

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

LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INFLAMAÇÃO CRÔNICA EM
PACIENTES APÓS RESSECÇÃO CIRÚRGICA DE PITNET**

CHAPECÓ-SC

2025

LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INFLAMAÇÃO CRÔNICA EM
PACIENTES APÓS RESSECÇÃO CIRÚRGICA DE PITNET**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini

CHAPECÓ-SC

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Oliveira, Luiz Alberto de

Avaliação da sinalização purinérgica e inflamação crônica em pacientes após ressecção cirúrgica de PitNET / Luiz Alberto de Oliveira. -- 2025.

75 f.:il.

Orientadora: Doutora Margarete Dulce Bagatini

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Chapecó, SC, 2025.

1. Neoplasias hipofisárias. 2. Sinalização purinérgica. 3. Ressecção cirúrgica. 4. Ectonucleotidases. 5. Inflamação. I. Bagatini, Margarete Dulce, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INFLAMAÇÃO CRÔNICA EM
PACIENTES APÓS RESSECÇÃO CIRÚRGICA DE PITNET**

Dissertação apresentada para o Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da
Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS),
como requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biomédicas.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em: 29/08/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Margarete Dulce Bagatini — UFFS
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Daniela Zanini — UFFS
Avaliadora

Prof.^a Dr.^a Gabriela Gonçalves de Oliveira — UFFS
Avaliadora

Dedico este trabalho à minha família e à minha
companheira, fontes de apoio e inspiração em
toda a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa. Em especial, expresso minha gratidão aos participantes da pesquisa, que gentilmente disponibilizaram parte de seu tempo e compartilharam suas histórias e receios diante das adversidades e fragilidades impostas pela doença.

À minha orientadora, Professora Margarete Dulce Bagatini, agradeço pela confiança e pela autonomia concedida durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como ao grupo de pesquisa que me acompanhou ao longo dessa trajetória. Aos professores e colegas da UFFS que compuseram a banca de qualificação desta dissertação — Daniela Zanini, Gabriela Gonçalves e Zuleide Maria Ignácio —, agradeço pelas valiosas contribuições que atuaram como etapa inicial de análise crítica e serviram como base para o aprimoramento da pesquisa.

Aos meus amigos, pela compreensão e apoio, mesmo diante do distanciamento físico e social nos períodos mais exigentes deste processo. Por fim, à minha família e à minha companheira, minha mais profunda gratidão, pelo apoio incondicional e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

O médico deve sempre se lembrar de que trata não apenas a doença, mas o ser humano que sofre; e, na esperança de cura, deve também oferecer consolo. A jornada de curar e ser curado transcende o corpo, alcança a alma, é onde a ciência e a espiritualidade se encontram em propósito maior.

- William Osler, em *The Principles and Practice of Medicine* (1892).

RESUMO

Introdução: Os tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs) são o tipo mais comum de tumores intracranianos entre as neoplasias endócrinas, apresentando maior prevalência em mulheres e indivíduos entre 30 e 40 anos. Estudos apontam que o sistema purinérgico, em conjunto com a resposta tecidual à lesão e os processos inflamatórios, estão entre as vias de sinalização envolvidas na formação do microambiente tumoral e na progressão dos PitNETs.

Objetivo: Avaliar a atividade, a expressão gênica e proteica das enzimas purinérgicas E-NTPDase (CD39) e Ecto-5'-nucleotidase (CD73), bem como os níveis séricos de Interleucina-1 β (IL-1 β) em pacientes submetidos à cirurgia transesfenoidal para ressecção de PitNETs. **Metodologia:** Trata-se de um estudo transversal desenvolvido em janeiro de 2024.

