

## ANÁLISE DO ATP EXTRACELULAR E DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM LINFÓCITOS DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM ADENOMAS DE HIPÓFISE

YENIDIS TEILOR SCHEIBEL<sup>1,2</sup>, SYMON MARTINS<sup>2,3</sup>, ANDRÉ PAULO TURCATEL<sup>2,3</sup>, FRANCINI FRANSCESCON<sup>2,4</sup>, DÉBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA<sup>2,5</sup>

### 1 Introdução

Os adenomas de hipófise (PitNETs) são o segundo tumor intracraniano mais comum, e o mais comum dos tumores neuroendócrinos. As manifestações clínicas podem envolver aumento da secreção de hormônios adeno-hipofisários, no caso de PitNETs funcionais, enquanto tumores não funcionais manifestam sintomas de massa, como cefaleia e distúrbios visuais pela compressão do quiasma óptico, e quadros de deficiências hormonais por hipopituitarismo. Assim, os PitNETs podem prejudicar a qualidade de vida, ou, em casos mais agressivos, ameaçar a vida dos pacientes (Villa *et al.*, 2024). A investigação sobre os mecanismos tumorais possibilita desenvolver novos recursos para diagnóstico, monitoramento, prognóstico e tratamento das diversas neoplasias. Nesse sentido, uma das vias de sinalização que tem se apresentado como campo de interesse na investigação de diferentes tumores é o sistema purinérgico, que está intimamente relacionado com o desenvolvimento e progressão de diferentes neoplasias (Soares *et al.* 2024). Basicamente, devido ao dano celular no microambiente tumoral, há extravasamento de nucleotídeos e nucleosídeos para o meio extracelular, principalmente de ATP. Esses elementos são metabolizados pela ação de enzimas específicas, como CD39 e CD73, gerando subprodutos como ADP, AMP e ADO, que também possuem capacidade de sinalização sobre receptores específicos, interferindo em diferentes mecanismos como mensageiros extracelulares (Giuliani, Sarti, Di Virgílio, 2019). Embora a sinalização purinérgica cumpra com um papel relevante na fisiologia hipofisária, em um tecido que expressa praticamente todos os receptores dessa via de sinalização (Stojilkovic *et al.*, 2010), esse permanece como um campo de estudo pouco explorado em PitNETs. Dessa forma, este

---

1 Graduando de Medicina, UFFS, *campus* Chapecó, contato [yenidis.scheibel@estudante.uffs.edu.br](mailto:yenidis.scheibel@estudante.uffs.edu.br).

2 Grupo de Estudo e Pesquisa Interdisciplinar Saúde e Cuidado (GEPISC).

3 Graduando em Medicina, UFFS, *campus* Chapecó.

4 Graduada em Ciências Biológicas e Dra em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica.

5 Graduada em Fisioterapia e PhD em Imunologia, UFFS, **Orientadora.**

trabalho se concentrou em investigar a manifestação de ATPe e atividade enzimática de CD39 e CD73 nos linfócitos do plasma de pacientes com esse tipo de tumor.

## 2 Objetivos

Objetivo geral: Analisar ATP extracelular e metabolismo do AMP, ADP e ATP em linfócitos de pacientes com adenomas de hipófise.

Objetivos específicos: Caracterizar as amostras pelo sexo, idade, subtipo histológico do tumor, estágio tumoral, tamanho do tumor, e presença concomitante de comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras); Quantificar o ATP extracelular em amostra sanguínea de pacientes com adenomas de hipófise; Quantificar o metabolismo de AMP, ADP e ATP em linfócitos de pacientes com adenomas de hipófise; Correlacionar dados.

## 3 Metodologia

Esta se trata de uma pesquisa quantitativa, transversal do tipo caso-controle. O presente estudo faz parte do projeto guarda-chuva “Neoplasias do sistema nervoso central: análise do sistema purinérgico e estresse oxidativo”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS (CEP-UFFS), sob parecer nº 5.975.092 e CAAE nº65163722.0.0000.5564. Foram incluídos pacientes com adenoma de hipófise, maiores de 18 anos, submetidos à ressecção cirúrgica em um dos dois hospitais de referência de Chapecó-SC, no período de 2023 a 2024, que não dispunham de histórico de tumores em outro sítio e que aceitaram participar da pesquisa sob assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Participaram na pesquisa 16 pacientes, sendo que, para cada um, foram coletados 30 ml de amostra sanguínea, acondicionados em tubos de coletas específicos, incluindo tubo com citrato, tubo sem anticoagulante e tubo com EDTA. As amostras biológicas foram coletadas por profissional devidamente qualificado, membro da equipe de pesquisa, e, assim que coletadas, foram destinadas para o laboratório da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), onde tiveram seus hemocomponentes separados para as análises posteriores. Dos pacientes, 5 foram excluídos pela inviabilidade das amostras para as análises realizadas, sendo selecionados apenas 11. Para a caracterização das amostras, as informações foram obtidas a partir dos prontuários médicos, com controle rigoroso de acesso, limitado à equipe médica responsável, que forneceu as informações necessárias restritamente aos organizadores da pesquisa, sob supervisão. A graduação observada foi o Knosp, que avalia o nível de invasão de seio cavernoso, dado fornecido pelo neurocirurgião membro da pesquisa, sendo que, pelo espaço amostral reduzido, optou-se por categorizar os pacientes em dois grupos, conforme a literatura: baixo grau para Knosp 1 e 2; alto grau para Knosp 3 e 4 (Araujo-Castro *et al.* 2022).

