.4 Cell viability by microscopy fluorescence assay

After treatment, melanoma cells were seeded at a density of approximately 1×10^5 cells/well, in 96-well plates, washed twice with PBS and stained with acridine orange (AO) to verify morphological changes as described by McGahon et al. [21]. Orange is taken up by viable cells and stains double-stranded (ds) and single-stranded (ss) nucleic acids. When AO diffuses into DNA cells, it emits green fluorescence after excitation at 480-490 nm of viable. To TMRE staining, the cells received the same preparation approach of AO staining and incubated for 30 minutes with 100 µl of a solution containing TMRE (20 nM). This substance is a cationic dye that accumulates in active mitochondria and emits red color when excited at 550 nm [22]. The readings were taken under a fluorescence microscope, in triplicates, magnification of 10X, and adjusted for brightness and contrast linearly by the software Fotos (Windows®).

2.5 Wound-healing migration assay

The wound-healing assay was performed as described by Justus et al. [23] to evaluate the neoplastic cell migration. A monolayer of melanoma cells were seeded at a density of 1×10^6 cells/well in 6-well plates. After 100% confluence, a scratch was made with a sterile 200 μ l tip and an initial photo was taken with optical microscopy magnification at 4x. After the treatment time, the supernatant was removed, the cells were washed with saline and a new image was captured. To perform the statistical analyses, five different points on the wound were measured using the ImageJ software.

2.6 Oxidative stress assays

For oxidative stress assays melanoma cells were seeded in 6-well plates, at densities of 1×10^6 cells/well and treated with different concentrations of caffeine. After the exposure times, the supernatant was collected to perform the following analysis in triplicates.

2.6.1 Detection of intracellular reactive oxygen species (ROS)

To determine the ROS a commercial Fluorometric Intracellular ROS kit (Sigma® Life Science, Darmstadt, Germany) was used, following the manufacturer's protocol. The product of the fluorimetric reaction proportional to the amount of ROS present after 24 hours of treatment was measured at excitation = 490 and emission = 520 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX).

2.6.2 Nitric oxide (NOx) detection

Nitric oxide is a reactive nitrogen species (RNS) that can react with oxygen species (ROS) and biological molecules [24]. Due to very short half-life, it is difficult to determine it and the end degradation products, the nitrate/nitrite, is most stable to be detected [25]. Thus, we employed a modified Griess method by the reductions of nitrate to nitrite, according to the previous study [26]. with adaptations. Firstly, the Griess reagent was made by the addition of sulphanilamide 2% and N-1-naftiletlenodiamino-bicloridrato (NED) 0,2% on 5% orthophosphoric acid (H_2PO_4) medium. Then, 50 μ L of samples was mixed to 50 μ L of vanadium chloride (VCl_3) at 0.08%, 50 μ L of Griess reagent and incubated for 37°C at 20 min. In principle, sulfanilamide reacts with the nitrite in the sample to form a diazonium salt which reacts with the NED to produce the purple-azo-dye product measured absorbance at 540 nm. An calibration curve was prepared and results were expressed as μ M.

2.6.3 Levels of total thiol (PSH) and non-protein thiol (NPSH)

Both levels of thiols were determined according to Elmann [27] with adaptations. This method consists of the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and measured at 412 nm. For total thiol assay 40 μ L of supernatant was added in 96-well plate to 200 μ L of potassium phosphate buffer (PPB)

(1M, pH 6,8) and 20 μ L of DTNB with immediate reader. Basically, was carried out the same experimental procedure for non-protein thiol, except the samples were deproteinized with added trichloroacetic acid (TCA) at 10% before analysis. The colorimetric results were determined using a cysteine standard curve and expressed as μ M.

2.7 Purinergic system assays

2.7.1 CD39 and CD73 gene expression

Total RNA from melanoma cells was extracted using TRIzol® as per manufacturer's instructions. Quantification of RNA was performed using a Nano-Drop spectrophotometer, and RNA purity was assessed by the 260/280 nm absorbance ratio (Thermo Fisher Scientific). RNA was treated with 0.1 U DNase amplification grade (Invitrogen) for 15 minutes at 27°C, followed by DNase inactivation with 1 μ L of EDTA at 65°C for 10 minutes. Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 500 ng of total RNA with random hexamer primers using an iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were conducted in a CFX384 thermocycler (BioRad) using BRYT Green® dye and Taq DNA polymerase from the GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation) with 12.5 ng of cDNA in a final 10 μ L volume. A common thermal cycling program (initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 30 seconds) was used to amplify each transcript. Melting curve analyses were performed to verify product identity. Samples were run in duplicate and results were expressed relative to GAPDH levels. Data were then normalized to a calibrator sample using the $\Delta\Delta$ Cq method. The forward and reverse sequences of oligos (5'-3') used for each gene were as follows: GAPDH (F): CTCCTCACAGTTGCCATGTA; GAPDH (R): GTTGAGCACAGGGTACTTTATTG; CD39 (F): GCCCTGGTCTTCAGTGTATTAG; CD39 (R): CTGGCATAACCTACTACTCTTTC; CD73 (F): GTGCCTTTGATGAGTCAGGTAG; CD73 (R): TTCCTTTCTCTCGTGTCCCTTG.

2.7.2 Detection of CD39 and CD73 protein expression by flow cytometry

Melanoma cells were maintained in culture flasks until the confluence phase, followed by dissociation using trypsin and were counted immediately in a hemocytometer. Then 1×10^6 cells were centrifuged for 5 minutes at 400g and washed twice with PBS with 10% FBS. The sediments were suspended and incubated for 30 minutes with purified mouse anti-human CD39 and anti-human CD73 antibodies (BD Pharmingen TM) (1:10). The same number of cells was incubated without antibodies (negative control). All samples were washed with PBS, and 10.000 events were immediately acquired by flow cytometry (BD ACCURI C6) and analyzed by FlowJo V10 software. The results were expressed as % of CD39 or

CD73 positive cells relative to control.

2.7.3 Assessment of CD39 and CD73 enzymatic activities

The CD39 and CD73 enzymatic activities were performed according to Pilla et al. [28] and Lunkes et al. [29]. A reaction system for CD39 was prepared containing 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Virtually, the reaction system was the same for E-5'-Nucleotidase, with the exception of 10 mM MgCl₂ instead of CaCl₂. Briefly, cells were initially suspended in saline (NaCl, 0.9%), and 20 µL of samples was added to the reaction mixture of each enzyme and pre-incubated for 37° C at 10 min. The enzymatic reaction was initiated by adding the specific substrates for each enzyme, ATP and ADP for CD39 and AMP for CD73, and incubated for 37°C at 70 minutes. Finally, reactions were stopped by the addition of 150 µL of TCA at 10%. From total well content, 30 µL was transferred for new plate, added 300 µL of malachite green as colorimetric reagent and the released inorganic phosphate was determined at 630 nm. All samples were carried out in triplicates. Control wells were performed to correct for nonenzymatic hydrolysis. A standard curve was prepared with KH₂PO₄ and the results were expressed as nmol of Pi released/min/mg of protein.

2.7.4 Extracellular ATP determination

Molecular Probes® ATP Determination Kit (Invitrogen™) an extremely sensitive bioluminescence assay was used with recombinant firefly luciferase and its substrate D-luciferin. The assay is based on luciferase's requirement for ATP in producing light – emission maximum ~560 nm at pH 7.8 [30]. We combined the components of the reaction as follows in order to make a standard reaction solution and adjust the volumes according to particular requirements. Each reaction contained 1,25 µg/mL of firefly luciferase, 50 µM D-luciferin and 1 mM DTT in 1× Reaction Buffer. After 15 minutes of incubation, luminescence was measured. An ATP standard curve was prepared in concentrations from 1 nM to 1 uM.

2.8 Protein determination

The method of Bradford [31] was employed for protein determination using bovine serum albumin as standard and the protein samples were adjusted according to each assay as mg/mL.