Foram selecionados 17 pacientes com diagnóstico prévio de PitNET, submetidos à ressecção cirúrgica no período entre 12 e 24 meses antes desta pesquisa, juntamente com 22 indivíduos do grupo controle. Foi avaliada a atividade e a expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e plaquetas, além dos níveis de ATP extracelular e IL-1 β sérico. A coleta do material biológico dos pacientes foi realizada nas dependências do Hospital Regional referência no oeste de Santa Catarina, localizado em Chapecó/SC. Para as análises estatísticas, inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida foram aplicados os testes T de Student, Mann-Whitney e ANOVA One-way. O nível de significância adotado foi de 95%, e o programa estatístico usado foi o GraphPad Prism 9.0.1. **Resultados:** Neste estudo, o grupo PitNET (GP) apresentou média de idade de 57,78 anos, predominância do gênero feminino (66,7%) e hipertensão como a doença crônica mais prevalente (23,53%). Em relação às características tumorais, houve maior prevalência de macroadenomas (94,11%), da linhagem celular PIT-1 (35,3%) e de tumores gonadotróficos (23,52%). No contexto molecular e funcional, o grupo PitNET exibiu níveis significativamente aumentados de ATP extracelular ($p=0,0004$) e IL-1 β sérico ($p=0,0017$), indicando um ambiente inflamatório persistente. Além disso, observou-se redução da atividade de CD39 em PBMCs ($p=0,0039$), associada à menor capacidade de hidrólise de ATP, contrastando com o aumento da atividade de CD73 em plaquetas ($p=0,0096$), que favorece a hidrólise de AMP e, consequentemente, a produção de adenosina imunossupressora. Complementarmente, verificou-se o aumento significativo na expressão proteica de CD39 ($p<0,0001$) e CD73 ($p=0,0013$), bem como na expressão gênica de CD73 ($p=0,0349$). **Conclusão:** Os resultados demonstraram que os PitNETs, mesmo após a ressecção cirúrgica, promovem alterações persistentes na atividade e expressão das enzimas purinérgicas, além de elevarem os níveis de IL-1 β , contribuindo para um estado de inflamação crônica e imunossupressão. Os resultados auxiliam na compreensão da fisiopatologia dos PitNETs e sugerem que os componentes da via purinérgica e os mediadores inflamatórios podem atuar como biomarcadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos. Ressalta-se, a necessidade do desenvolvimento de estudos longitudinais, capazes de validar esses marcadores e direcionar estratégias para o tratamento e seguimento dos pacientes.

Palavras-chave: Neoplasias hipofisárias; Sinalização purinérgica; Ressecção cirúrgica; Ectonucleotidases; Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) are the most common intracranial tumors among endocrine neoplasms, with higher prevalence in women and individuals aged 30 to 40 years. Studies indicate that the purinergic system, together with tissue response to injury and inflammatory processes, are among the signaling pathways involved in the formation of the tumor microenvironment and in PitNET progression. **Objective:** To evaluate the activity, gene expression, and protein expression of the purinergic enzymes E-NTPDase (CD39) and Ecto-5'-nucleotidase (CD73), as well as serum levels of Interleukin-1 β (IL-1 β) in patients who underwent transsphenoidal surgery for the resection of PitNETs. **Methodology:** This is a cross-sectional study conducted in January 2024. Seventeen patients with a previous diagnosis of PitNET, who had undergone surgical resection 12 to 24 months prior to this research, were selected, along with 22 individuals in the control group. The activity and expression of the ectonucleotidases CD39 and CD73 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and platelets were assessed, in addition to extracellular ATP levels and serum IL-1 β . Biological sample collection was carried out at the Regional Hospital, a reference center in western Santa Catarina, located in Chapecó, Brazil. For statistical analyses, data normality was verified using the Shapiro-Wilk test, followed by Student's t-test, Mann-Whitney, and one-way ANOVA. A 95% significance level was adopted, and analyses were performed using GraphPad Prism 9.0.1. **Results:** In this study, the PitNET group (PG) presented a mean age of 57.78 years, with a predominance of females (66.7%) and hypertension as the most prevalent chronic disease (23.53%). Regarding tumor characteristics, macroadenomas (94.11%), PIT-1 cell lineage (35.3%), and gonadotroph tumors (23.52%) were more frequent. At the molecular and functional level, the PitNET group exhibited significantly increased levels of extracellular ATP ($p = 0.0004$) and serum IL-1 β ($p = 0.0017$), indicating a persistent inflammatory environment. In addition, a reduction in CD39 activity in PBMCs was observed ($p = 0.0039$), associated with lower ATP hydrolysis capacity, contrasting with increased CD73 activity in platelets ($p = 0.0096$), which favors AMP hydrolysis and, consequently, the production of immunosuppressive adenosine. Furthermore, significant increases were found in CD39 protein expression ($p < 0.0001$), CD73 protein expression ($p = 0.0013$), and CD73 gene expression ($p = 0.0349$). **Conclusion:** The results demonstrated that PitNETs, even after surgical resection, promote persistent alterations in the activity and expression of purinergic enzymes, in addition to increasing serum IL-1 β levels, contributing to a state of chronic inflammation and immunosuppression. These findings expand the understanding of PitNET pathophysiology and suggest that purinergic pathway components and inflammatory mediators may serve as prognostic biomarkers and potential therapeutic targets. The development of longitudinal studies is warranted to validate these biomarkers and guide novel strategies for the treatment and follow-up of affected patients.