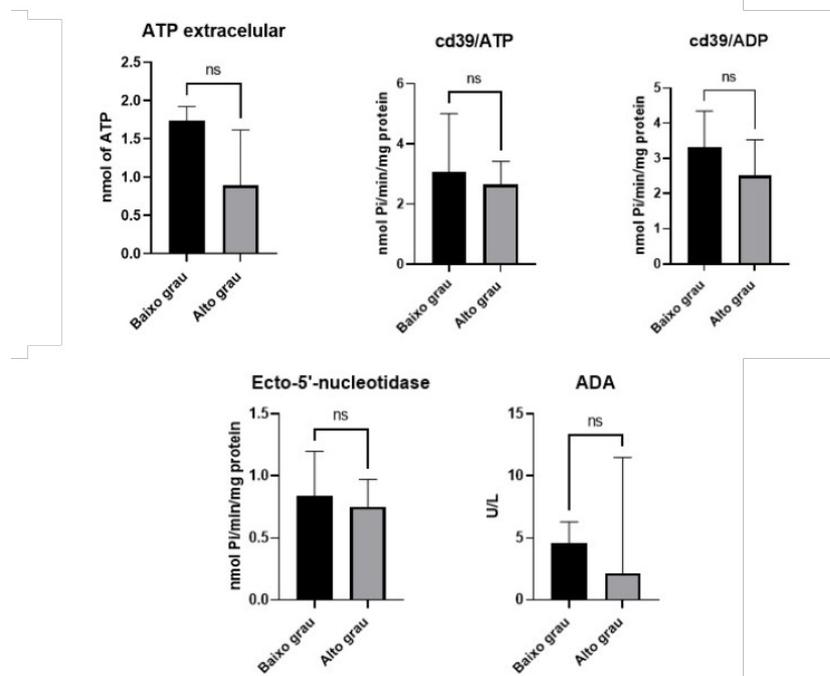
Para mensurar os níveis de ATP extracelular (ATPe) em soro, foi utilizado o Kit de Determinação de ATP (A22066) da Molecular Probes, seguindo o protocolo do manual do fabricante, usando 10  $\mu\text{L}$  de amostra, em duplicata, e a leitura foi realizada com luminômetro. Para mensurar a atividade enzimática de CD39 e CD73 em linfócitos, foram utilizados os protocolos da Atividade de Apirase e da Atividade da Ecto-nucleotidase de Pilla *et al.* (1996) adaptados por Lunkes *et al.* (2003). A atividade da adenosina deaminase (ADA) foi determinada a partir de duas reações: primeiramente foi feita a adição de 30  $\mu\text{L}$  de linfócitos e 90  $\mu\text{L}$  do substrato adenosina (21 mM - pH 6,5), que foi incubada em banho maria a 37°C durante 60 min; posteriormente, foram adicionados à solução 80  $\mu\text{L}$  de fenol/nitroprussiato de sódio e 80  $\mu\text{L}$  de hipoclorito alcalino (12,5 mL de NaOH 1M em 1,6 mL de hipoclorito alcalino a 5% em 100 mL de H<sub>2</sub>O), que foi homogeneizada em vórtex e incubada em banho maria à 37°C durante 30 min. A absorbância foi obtida à 620 nm e os resultados foram expressos em unidades de ADA por L (U/L). Os dados obtidos foram tabulados em planilha do Excel e, após, analisados através do programa GraphPad Prisma versão 8.0. Para os níveis de ATPe e para a atividade da ADA foi utilizado o teste de Mann Whitney, enquanto que a atividade da CD39 e da CD73 foram submetidas ao teste T de Student não pareado. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4 Resultados e Discussão

Um total de 11 pacientes participaram da pesquisa, sendo 45,45% do sexo masculino, com idade média de 51 anos, e 54,55% do sexo feminino, com idade média de 60 anos. Embora 45,45% dos tumores não tenham sido definidos em termos de produção hormonal, 9,09% foram definidos como secretores, e 36,36% como não secretores. A comorbidade mais prevalente identificada foi hipertensão arterial sistêmica, presente em 45,45% dos pacientes, seguida por diabetes mellitus tipo 2, em 9,09%. Outras comorbidades observadas foram hipertireoidismo e pan-hipopituitarismo, mas 50% dos indivíduos observados não apresentaram comorbidades no momento da pesquisa. Com relação à graduação Knosp, 36,36% foram classificados em nível baixo, com idade média de 47 anos, e 63,64% em nível alto, com idade média de 61 anos.