2.9 Statistical analysis

All measurements were statistically performed by analysis of variance followed by the appropriate *post hoc* test using GraphPad Prism 9 software. All data were expressed as mean ± standard deviation. The differences between the groups in relation to the studied variables were evaluated through the analysis

of unpaired t-test and one-way ANOVA. The differences in the probability of rejection of the null hypothesis as being $<5\%$ ($P<0.05$) were considered statistically significant. Statistical significance was defined for p values of $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ and $****P<0.0001$.

3 Results

3.1 Caffeine reduces viability of CM cells

Figure 1 (A-B) shows the viability of CM cells and CCD-1059sk after caffeine treatment. The concentrations 0,5 mM, 2,0 mM, 4,0 mM, 6,0 mM ($P<0.0001$) and 1 mM ($P<0.001$) of caffeine highly reduced the viability of CM cells after 24 hours of treatment compared to CT. All concentrations of caffeine had a higher effect than positive dacarbazine control ($P<0.05$) (Fig. 1A). On the other hand, caffeine had no effect on the viability of CCD-1059sk (Fig. 1B).

The microscopic fluorescence and its respective statistical analyzes of the SK-MEL-28 cells after treatment with caffeine are represented in Figure 1 (C-E). There was a reduction in the fluorescence intensity percentage of cells stained with AO at concentrations of 2,0 mM ($P<0.05$), 4,0 mM and 6,0 mM ($P<0.01$) (Fig. 1C-E) compared to CT. More pronounced results were found with TMRE staining, with reduction of fluorescence intensity percentage at 0,5 mM and 1,0 mM ($P<0.05$), 2,0 mM and 4,0 mM ($P<0.01$), and 6,0 mM ($P<0.001$) in relation to CT (Fig. 1D-E). All this set of results corroborates the effects of caffeine on the viability of melanoma cells found by the MTT and fluorescence microscopy assay.

3.2 Caffeine reduces CM cell migration

Caffeine treatment reduced the SK-MEL-28 cells migration in all concentrations (Fig 1F). The concentrations 1,0 mM, 2,0 mM and 4,0 mM ($P<0.0001$) of treatment exhibits more potential than 0,5 mM ($P<0.001$) compared to CT. As expected, dacarbazine reduced cell migrations, and was similar to 0,5 mM of caffeine ($P<0.001$).

3.3 Higher caffeine concentrations tested increase ROS levels and enhance PSH antioxidant in CM cells

As can be seen in Figure 2, caffeine increased ROS at concentrations of 6,0 mM ($P<0.0001$) (Fig.2A) and PSH at concentrations of 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM in CM cells at 24 hours of treatment ($P<0.05$) (Fig.2C). There were no significant statistical differences to NOx and NPSH when compared to CT (Fig. 2B-D).

3.4 CD39 and CD73 gene expression is modulated by the caffeine in CM cells

We employed qPCR for assessment of CD39 and CD73 gene expression, as shown in Figure 3 (C and F). After 24 hours of treatment, caffeine reduced CD39 gene expression at all tested concentrations, with more pronounced results at 6,0 mM ($P < 0.0001$) (Fig. 3C). Converging with CD39 results, caffeine also was able to reduce expression of the ectonucleotidase CD73 gene, but with statistical significance in the range of 2,0 mM and 4,0 mM ($P < 0.05$), and more evident at 6,0 mM ($P < 0.01$) (Fig. 3F).

3.5 Caffeine modulates the expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases in CM cells

Protein expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases was evaluated by flow cytometry, as shown in Figure 3 (A-B and D-E). As with gene expression, caffeine significantly reduced CD39 protein expression by 2,0 mM ($P < 0.0001$), 4,0 mM ($P < 0.05$) and 6,0 mM ($P < 0.0001$) (Fig. A-B). Similar results were found for CD73 protein expression, with reduced levels at 0,5 mM, 2,0 mM, and 4,0 mM ($P < 0.0001$). Thus, it is clear that caffeine has potential in modulating gene and protein expression of important ectonucleotidases involved in purinergic signaling.

3.6 Caffeine modulates CD39 and CD73 enzymatic activities in CM cells

Figure 4 (A-C) shows CD39 and CD73 activity, and extracellular ATP levels are shown in Figure 4 (D). In our study, ATP hydrolysis was decreased at concentrations of 1 mM ($P < 0.05$), 2 and 4 mM ($P < 0.0001$), and 6 mM ($P < 0.001$) compared to CT (Fig. 4A). ADP hydrolysis was increased at 0.5 mM ($P < 0.001$) and greatly decreased at ranges of 1,0-6,0 mM ($P < 0.0001$) of caffeine treatment when compared to CT (Fig. 4B). In addition, AMP hydrolysis at 1,0 mM, 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM of caffeine treatment was highly decreased in relation to CT ($P < 0.0001$) (Fig. 4C). Lastly, at the 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM concentrations of treatment caffeine had increased extracellular ATP levels ($P < 0.0001$) (Fig. 4D). All these presented results confirm the action of caffeine in decreasing the hydrolytic activity of ectonucleotidases in CM cells and in shifting the purinergic cascade towards increased levels of extracellular ATP.

4 Discussion

CM in stages III and IV still have poor prognosis, despite the development of targeted drugs and immune checkpoint modulators (63% to 68% and 22% to 30% survival rates in 5 years, respectively) [32]. Studies carried out by Lentini et al. [33], Gude et al. [34], Wrześniok et al. [19] and Tabolacci et al. [35] using other melanoma cell lineages found caffeine antineoplastic potential. Furthermore, Fagundes et al. [36] showed that low concentrations of this compound were able to potentiate the effect of

dacarbazine. Therefore, we searched for the antineoplastic effects of caffeine on SK-MEL-28 metastatic melanoma cells and the possible cellular pathway involved in this process.

Following a methodological approach, we first evaluated cell viability using the MTT assay and parallel fluorescence microscopy staining with AO and TMRE. In an unprecedented way, we found that caffeine highly decreased SK-MEL-28 viability cells in all tested concentrations when compared to CT, a superior effect to antineoplastics dacarbazine. Both in AO and TMRE staining, caffeine reduced fluorescence intensity percentage, confirming the results found with MTT assay. A study *in vitro* that used very similar substance concentrations just like us, found that caffeine, by decreasing HDAC1 activity and/or by increasing p300 activity, significantly decreased RT2 glioma cells viability after 48 hours of treatment [37]. Cheng et al. [38] also showed that, via cathepsin B and MAPK signaling, treatment with caffeine reduced viability of the glioma cell lineages U-87MG, LN229 and GBM8401. Using Mel1 and Mel3 melanoma cells, Tabolacci et al. [35] proved that increased significantly reduced cell proliferation after 2 mM of caffeine concentration in a dose-dependent manner. In parallel, we also performed a cell viability assay to evaluate the cytotoxic effect of caffeine on non-neoplastic cells using CCD-1059sk as a model. However, in our study, caffeine had no shown cytotoxic effect on non-tumoral cells.

Another important parameter related to melanoma is the metastasis, which is a complex biological process that involves cell migration and colonization of adjacent sites [39]. For that to happen, cells adhere to extracellular matrix (ECM) or other cells, there being specific binding of cell adhesion molecules such as selectins, integrins, and cadherins to ECM ligands or on other cells [40]. Methods to study cell migration, such as wound-healing scratch assay, are very useful research tools [23]. Thus, we searched to assess the effects of caffeine on cell migration and found that all concentrations of treatment were capable of reducing the migration of SK-MEL-28 cells. In addition, at high concentrations, caffeine also modifies the cell morphology. In a study which used a combination between atorvastatin and caffeine, Wang et al. [17] found reductions in prostate cancer cell migration. Another study confirmed that caffeine inhibits NCI-H23 cell migration, a mechanism involved in metastasis in lung cancer [41].