Keywords: Pituitary neoplasms; Purinergic signaling; Surgical resection; Ectonucleotidases; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Funções do sistema hipotálamo-hipófise.....	15
Quadro 1 - Classificação dos tumores neuroendócrinos da hipófise de acordo com o tipo, subtipo, fator de transcrição e hormônios secretados.....	22
Figura 2 - Tumor neuroendócrino da hipófise - PitNET.....	25
Figura 3 - Ativação do inflamassoma NLRP3.....	30
Figura 4 - Principais componentes da sinalização purinérgica.....	32
Figura 5 - Níveis de ATP extracelular.....	39
Figura 6A - Atividade de CD39 para a hidrólise de ATP em PBMCs.....	40
Figura 6B - Atividade de CD39 para a hidrólise de ADP em PBMCs.....	40
Figura 6C - Atividade de CD73 para a hidrólise de AMP em PBMCs.....	40
Figura 7A - Atividade de CD39 para a hidrólise de ATP em plaquetas.....	40
Figura 7B - Atividade de CD39 para a hidrólise de ADP em plaquetas.....	40
Figura 7C - Atividade de CD73 para a hidrólise de AMP em plaquetas.....	40
Figura 8A - Expressão gênica de CD39.....	41
Figura 8B - Expressão gênica de CD73.....	41
Figura 8C - Expressão proteica de CD39.....	41
Figura 8D - Expressão proteica de CD73.....	41
Figura 9 - Níveis de Interleucina-1 β	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização sociodemográfica e antropométrica conforme parâmetros da OMS.....	37
Tabela 2 - Classificação tumoral de acordo com o tamanho, a linhagem celular e a produção hormonal conforme subtipo histológico.....	38
Tabela 3 - Síntese dos resultados da atividade, expressão gênica e proteica das enzimas purinérgicas e níveis de IL-1 β em pacientes submetidos a ressecção cirúrgica e em controles.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADA	Adenosina deaminase
ADK	Adenosina quinase
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CD39	E-NTPDase
CD73	E-5'-NT
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético
E-NTPDase	Ecto-nucleosídeos trifosfato difosfohidrolases
E-5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
FDA	Federal Drug Administration
FT	Fator de transcrição
FSH	Hormônio folículo estimulante
GC	Grupo controle
GP	Grupo PitNET
HIF-1 α	Subunidade alfa do fator induzível por hipóxia
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IL-1 β	Interleucina 1 - Beta
IMC	Índice de Massa Corporal
K ⁺	Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
LH	Hormônio luteinizante
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADA	Adenosina deaminase
miRNA	MicroRNA
Na ⁺	Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Adenoma hipofisário
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Proteína C reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato inorgânico
PitNETs	Tumores neuroendócrinos da hipófise
POMC	Proopiomelanocortina
PRL	Prolactina
RT-PCR	Reação de transcriptase combinada com a reação em cadeia da polimerase
SF-1	Sinaptofisina
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TAMs	Macrófagos associados a tumores
TCA	Ácido tricloroacético
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TF	Fator de transcrição
TGF- β	Fator transformador de crescimento
TME	Microambiente tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TE	Tumores endócrinos
UDP	Difosfato de uridina
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
UTP	Trifosfato de uridina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
™	Trademark