Os resultados das análises estão representados nos gráficos da figura 1. Não houveram diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos testes realizados, isto é, para os níveis de ATPe ( $p=0,3524$ ), atividade das enzimas CD39 sobre ATP ( $p=0,8218$ ), CD39 sobre ADP ( $p=0,6139$ ), CD73 ( $p=0,8241$ ) e ADA ( $p=0,6095$ ).

**Figura 1: Resultados da quantificação de ATPe e da análise enzimática de CD39, CD73 e ADA para os grupos observados**



Para os níveis de ATPe e para a atividade da ADA foi utilizado o teste de Mann Whitney, enquanto que a atividade da CD39 e da CD73 foram submetidas ao teste T de Student não pareado. Em cada gráfico, os dados estão expressos na forma de média e mediana, e a unidade de medida está representada no eixo das variáveis (eixo X), e as colunas representam os dois grupos observados (PitNETs de baixo e de alto grau de invasão, da esquerda para a direita). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos. Fonte: elaborado pelos autores (2025).

Como há pouca literatura sobre a via de sinalização purinérgica nos PitNETs, torna-se importante investigar a forma como esse tipo de tumor afeta as células linfocitárias, principalmente a expressão de CD39 e CD73. Devido à descrição de associação entre alterações na via purinérgica e invasividade, realizada em linhagens celulares de adenomas de hipófise por Yin *et al.* (2025), esperava-se encontrar alguma relação com a graduação Knosp, que é utilizada para definir macroscopicamente o nível de invasão tumoral. Acredita-se que o espaço amostral reduzido pode ter influenciado os resultados obtidos. Além disso, a limitação por não investigar tais alterações no microambiente tumoral, pelo tamanho reduzido das amostras de tecido, é outro fator relevante que impacta este estudo. Sendo assim, é necessário prosseguir investigando para abranger maior número de pacientes, e também alvejar as alterações específicas do microambiente tumoral.

## 5 Conclusão

Para as amostras dos pacientes com adenomas de hipófise analisadas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de baixo e de alto nível de Knosp, em

nenhuma das análises realizadas. Torna-se relevante, portanto, prosseguir com as análises para avaliar as alterações em um número maior de pacientes, além de investigar diretamente o microambiente tumoral.

### Referências Bibliográficas

STOJILKOVIC, S. S. *et al.* Signaling by purinergic receptors and channels in the pituitary gland. **Molecular And Cellular Endocrinology**, [S.L.], v. 314, n. 2, p. 184-191, jan. 2010. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.05.008>. Acesso em: 27 jan. 2025.

VILLA, C. *et al.* Grading and staging for pituitary neuroendocrine tumors. **Brain Pathology**, v. 35, n. 1, p. 13299, 25 ago. 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bpa.13299>. Acesso em: 20 jan. 2025.

SOARES, A. *et al.* Purines and purinergic receptors in primary tumors of the central nervous system. **Purinergic Signalling**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11302-024-10053-8>. Acesso em 27 fev 2025.

GIULIANI, A.; SARTI, A.; DI VIRGILIO, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. **Immunology Letters**, v. 205, p. 16-24, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.006>. Acesso em: 27 fev 2025.

LUNKES, G. *et al.* Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109 n. 4, p. 189-194, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0049-3848\(03\)00178-6](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(03)00178-6).

ARAUJO-CASTRO, M. *et al.* Radiological Knosp, Revised-Knosp, and Hardy-Wilson Classifications for the Prediction of Surgical Outcomes in the Endoscopic Endonasal Surgery of Pituitary Adenomas: Study of 228 Cases. **Frontiers in oncology**, v. 11, n. 807040. 20 Jan. 2022. DOI: <http://doi:10.3389/fonc.2021.807040>.

YIN, H. *et al.* Pannexin-1 regulation of ATP release promotes the invasion of pituitary adenoma. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 48, n. 2, p. 317–332, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40618-024-02445-9>.

**Palavras-chave:** Adenoma de Hipófise; ATP extracelular; CD39; CD73;

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES-2024-0235

### Financiamento