Since SK-MEL-28 cells treated with caffeine had reduction of viability and migration, we searched for some plausible biochemical cell pathways that lead to. In this context, although associated with toxicity and virtually does not contribute to increasing the overall survival of patients with stage IV CM, dacarbazine is one of the main drugs used in the treatment of melanoma metastases, since its approval by the Food and Drug Administration in 1975 [42]. The overproduction of ROS is one of mechanisms involved in the cytotoxic effect of this antineoplastic [43,44]. Similarly, this aforementioned mechanism also was linked with caffeine cytotoxicity potential in metastatic cutaneous melanoma cells, in which,

in other CM cell lineages treated with this substance, there were an increase in lipid peroxidation and depletion in glutathione levels, and led to DNA damage with induced cell death [19,36,45,46]. For this reason, we evaluated the oxidative biomarkers ROS and NO_x levels in SK-MEL-28 cells treated with caffeine and found no statistically significant differences compared to CT. On the other hand, PSH levels increased at tested high concentrations of caffeine within 24 hours of treatment. Thus, we infer that the mechanism of action of caffeine in reducing the viability and migration of melanoma cells is not a result of oxidative stress.

Although we have not been successful with oxidative stress biomarkers, we carried on searching for a possible cell pathway to explain the caffeine antineoplastic effect on melanoma cells. In this sense, a study performed by Eini et al. [18] showed that caffeine has potential to modulate the purinergic system. This extracellular cell-cell signaling pathway is an ubiquitous system considered a therapeutic-target to be used in the treatment of CM and play a role in regulating numerous physiological and pathological processes in mammals [47]. Research showed ectonucleotidases, specifically CD39 and CD73, have critical functioning of the purinergic cascade, regulating nucleotides and nucleoside on TME of melanoma [48-50]. We evaluated gene and protein expression of CD39 and CD73, as well as their enzymatic activity after treatment of CM cells with caffeine. Interestingly, we found that caffeine strongly decreased the expression of CD39 and CD73 genes and proteins and, consequently, activity in nucleotide breakdown. It is important to emphasize that this enzymatic axis is responsible for regulating the amount of extracellular ATP in the purinergic cascade.

In this sense, high ATP levels in TME would be more available to exert agonistic action on P2X receptors since it is the preferred molecule agonist for these receptors type [51]. Among them, P2X7 receptors are overexpressed in neoplastic cell membranes [52]. In melanoma, high concentration of ATP can lead to cell death by activating the P2X7 receptors that are involved with mTOR signaling [53]. Considering that our results showed that the purinergic cascade was displaced towards increasing ATP, in order to verify, we measured the extracellular ATP levels by a sensitive assay. We found high levels of extracellular ATP in the same caffeine concentrations where CD39 and CD73 genic, protein, and hydrolytic activity was decreased, confirming that caffeine modulates the purinergic signaling in SK-MEL-28 melanoma cells, specifically on the CD39/CD73 axis.

One of the main concerns in the development of anticancer therapies is that in addition to blocking ATP hydrolysis for a complete response, it would be necessary to block adenosine receptors, mainly A2A [54]. In this context, Eini et al. [18] demonstrated that caffeine is capable of antagonizing adenosine receptors and promoting an effective antitumor immune response, making caffeine an excellent option in the treatment of metastatic CM. Considering the evidence presented and the results of the present study, caffeine seems to be an important compound to be widely studied, as it modulating purinergic

signaling both by the CD39/CD73 axis, which controls the levels of extracellular ATP, and by the antagonism effect on A_{2A} receptors.

5 Conclusion

For the first time we have shown that caffeine is able to reduce CM cells viability and migration. Furthermore, caffeine downregulates the ectonucleotidases CD39 and CD73 gene and protein expression, and, consequently enzymatic activity in nucleotides ATP, ADP and AMP hydrolysis, which results in a displacement of CD39/CD73 axis toward extracellular ATP increasing. Thus, high levels of ATP in the TME are available to act as an agonist at P2X receptors and induce cell death. Therefore, caffeine is an option for use in clinical trials with the CD39/CD73 axis as a therapeutic target, either singly or as an adjuvant to another therapeutic agent.

Funding: this study is funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (MDB), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) (MDB). MDB is 2 CNPq Research Fellow. DM and GBS are thankful Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior for the scholarships.

Author contributions:

Conceptualization: DM, GBS, JL, JC, MDB, MM.

Methodology: DM and GBS.

Investigation: DM, GBS, JL, JC, PD and RAN.

Visualization: DM, GBS, JL, JC, PD, RAN, MDB, MM.

Funding acquisition: MDB and MM.

Project administration: MDB and MM.

Supervision: MDB and MM.

Writing – original draft: DM and GBS.

Writing – review, and editing: DM and GBS.

All authors reviewed and approved the final version.

Data and materials availability: All data are available in the main text or supplementary materials.

Conflict of interests: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Ethics approval: Not applicable.

Consent to participate: Not applicable.

Consent to publish: Not applicable.

References

- [1] L. E. Paddock, S. E. Lu, E. V. Bandera, G. G. Rhoads, J. Fine, S. Paine, R. Barnhill, and M. Berwick, Skin self-examination and long-term melanoma survival. *Melanoma Research* **26**, 401 (2016).
- [2] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray, in *GLOBOCAN 2020, Global Cancer Observatory: Cancer Today*, [Internet]. Lyon, International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>. Accessed 02 October 2022.
- [3] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* **71**, 209 (2021).
- [4] S. Carr, C. Smith, and J. Wernberg, Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surgical Clinics of North America* **100**, 1 (2020).
- [5] S. J. O'Day, O. Hamid, and W. J. Urba, Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer* **110**, 2614 (2007).
- [6] K. T. Flaherty, C. Robert, P. Hersey, P. Nathan, C. Garbe, M. Milhem, L. V. Demidov, J. C. Hassel, P. Rutkowski, P. Mohr, R. Dummer, U. Trefzer, J. M. G. Larkin, J. Utikal, B. Dreno, M. Nyakas, M. R. Middleton, J. C. Becker, M. Casey, L. J. Sherman, F. S. Wu, D. Ouellet, A.-M. Martin, K. Patel, and D. Schadendorf, Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* **367**, 107 (2012).
- [7] C. Robert, J. Schachter, G. V. Long, A. Arance, J. J. Grob, L. Mortier, A. Daud, M. S. Carlino, C. McNeil, M. Lotem, J. Larkin, P. Lorigan, B. Neyns, C. U. Blank, O. Hamid, C. Mateus, R. Shapira-Frommer, M. Kosh, H. Zhou, N. Ibrahim, S. Ebbinghaus, and A. Ribas, Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **372**, 2521 (2015).
- [8] F. S. Hodi, S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. M. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbé, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos, and W. J. Urba, Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711 (2010).
- [9] Z. Gao, K. Dong, and H. Zhang, The Roles of CD73 in Cancer. *BioMed Research International* **2014**, 1 (2014).
- [10] D. Ferrari, F. Malavasi, and L. Antonioli, A Purinergic Trail for Metastases. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 277 (2017).
- [11] F. Di Virgilio, A. C. Sarti, S. Falzoni, E. De Marchi, and E. Adinolfi, Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* **18**, 601 (2018).
- [12] A. Mânica, B. da Silva Rosa Bonadiman, A. M. Cardoso, A. Paiz, C. Siepko, J. V. G. de Souza, M. Moreno, A. Moreno, M. R. C. Schetinger, V. M. Morsch, and M. D. Bagatini, The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. *Cellular Signalling* **59**, 122 (2019).
- [13] G. B. da Silva, M. A. Yamauchi, D. Zanini, and M. D. Bagatini, Novel possibility for cutaneous melanoma treatment by means of rosmarinic acid action on purinergic signaling. *Purinergic Signalling* **18**, 61 (2022).