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 TUMOR NEUROENDÓCRINO DA HIPÓFISE.....	18
3.2 SISTEMA PURINÉRGICO.....	25
3.3 SISTEMA PURINÉRGICO E TUMOR NEUROENDÓCRINO DA HIPÓFISE....	27
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 DESENHO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	33
4.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	33
4.3 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
4.4 PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO E SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs).....	34
5 ANÁLISE DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INTERLEUCINA 1β.....	35
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ECTONUCLEOTIDASES....	35
5.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP EXTRACELULAR (eATP).....	35
5.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS.....	36
5.4 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	36
6 RESULTADOS.....	37
6.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES.....	37
6.2 CARACTERÍSTICAS DOS TUMORES NEUROENDÓCRINOS DA HIPÓFISE..	39
6.3 ALTERAÇÕES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM ECTONUCLEOTIDASES.....	40
7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO A — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	55
ANEXO B — Artigo.....	58

1 INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos da hipófise (PitNETs) são neoplasias localizadas na região selar, no lobo anterior da glândula pituitária, no qual se desenvolvem a partir de mutações somáticas ou germinativas em células endócrinas, levando à secreção hormonal desregulada e crescimento tumoral, caracterizado por instabilidade cromossômica e senescência celular (Melmed *et al.*, 2022). Atualmente, os dados clínicos indicam elevada prevalência de PitNET em indivíduos entre 30 e 40 anos, sendo o terceiro tipo de tumor intracraniano mais comum, com incidência variando entre 10% e 25% de todos os casos, atrás somente dos meningiomas e dos gliomas (Souza *et al.*, 2023).

Nesse contexto, com os avanços das técnicas de diagnóstico e de imagem, houve um aumento significativo na identificação de novos casos de PitNETs. Esse achado é reforçado por um estudo realizado na Inglaterra com mais de 80.000 habitantes, que revelou uma prevalência até quatro vezes maior que a registrada em décadas anteriores (Day; Lavin; Bannister; Jenkins, 2025). Corroborativamente, um estudo epidemiológico realizado em 2020, na Bélgica, analisou a incidência anual de PitNETs, que variou entre 3,9 e 7,4 casos por 100.000 habitantes, além da prevalência, que oscilou entre 76 e 116 casos por 100.000 habitantes, evidenciando o impacto desses tumores na morbidade (Daly; Beckers, 2020).

Os PitNETs apresentam uma ampla gama de manifestações clínicas em razão de seu espectro altamente variável e da diversidade de comportamentos exibidos entre os diferentes fenótipos, variando de inócuos a malignos e impactando de vários modos a saúde do paciente (Melmed *et al.*, 2022). Nessa conjectura, com o crescimento progressivo do tumor, podem ocorrer compressão aguda de estruturas adjacentes — especialmente quando já se configuram como macroadenomas — e invasão do seio cavernoso, ocasionando sintomas como déficits visuais, diplopia, cefaleia, aumento da pressão intracraniana e compressão do quiasma óptico ou dos nervos cranianos (Ho *et al.*, 2024).

O diagnóstico do PitNET envolve a avaliação da função hormonal hipotalâmica-hipofisária, assim como a análise do crescimento e a invasão tumoral por meio dos exames de imagem (ressonância magnética contrastada), com base nas classificações de Knosp e Hardy. Além disso, a identificação histopatológica dos tipos celulares proliferativos, considerando o índice Ki-67 expresso pela coloração imuno-histoquímica, parâmetro considerado padrão-ouro para o diagnóstico dessas lesões e reafirmado pelos princípios estabelecidos na classificação de 2017 (Silva; Oliveira; Souza, 2022).

Ademais, compreender os principais determinantes da proliferação tumoral e a

estratificação de risco permite um manejo mais eficaz dos pacientes com os PitNETs, uma vez que o entendimento das características histológicas do tumor — incluindo índice mitótico, atipia celular e marcadores moleculares — é fundamental para o diagnóstico, o tratamento e o prognóstico (Souza *et al.*, 2023). O conhecimento das rotas de comunicação celular, envolvendo fatores de crescimento, seus receptores, vias de sinalização intracelular e o ciclo celular são fundamentais (Maynard; Sfanos, 2022). Nesse contexto, evidências científicas indicam que a sinalização purinérgica e os processos inflamatórios teciduais desempenham papéis cruciais na patogênese e progressão das alterações neuroendócrinas, uma vez que, os nucleotídeos extracelulares, como ATP, ADP, AMP e a adenosina, regulam diversos processos biológicos por meio da cascata de hidrólise purinérgica, regulando a disponibilidade de nucleotídeos no meio extracelular (Di Virgilio; Adinolfi, 2017).

No microambiente tumoral, a alta concentração de ATP, associada à infiltração leucocitária e à presença de citocinas pró-inflamatórias, influencia processos como apoptose, proliferação, diferenciação celular, invasão e metástase (Di Virgilio, 2012). O ATP liberado ativa receptores P2X7, promovendo a secreção de IL-1 β e IL-18, além de sustentar a inflamação crônica (Zhang; Mosser, 2008). Em contrapartida, a adenosina, frequentemente aumentada no tumor, favorece o crescimento celular, a angiogênese e a imunossupressão (Sato *et al.*, 2019). Esse equilíbrio é regulado por enzimas como a CD39, que converte ATP/ADP em AMP, e CD73, que transforma AMP em adenosina, e estão amplamente distribuídas em células e tecidos (Di Virgilio, 2012; Burnstock *et al.*, 2002).

A investigação das implicações do sistema purinérgico em diferentes tipos de tumores tem se consolidado como uma ferramenta essencial para a compreensão dos mecanismos patológicos neoplásicos (Pelegri; Surprenant, 2009; Kumari *et al.*, 2016). Embora estudos sobre enzimas purinérgicas e o sistema nervoso tenham sido conduzidos em outros tumores intracranianos, ainda existe uma lacuna no entendimento da ação integrada dos componentes da sinalização purinérgica nos PitNETs, uma vez que poucos trabalhos exploraram a relação entre os diferentes elementos dessa via e esses tumores (Mota *et al.*, 2024).

Diante desse cenário, torna-se fundamental aprofundar o conhecimento sobre a interação desses fatores em indivíduos com PitNETs, a fim de melhorar o prognóstico e o tratamento da doença. Compreender as vias comuns que associam a desregulação da sinalização purinérgica aos PitNETs pode oferecer novas perspectivas sobre seus processos patológicos e contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sinalização purinérgica por meio das enzimas ectonucleotidases E-NTPDase (CD39) e Ecto-5'-nucleotidase (CD73), além da expressão da IL-1 β , em pacientes submetidos à cirurgia transesfenoidal para ressecção de tumor neuroendócrino da hipófise.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o grupo amostral quanto aos perfis sociodemográficos e clínico-patológicos;
- Avaliar a atividade, a expressão gênica e proteica da enzima CD39 em células mononucleares do sangue periférico e plaquetas de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de tumor neuroendócrino da hipófise e em indivíduos controle;
- Avaliar a atividade, a expressão gênica e proteica da enzima CD73 em células mononucleares do sangue periféricos e plaquetas de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de tumor neuroendócrino da hipófise e em indivíduos controle;
- Analisar os níveis de IL-1 β em pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de tumor neuroendócrino da hipófise e em indivíduos controle.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 TUMOR NEUROENDÓCRINO DA HIPÓFISE