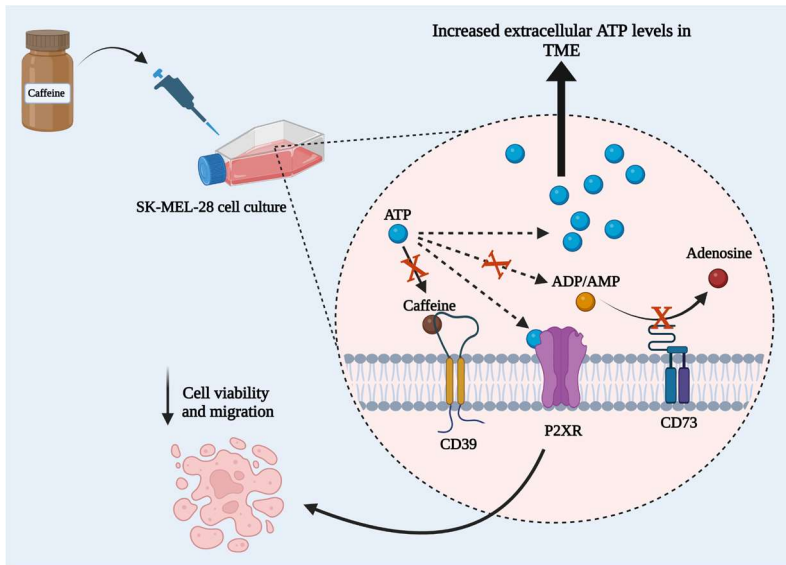
- [14] L. P. Pelinson, C. E. Assmann, T. V. Palma, I. B. M. da Cruz, M. M. Pillat, A. Mânica, N. Stefanello, G. C. C. Weis, A. de Oliveira Alves, C. M. de Andrade, H. Ulrich, V. M. M. Morsch, M. R. C. Schetinger, and M. D. Bagatini, Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. *Mol Biol Rep* **46**, 2085 (2019).
- [15] H. Ashihara, H. Sano, and A. Crozier, Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* **69**, 841 (2008).
- [16] S. Miwa, N. Sugimoto, N. Yamamoto, T. Shirai, H. Nishida, K. Hayashi, H. Kimura, A. Takeuchi, K. Igarashi, A. Yachie, and H. Tsuchiya, Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF- κ B and MAPK pathways. *Anticancer Res* **32**, 3643 (2012).
- [17] Z. Wang, L. Zhang, Z. Wan, Y. He, H. Huang, H. Xiang, X. Wu, K. Zhang, Y. Liu, S. Goodin, Z. Du, and X. Zheng, Atorvastatin and Caffeine in Combination Regulates Apoptosis, Migration, Invasion and Tumorspheres of Prostate Cancer Cells. *Pathol. Oncol. Res.* **26**, 209 (2020).
- [18] H. Eini, V. Frishman, R. Yulzari, L. Kachko, E. C. Lewis, C. Chaimovitz, and A. Douvdevani, Caffeine promotes anti-tumor immune response during tumor initiation: Involvement of the adenosine A2A receptor. *Biochemical Pharmacology* **98**, 110 (2015).
- [19] D. Wrzeńskiok, Z. Rzepka, M. Respondek, A. Beberok, J. Rok, K. Szczepanik, and E. Buszman, Caffeine modulates growth and vitality of human melanotic COLO829 and amelanotic C32 melanoma cells: Preliminary findings. *Food and Chemical Toxicology* **120**, 566 (2018).
- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55 (1983).
- [21] A. J. McGahon, S. J. Martin, R. P. Bissonnette, A. Mahboubi, Y. Shi, R. J. Mogil, W. K. Nishioka, and D. R. Green, Chapter 9 The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro in *Methods in Cell Biology*, edited by L. M. Schwartz and B. A. Osborne (Academic Press, 1995), pp. 153–185.
- [22] D. C. Joshi and J. C. Bakowska, Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. *JoVE* 2704 (2011).
- [23] C. R. Justus, N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria, and L. V. Yang, In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *JoVE* 51046 (2014).
- [24] F. Romitelli, S. A. Santini, E. Chierici, D. Pitocco, B. Tavazzi, A. M. Amorini, G. Lazzarino, and E. Di Stasio, Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *Journal of Chromatography B* **851**, 257 (2007).
- [25] S. Zahedi Asl, A. Ghasemi, and F. Azizi, Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clinical Biochemistry* **41**, 1342 (2008).
- [26] E. Tatsch, G. V. Bochi, R. da S. Pereira, H. Kober, V. A. Agertt, M. M. Anraku de Campos, P. Gomes, M. M. M. F. Duarte, and R. N. Moresco, A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clinical Biochemistry* **44**, 348 (2011).

- [27] G. L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**, 70 (1959).
- [28] C. Pilla, T. Emanuelli, S. S. Frassetto, A. M. O. Battastini, R. D. Dias, and J. J. F. Sarkis, ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* **7**, 225 (1996).
- [29] G. I. Lunkes, D. Lunkes, F. Stefanello, A. Morsch, V. M. Morsch, C. M. Mazzanti, and M. R. C. Schetinger, Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research* **109**, 189 (2003).
- [30] S. Karamohamed and G. Guidotti, Bioluminometric method for real-time detection of ATPase activity. *BioTechniques* **31**, 420 (2001).
- [31] M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248 (1976).
- [32] R. Miller, S. Walker, I. Shui, A. Brandtmüller, K. Cadwell, and E. Scherrer, Epidemiology and survival outcomes in stages II and III cutaneous melanoma: a systematic review. *Melanoma Management* **7**, MMT39 (2020).
- [33] A. Lentini, H. K. Kleinman, P. Mattioli, V. Autuori-Pezzoli, L. Nicoli, A. Pietrini, A. Abbruzzese, M. Cardinali, and S. Beninati, Inhibition of melanoma pulmonary metastasis by methylxanthines due to decreased invasion and proliferation. *Melanoma Research* **8**, 131 (1998).
- [34] R. P. Gude, L. G. Menon, and S. G. Rao, Effect of Caffeine, a xanthine derivative, in the inhibition of experimental lung metastasis induced by B16F10 melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **20**, 287 (2001).
- [35] Tabolacci, M. Cordella, S. Rossi, M. Bonaccio, A. Eramo, C. Mischiati, S. Beninati, L. Iacoviello, A. Facchiano, and F. Facchiano, Targeting Melanoma-Initiating Cells by Caffeine: In Silico and In Vitro Approaches. *Molecules* **26**, 3619 (2021).
- [36] T. R. Fagundes, T. B. Madeira, G. P. Melo, H. P. Bordini, P. C. Marinello, S. L. Nixdorf, A. L. Cecchini, and R. C. Luiz, Caffeine improves the cytotoxic effect of dacarbazine on B16F10 murine melanoma cells. *Bioorganic Chemistry* **120**, 105576 (2022).
- [37] J.-C. Chen and J.-H. Hwang, Effects of caffeine on cell viability and activity of histone deacetylase 1 and histone acetyltransferase in glioma cells. *Tzu Chi Medical Journal* **28**, 103 (2016).
- [38] Y.-C. Cheng, Y.-M. Ding, D.-Y. Hueng, J.-Y. Chen, and Y. Chen, Caffeine suppresses the progression of human glioblastoma via cathepsin B and MAPK signaling pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **33**, 63 (2016).
- [39] S. Valastyan and R. A. Weinberg, Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **147**, 275 (2011).
- [40] X. Trepat, Z. Chen, and K. Jacobson, Cell Migration in *Comprehensive Physiology*, edited by R. Terjung, 1st ed. (Wiley, 2012), pp. 2369–2392.
- [41] P. Meisaprow, N. Aksorn, C. Vinayanuwattikun, P. Chanvorachote, and M. Sukprasansap, Caffeine Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest and Inhibits Migration through Integrin α_v , β_3 , and FAK/Akt/c-Myc Signaling Pathway. *Molecules* **26**, 7659 (2021).

- [42] S. Bhatia, S. S. Tykodi, S. M. Lee, and J. A. Thompson, Systemic therapy of metastatic melanoma: on the road to cure. *Oncology (Williston Park)* **29**, 126 (2015).
- [43] J. Pourahmad, M. Amirmostofian, F. Kobarfard, and J. Shahraki, Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**, 89 (2009).
- [44] M. Amirmostofian, J. Pourahmad Jaktaji, Z. Soleimani, K. Tabib, F. Tanbakosazan, M. Omrani, and F. Kobarfard, Synthesis and Molecular-cellular Mechanistic Study of Pyridine Derivative of Dacarbazine. *Iran J Pharm Res* **12**, 255 (2013).
- [45] V. Shukla and R. P. Gude, Potentiation of Lipid Peroxidation in B16F10 and B16F1 Melanoma Cells by Caffeine, a Methylxanthine Derivative: Relationship to Intracellular Glutathione. *Chemotherapy* **49**, 71 (2003).
- [46] S. Caini, G. Masala, C. Saieva, M. Kvaskoff, I. Savoye, C. Sacerdote, O. Hemmingsson, B. Hammer Bech, K. Overvad, A. Tjønneland, K. E. N. Petersen, F. R. Mancini, M.-C. Boutron-Ruault, I. Cervenka, R. Kaaks, T. Kühn, H. Boeing, A. Floegel, A. Trichopoulou, E. Valanou, M. Kritikou, G. Tagliabue, S. Panico, R. Tumino, H. B. Bueno-de-Mesquita, P. H. Peeters, M. B. Veierød, R. Ghiasvand, M. Lukic, J. R. Quirós, M.-D. Chirlaque, E. Ardanaz, E. Salamanca Fernández, N. Larrañaga, R. Zamora-Ros, L. Maria Nilsson, I. Ljuslinder, K. Jirström, E. Sonestedt, T. J. Key, N. Wareham, K.-T. Khaw, M. Gunter, I. Huybrechts, N. Murphy, K. K. Tsilidis, E. Weiderpass, and D. Palli, Coffee, tea and melanoma risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: Coffee, tea and melanoma risk. *Int. J. Cancer* **140**, 2246 (2017).
- [47] G. Burnstock, The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* **36**, 1127 (1997).
- [48] A. Young, S. F. Ngiow, D. S. Barkauskas, E. Sult, C. Hay, S. J. Blake, Q. Huang, J. Liu, K. Takeda, M. W. L. Teng, K. Sachsenmeier, and M. J. Smyth, Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* **30**, 391 (2016).
- [49] A. Soleimani, H. K. Farshchi, F. Mirzavi, P. Zamani, A. Ghaderi, Y. Amini, S. Khorrami, K. Mashayekhi, and M. R. Jaafari, The therapeutic potential of targeting CD73 and CD73-derived adenosine in melanoma. *Biochimie* **176**, 21 (2020).
- [50] M. D. Bagatini, K. Bertolin, A. Bridi, L. P. Pelinson, B. da Silva Rosa Bonadiman, M. M. Pillat, P. B. D. Gonçalves, H. Ulrich, M. R. C. Schetinger, and V. M. Morsch, 1α , 25-Dihydroxyvitamin D3 alters ectonucleotidase expression and activity in human cutaneous melanoma cells. *J of Cellular Biochemistry* **120**, 9992 (2019).
- [51] K. A. Jacobson and C. E. Müller, Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology* **104**, 31 (2016).
- [52] E. Adinolfi, A. L. Giuliani, E. De Marchi, A. Pegoraro, E. Orioli, and F. Di Virgilio, The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochemical Pharmacology* **151**, 234 (2018).
- [53] S. Bian, X. Sun, A. Bai, C. Zhang, L. Li, K. Enjyoji, W. G. Junger, S. C. Robson, and Y. Wu, P2X7 Integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR Signaling Pathways to Mediate Tumor Cell Death. *PLoS ONE* **8**, e60184 (2013).

[54] O. Kepp, L. Bezu, T. Yamazaki, F. Di Virgilio, M. J. Smyth, G. Kroemer, and L. Galluzzi, ATP and cancer immunosurveillance. *EMBO J* **40**, (2021).

Figure captions



Graphical Abstract - Fonte: elaborada pelos Autores (2022)

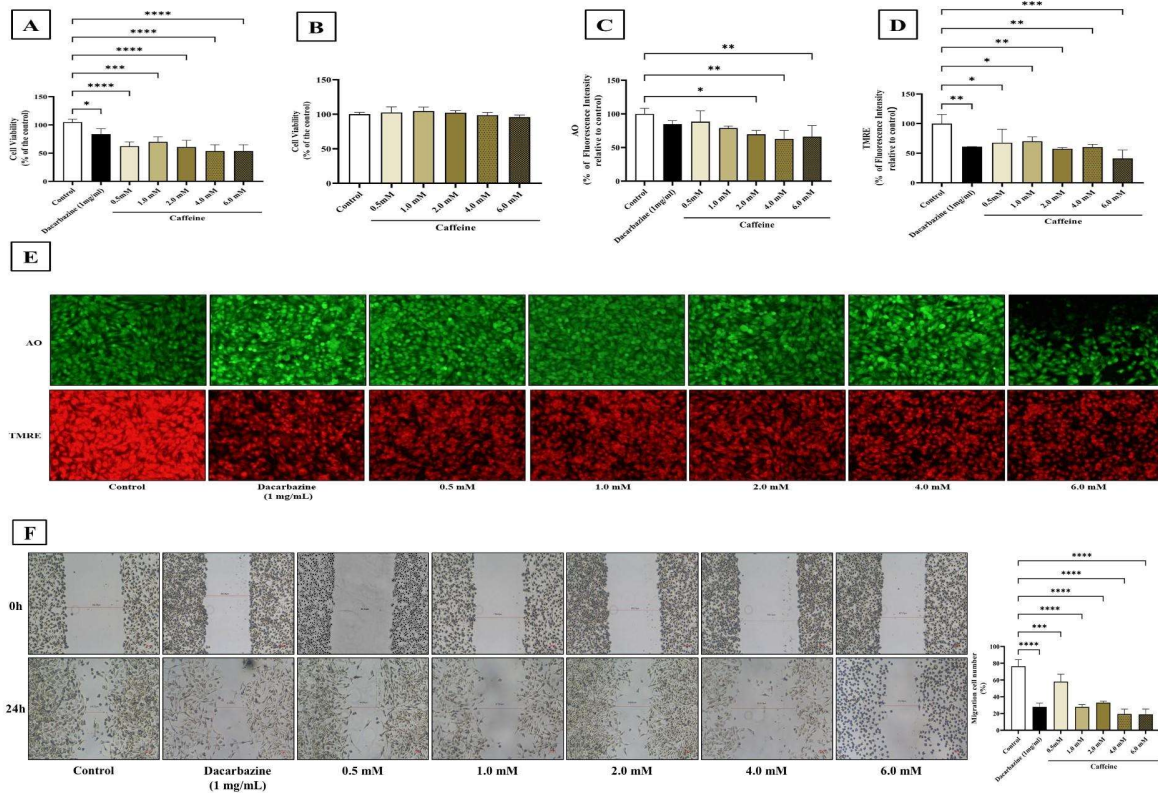


Fig. 1 - Cell viability and migration of CM cells and cell viability of CCD-1059sk treated with caffeine. MTT assay indicated that all concentrations of caffeine treatment highly reduced the viability of CM cells (A), while had no effect on non-tumoral cells CCD-1059sk (B). Microscopy fluorescence assay stained with acridine orange (AO) showed that caffeine reduced cell viability at 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM (C-E), and in all tested concentrations of caffeine when stained with tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) (D-E). For cell migration, caffeine had a high effect in reductions of wound-healing closure (F). Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis: ANOVA. Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant. $*$ ($P < 0.05$) $**$ ($P < 0.01$) $***$ ($P < 0.001$) $****$ ($P < 0.0001$).