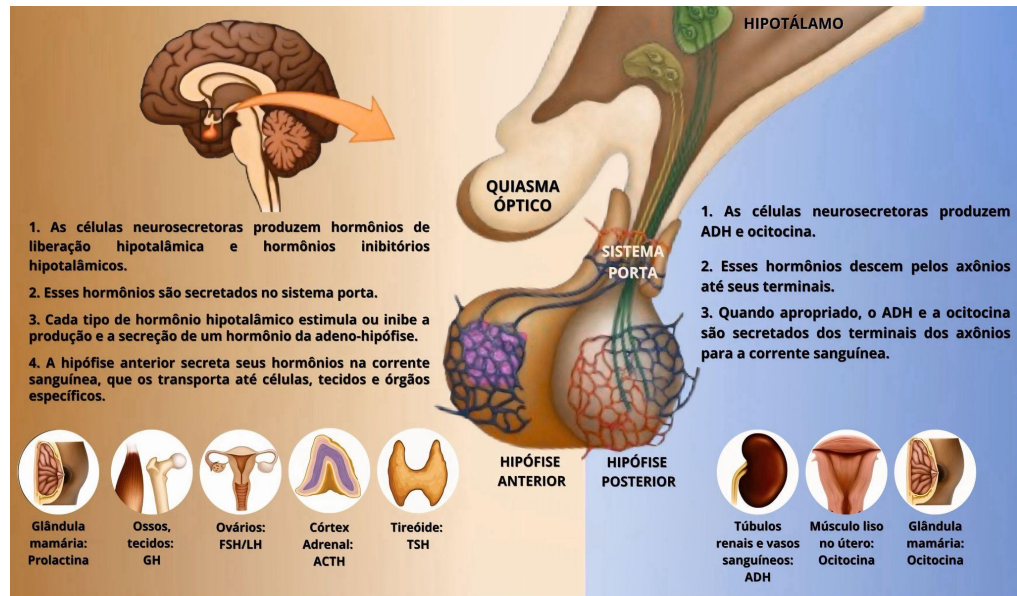
Os PitNETs são tumores endócrinos (TEs) que se desenvolvem na região selar do crânio, sendo considerados um dos TEs mais prevalentes — atrás apenas dos tumores gastrointestinais e pulmonares. Representam cerca de 10% a 15% dos casos e, na maioria das vezes, são tumores benignos, ou seja, não se disseminam além do seio cavernoso (Melmed *et al.*, 2022). Os PitNETs podem surgir de diferentes linhagens celulares ou de células nulas, que não expressam nenhum produto gênico. Estima-se que aproximadamente 1 em cada 1100 pessoas seja diagnosticada com PitNET ao longo da vida, seja em razão de manifestações clínicas, seja por achados incidentais em exames de imagens — conhecidos como incidentalomas — durante a investigação de outras patologias neuroendócrinas (Mota *et al.*, 2024).

Diante desses dados, torna-se fundamental compreender a anatomia patológica dos PitNETs. A hipófise é dividida em dois lobos de origens distintas: o lobo anterior (adeno-hipófise), derivado do ectoderma oral, e o lobo posterior (neuro-hipófise), originado do neuroectoderma (Melmed *et al.*, 2022). A glândula pituitária anterior é composta por células altamente especializadas, originadas do ectoderma oral, que produzem hormônios específicos sob a regulação de fatores de transcrição próprios de cada tipo celular (Mete *et al.*, 2018).