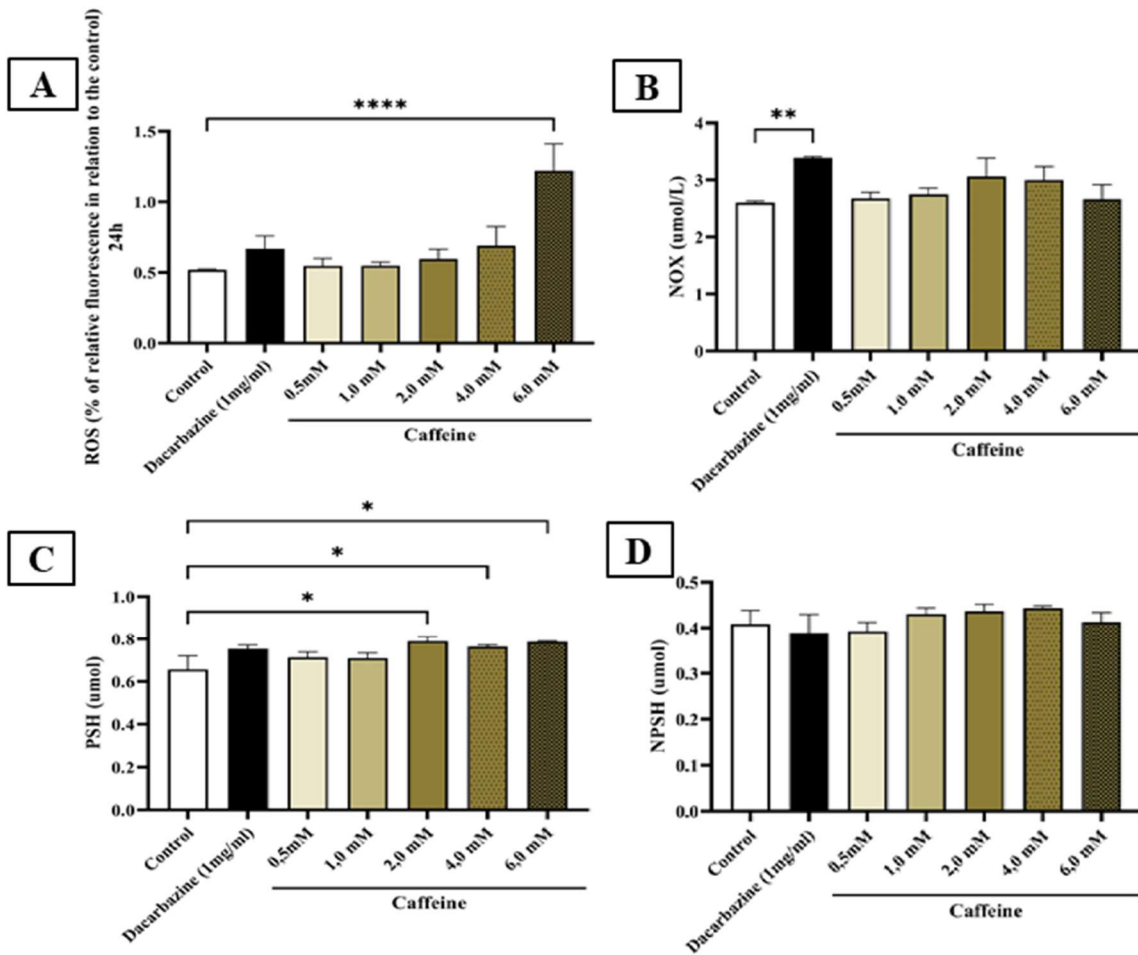


Fig. 2 - Oxidative stress marker levels in CM cells. Caffeine increased ROS levels at 6,0 mM (A) and PSH levels at 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM (C). There was no statistical significance for NOx (B) and NPSH (D) levels. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis: ANOVA. Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant. *($P < 0.05$) **($P < 0.01$) ***($P < 0.001$) ****($P < 0.0001$).

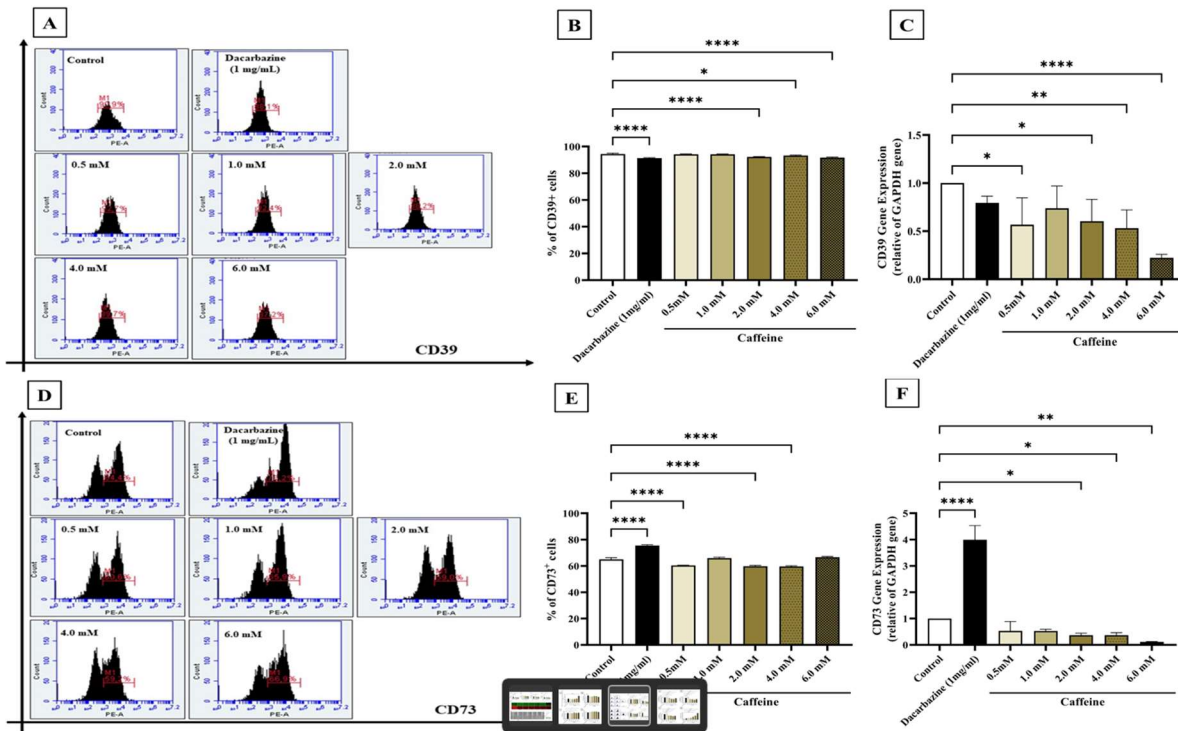


Fig. 3 - CD39 and CD73 gene and protein expression. All tested concentrations of caffeine were able to reduce CD39 gene expression (C). In the same way, CD39 protein expression was reduced at 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM concentrations (A-B). For CD73, it is possible to notice that caffeine treatment reduced gene expression at 2,0 mM, 4,0 mM, and 6,0 mM (F), and protein expression at 0,5 mM, 2,0 mM, and 4,0 mM (D-E). Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis: ANOVA. Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant. $*$ ($P < 0.05$) $**$ ($P < 0.01$) $***$ ($P < 0.001$) $****$ ($P < 0.0001$).