Dessa forma, os tumores secretores lactotrófos sintetizam prolactina; os somatotróficos produzem hormônio do crescimento; os corticotróficos secretam proopiomelanocortina, precursores do hormônio adrenocorticotrófico; os gonadotróficos liberam hormônio folículo-estimulante e hormônio luteinizante; e os tireotróficos são responsáveis pela produção da tireotrofina, também conhecida como hormônio estimulante da tireoide (TSH) (Setton *et al.*, 2022).

Além dessas, a glândula pituitária apresenta outras células, como células folículo-estelares, foliculares da zona marginal, células hormonais granulares, mesenquimais, endoteliais e imunológicas, enquanto o lobo posterior contém pituícitos, um tipo de célula glial, além de extensões axônios de neurônios localizados no hipotálamo (Tritos; Miller, 2023). Esses neurônios secretam diretamente na circulação periférica dois hormônios essenciais: a ocitocina e a vasopressina (Sousa *et al.*, 2023).

Figura 1 - Funções do sistema hipotálamo-hipófise



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Nesse contexto, os PitNETs são classificados em dois grupos principais: os tumores funcionantes ou secretores, e tumores não-funcionantes ou silenciosos (Setton *et al.*, 2022). Os PitNETs silenciosos, vistos principalmente nos subtipos gonadotrófico e corticotrópico, representam aproximadamente um terço de todos os casos e apresentam uma taxa de recorrência de 51,5% ao longo de 10 anos, impactando negativamente o prognóstico geral dos pacientes (Almalki *et al.*, 2020). Esses tumores podem não secretar hormônios em quantidade suficiente para provocar aumento detectável nos níveis séricos (tumores completamente silenciosos) ou podem secretar hormônios cujos produtos não causam sinais clínicos, ou sintomas típicos de excesso hormonal. Essa característica peculiar torna o diagnóstico e o manejo clínico desses tumores desafiadores (Mota *et al.*, 2024).

Em alguns casos, os PitNETs podem causar sintomas compressivos, como cefaleia ou perda parcial da visão, devido à pressão exercida sobre os nervos ópticos. Em situações mais graves, pode ocorrer hemorragia aguda por apoplexia hipofisária, além de sinais e sintomas relacionados à produção hormonal insuficiente ou excessiva, comprometendo a função normal da hipófise (Ho *et al.*, 2024).

Os PitNETs secretores, como exemplificado anteriormente, caracterizam-se pela produção excessiva de hormônios, o que pode resultar em diversas manifestações clínicas (De Souza *et al.*, 2023). Dados de prevalência indicam que aproximadamente um terço desses tumores secretam prolactina em excesso — hormônio responsável por estimular a produção de leite após o parto. Esse aumento anormal pode levar a condições patológicas, como

hipogonadismo, infertilidade, galactorreia, amenorreia, secura vaginal, baixa libido masculina, níveis reduzidos de testosterona e disfunção erétil (Setton *et al.*, 2022).

Os tumores produtores de hormônio do crescimento em excesso causam acromegalia em adultos e gigantismo em crianças, com sintomas como aumento das mãos, pés e características faciais, além de cefaleia, osteoartrite, diabetes, apneia do sono e maior risco cardiovascular, incluindo hipertensão (Ho *et al.*, 2024). Quanto aos tumores que secretam corticotropina em excesso estimulam a secreção de ACTH e, consequentemente, a liberação de cortisol pelas glândulas adrenais, resultando em hipercortisolemia e na Doença de Cushing que pode ocasionar obesidade, hipertensão, osteoporose, ansiedade, depressão e distúrbios do sono (Almalki *et al.*, 2020). Por outro lado, os tumores produtores de tireotropina secretam quantidades excessivas de TSH, podendo levar ao hipertireoidismo, com manifestações como sudorese, arritmias, irritabilidade e perda rápida de peso (Ho *et al.*, 2024).