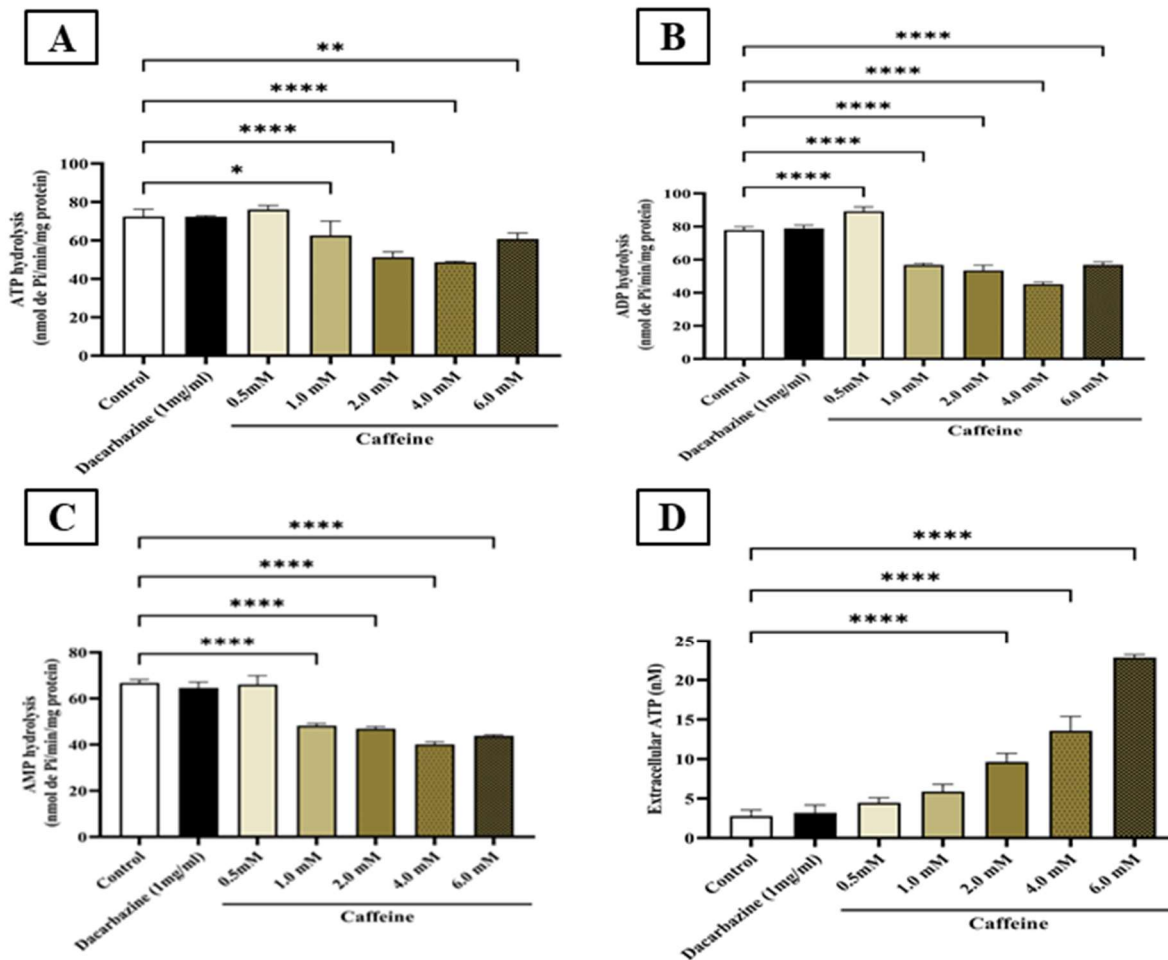


Fig. 4 - CD39 activity was measured by ATP and ADP hydrolysis, while CD73 activity was measured by hydrolysis. Extracellular ATP levels were assessed by sensitive bioluminescent assay. In the range of 0,5 to 6,0 mM of caffeine, the treatment reduced ATP hydrolysis (A). ADP nucleotide hydrolysis (B) increased by 0,5 mM and decreased by 1,0 to 6,0 mM. AMP hydrolysis after 24 hours of caffeine treatment was also reduced in the range of 1,0 to 6,0 mM (C). Extracellular ATP levels were increased at 2,0 mM, 4,0 mM and 6,0 mM concentrations (D). Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis: ANOVA. Values with $P < 0.05$ were considered statistically significant. $*(P < 0.05)$ $ (P < 0.01)$ $*** (P < 0.001)$ $**** (P < 0.0001)$.**

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que a cafeína, em diferentes concentrações é capaz de reduzir a migração de células SK-MEL-28, e em altas concentrações, a cafeína também diminui a viabilidade celular. A cafeína foi capaz de modular a atividade e expressão das enzimas CD39 e CD73, demonstrando que a cafeína é potencialmente promissora como coadjuvante terapêutico.

6. REFERÊNCIAS

01. ALHOWAIL, A. Candidate mechanisms of caffeine improving memory dysfunction. **Pharmazie**, v. 74, n. 12, p. 705–710, 2019.
02. AZ, A.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum Nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clin Biochem**, p. 1342–1347, 2008.
03. BARTOLONE, L.; PAPPALARDO, M. A. Altered intestinal absorption of L-thyroxine caused by coffee. **Thyroid**. V, v. 18, n. 3, p. 293–301, 2008.
04. BATISTA, Franciele & Suzuki, Vanessa & Sapag, Isabela & Leite, Jorge & Fernandes, Paola & Oliveira, Carlos & Gomes, Heitor & Ferreira, Lydia. Consumo de café na prevenção do melanoma: uma revisão (Coffee consumption in the prevention of melanoma: a review). 1. 49-55. 10.47693/and.v1i1.8.2020.
05. Beginnings Of a Good Apoptotic Meal: The Find-Mean fEat-MeSignaling Pathways. **Immunity**.v, v. 35, n. 4, p. 445–455, 2011.
06. BELAYNEH, A.; MOLLA, F. The Effect of Coffee on Pharmacokinetic Properties of Drugs : A Review. **Biomed Res Int**, v. 2020, 2020.
07. CAINI, S. et al. Coffee, tea and melanoma risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: Coffee, tea and melanoma risk. **Int. J. Cancer**, v. 140, 2017.
08. CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **Sur-gical Clinics of North America**, v. 100, 2020.
09. CHAMBER, B. A., & Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**. Janeiro de, 5(1), 65–72.
10. CHOI, S.; JUNG, S.; KO, K. S. Effects of Coffee extracts with Different Roasting Degreeseon Antioxidant dAnti-Inflammatory Systems in Mice. **Nutrients**, n. 10, 2018.
11. Colombino, M., Capone, M., Lissia, A., Cossu, A., Rubino, C., & Giorgi, D. ([s.d.]). BRAF/NRAS Mutation Frequencies Among Primary Tumors and Metastases in Patients With Melanoma. **JCO**, 30, 2522–2529.
12. CS, S. et al. Role of oxidative stress and antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. **Int J Dermatol**. V, v. 43, n. 5, p. 326–335, 2004.
13. DE MARIA, Y.; YANAÊ, GOMIDE, L. M. Cafeína e Café: A dualidade entre seus efeitos tóxicos e antioxidantes. **Revista InterSaúde**, p. 73–85, 2019.

14. Devita, V. T., & Chu, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. **Cancer Res.** 1o de novembro de, 68(21), 8643–8653.
15. DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v. 97, n. 3, p. 587–600, 2001.
16. FORTES, C. Are anti-inflammatory foods associated with a protective effect for cutaneous melanoma? **Eur J CancerPrev.**v, v. 29, n. 5, p. 466–469, 2020.
17. Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., & Milhem, M. (2012). Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. **N Engl J Med.** 12 de julho de, 367(2), 107–114.
18. FREDHOLM, B. B. et al. Actions Of Caffeine in the Brain With Special Reference To Factors That Contributeto Its Widespread Use. **Pharmacological Reviews**, p. 83–133, 1999.
19. GUPTA, S.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. (EDS.). O componente epigalocatequina-3-galato do chá verde inibe seletivamente a COX-2 sem afetar a expressão de COX-1 em células de carcinoma da próstata humana. [S.l.] **Int. J. Cancer**, 2004. v. 113
20. HAN, W.; MING, M.; HE, Y. Y. Caffeine Promotes Ultraviolet B-induced Apoptosis in Human Keratinocytes without complete DNA Repair. **J Biol Chem.**, v, v. 286, p. 22825–22832, 2011.
21. HUANG, M. T. et al. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. **Cancer research**, v. 57, n. 13, p. 2623–2629, 1997.
22. Kalbasi, A., & Ribas, A. (2020). Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. **Nat Rev Immunol.** Janeiro de, 20(1), 25–39.
23. KIURU, M.; BUSAM, K. J. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. Laboratory investigation; **a journal of technical methods and pathology**, v. 97, n. 2, p. 146–157, 2017.
24. KT FLAHERTY, C. et al. Sobrevida aprimorada com inibição de MEK em melanoma com mutação BRAF. **N Engl J Med**, v. 367, 2012.
25. Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. **Science**, 271, 1734–1736.
26. LEB, S. F. C. E. Radiação ultravioleta e carcinogênese. Campinas: **Rev. Ciênc. Méd**, 2007.

27. LEFTFIELD, E. et al. Coffee drinking and cutaneous melanoma risk in the NIH-AARP diet and health study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 2, 2015.
28. LINDEN, J.; KOCH-NOLTE, F.; DAHL, G. Purine Release, Metabolism, and Signaling in the 65 Inflammatory Response. **Annual Review of Immunology**, v. 37, p. 325–347, 2019.
29. LU YC, YEH WC, OHASHI PS. LPS/TLR (ED). Signal transduction pathway. [S.l.] **Cytokine**.v., [s.d.]. v. 42.2007.
30. LUKE, J. J. et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. Nature reviews. **Clinical oncology**, v. 14, n. 8, p. 463–482, 2017.
31. MACIEL, R. et al. Neuro protective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic rats: Role of ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 559–568, 2016.
32. Aline; Lang, Maria Teresa Granella. Relationship between the development of cutaneous melanoma and oxidative stress. Artigo em Português | **LILACS**, v. 49, n. 1, p. 22–25, 2017.
33. Mackintosh, C., Yuan, C., & Ou, F. S. (2020). Associação da ingestão de café com a sobrevida em pacientes com câncer colorretal avançado ou metastático. *JAMA On-col*, 6(11), 1713–1721. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.3938>
34. MATTEDI, A. P. et al. An estimate of the cost of treating melanoma disease in the state of Sao Paulo - Brazil. *An Bras Dermatol*. V, v. 84, n. 3, p. 237–243, 2009.
35. METRO, D. et al. Beneficial effects of oral pure caffeine on oxidative stress. **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, n. 10, p. 22–27, 2017.
36. MEISAPROW, N. AKSOM, C. VINAYANUWATTIKUN, P. CHANVORACHOTE e M. SUKPRASANSAP, A cafeína induz a interrupção do ciclo celular G0/G1 e inibe a migração por meio da sinalização integrina α_v , β_3 e FAK/Akt/c-Myc **Caminho. Moléculas** 26, 7659 .2021.
37. MILLER AJ, M. M. C. (ED.). Melanoma. [S.l.] **Engl J Med**, 6 de julho de 2006. v. 355.
38. Miller AJ, M. M. C. (Org.). (6 de julho de 2006). Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 6 de julho de 2006;355(1):51–65 (Vol. 355, Número 1). **N Engl J Med**.
39. MIN, Y.-D. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1. **human stelline**. v. 56, p. 210–215, 2007.

40. MOREIRA, A. et al. Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immuno-therapy. **Immunotherapy**, v. 9, n. 2, p. 115–121, 2017.
41. Nakamura, Y. (2019). Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Tumor Response and Adverse Events. **Front Med**. 29 de maio de, 6.
42. NEVES DE OLIVEIRA, B. H.; DALMAZ, C.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F. Network-Based Identification of Altered Stem Cell Pluripotency and Calcium Signaling Pathways in Metastatic Mela-noma. **Med Sci (Basel)**, v. 6, n. 1, 2018.
43. Notícias Embrapa - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64630822/producao-dos-cafes-do-brasil>.Acesso>. Acesso em: 17 fev. 2023.
44. Orloff, M., Weight, R., Valsecchi, E., & Sato, M. (2016). Immune Check Point Inhibitors Combination in Melanoma: Worth the Toxicity? **RRCT**. 1o de maio de, 11, 81–86.
45. OSSAMA, MILLER, D. D.; BHAWAN, J. Melanoma maligno cutâneo: atualização em biomarcadores diagnósticos e prognósticos. **The American Journal of Dermatopathology**, p. 363–379, 2014.
46. PARK C.-S., F.-P. R.; PARK, Y. (EDS.). Mecanismos de ação dos componentes bioativos do café no metabolismo lipídico. [s.l.] Ciência Alimentar. **Biotecnologia**, 2019. v. 28.
47. ROK, J. The role of MITF and Mcl-1 proteins in the antiproliferative and proapoptotic effect of ciprofloxacin in amelanotic melanoma cells: In silico and in vitro study. **Toxicol In Vitro**. v, v. 66, 2020.
48. Orloff M, Weight R, E. Valsecchi M, Sato T. Immune Check Point Inhibitors Combination in Melanoma: Worth the Toxicity? **RRCT**.v.11(2):81–6. 1o de maio de 2016.
49. ROSENDAHL, A. H. Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor (ER) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) levels in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**, 2015.
50. RZEPKA Z, R. M. Caffeine Modulates growth vitality of human melanotic COLO829 and amelanotic C32 melanoma cells: **Preliminary**. [s.l: s.n.].
51. SANTINI AS, C. E.; TAVAZZIB, A. Comparison Nitrate/nitrite concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess Assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of a correct removal of proteins in the Griess assay. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, p. 257–267, 2007.
52. SAWYNOK, J. Caffeine And Pain. **Pain**. [s.l: s.n.].2010.
53. SILVA, D. A.; GUTKNECHT, J. L. **Congresso Internacional em Saúde**. [s.l: s.n.].2021.

54. SIEGEL, R. L. et al. Issue 1Jan 2020Pagesi. **Cancer Journal for Clinicians**.Volume, v. 70, p. 1–70, [s.d.].2020.
55. SK; TONIAL, E.; BOGO, M. R.; BONAN, C. D. Profile of Nucleotide Catabolism and Ectonucleotidase Expression from the Hippocampi of Neonatal Rats After Caffeine Exposure. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 23–30, 2012.
56. TANAKA, Y. (ED.). Breakthroughs in melanoma. **Research**. [s.l.] InTech, 2011.
57. Tea and melanoma risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition. **Int J Cancer**. v, v. 140, n. 10, p. 2246–2255, 2017.
58. The Effect of Coffee Pharmacokinetic Properties Drugs: A Review. **Biomed Res Int**, v. 2020, 2020.
59. VIRGÍLIO, F. et al. Nucleotide Receptors: an emerging family Tipo de trabalho: Trabalho completo 10 regulatory molecules in blood cells. **Blood**, p. 587–600, 2001.
60. VISCONTI, M.; HAIDARI, W.; FELDMAN, S. Therapeutic use of caffeine in dermatology: A literature review. **Journal of dermatology & dermatologic surgery**, v. 24, n. 1, p. 18, 2020.
61. WELCH, H. G.; MAZER, B. L.; ADAMSON, A. S. The rapid rise in cutaneous melanoma diagnoses. **The New England journal of medicine**, v. 384, n. 1, p. 72–79, 2021.
62. WRZEŚNIOK, D. et al. Caffeine modulates growth and vitality of human melanotic COLO829 and amelanotic C32 melanoma cells: Preliminary findings. Food and chemical toxicology: an international. **Journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 120, p. 566–570, 2018.
63. WU, S. et al. Caffeine Intake, coffee consumption, and risk of cutaneous malignant melanoma. **Epidemiology**, n. 6, 2015.
64. YW, Y.; LAI, Y. C.; SCHWARTZ, R. A. Coffee Consumption and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis Observational Studies. **Am J Clin Dermatol**. v, v. 17, n. 2, p. 113–123, 2016.
65. ZHANG, L. et al. AtorvastatinOrloff, M., Weight, R., Valsecchi, E., & Sato, M. Immune Check Point Inhibitors Combination in Melanoma: Worth the Toxicity? RRCT. 1o de maio de, 11, 81–86. DCaffeine in CombinationRegulatesApoptosis, Migration, Invasionan doTumor spheres of Prostate Cancer Cells. **Pathol Oncol Res**. v, v. 26, n. 1, p. 209–216,2016.
66. ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRÄTER, N. Cellular Function And molecular structureofecto-nucleotidases. **Purinergic Signaling**, p. 437–502, 2012.

67. Disponível em: <<https://www.redebrasilatual.com.br/saude-e-ciencia/2019/06/consumo-regular-de-cafe-pode-reduzir-risco-de-cancer-no-figado/>>. Acesso em: 17 fev. 2023a.
68. Disponível em: <<https://www.brasilciencia.com.br/2019/07/04/pesquisa-da-unesp-sugere-que-consumo-de-cafe-pode-reduzir-risco-de-cancer-no-figado.>>. Acesso em: 17 fev. 2023b.