Embora a grande maioria dos PitNETs seja considerado benigno e sua etiopatogenia permaneça pouco compreendida, avanços significativos foram alcançados na compreensão de sua oncogênese por meio de estudos recentes (De Souza *et al.*, 2023). Entre as descobertas mais relevantes destacam-se as mutações inativadoras em genes supressores tumorais e as mutações ativadoras de oncógenes, que desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento desses tumores (Mota *et al.*, 2024). Além disso, ressalta-se a influência de sinais hormonais provenientes do hipotálamo, que indicam disfunções na regulação do ciclo celular, promovendo proliferação celular anormal e crescimento tumoral (De Souza *et al.*, 2023).

Nesse contexto, ao longo das últimas décadas, foram feitas revisões periódicas na classificação dos PitNETs, refletindo o progresso no entendimento dos processos biológicos subjacentes. Em suas primeiras definições, em meados de 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) categorizava os tumores como “típicos” ou “atípicos”, com base na presença de dois dos três marcadores proliferativos: o índice Ki-67, a contagem mitótica e a imunocoloração para p53 (Silva; Oliveira; Sousa, 2022). Posteriormente, a classificação da OMS de 2017 trouxe uma mudança paradigmática ao adotar uma abordagem baseada na linhagem celular, determinada pelo fator de transcrição (FT) e pela coloração imuno-histoquímica hormonal (Li *et al.*, 2024).

Ademais, cada fator de transcrição desempenha papel essencial na maturação das células-tronco hipofisárias, conforme a sua função específica. Assim, o FT homeodomínio da classe POU, específico da hipófise (PIT-1), é responsável pela diferenciação das células acidófilas, o FT esteroideogênico 1 (SF1) conduz à formação das células gonadotróficas,

enquanto o membro da família T-box TBX19 (T-PIT), promove a maturação das células corticotróficas (Melmed *et al.*, 2022). Esse avanço classificatório permitiu uma caracterização mais precisa dos tumores, contribuindo para diagnósticos específicos e para abordagens terapêuticas direcionadas ao fenótipo celular (Mota *et al.*, 2024).

Embora os termos “típico” e “atípico” tenham sido retirados da classificação da OMS de 2017, os valores prognósticos do Ki-67 e da contagem mitótica foram preservados, com maior destaque para os tipos histológicos de “alto risco” (Melmed *et al.*, 2022). Estes incluem os tumores corticotrófico silencioso, os tumores pluri hormonais positivos para PIT-1, os tumores somatotróficos com granulação escassa, tumores lactotróficos em homens e os tumores de células de Crooke (Silva; Oliveira; Sousa, 2022). Tais mudanças foram observadas em um estudo no qual a análise dos FTs contribuiu para aprimorar as informações dos diagnósticos, permitindo a reclassificação de 12% dos tumores em 171 pacientes (De Souza *et al.*, 2023).

Nesse cenário, em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou a classificação dos PitNETs, priorizando a linhagem celular dos tumores em detrimento de sua produção hormonal. Essa atualização passou a basear-se em critérios morfológicos, moleculares e clínicos, associados à imuno-histoquímica e a outras colorações especiais, reconhecidas como técnicas essenciais para sua definição (Silva; Oliveira; Sousa, 2022). Além disso, os PitNETs passaram a ser classificados considerando a linhagem celular, os fatores de transcrição, a diferenciação entre subtipos histológicos e os perfis hormonais expressos pelas células tumorais (OMS, 2022). Essa nova classificação foi fundamental para o reconhecimento da heterogeneidade biológica desses tumores e possibilitou uma compreensão mais aprofundada de sua biologia, auxiliando tanto na definição do prognóstico quanto na escolha da conduta clínica e das estratégias terapêuticas personalizadas.

Outrossim, a classificação da OMS de 2022 introduziu uma nova categoria denominada “tumores sem linhagem celular distinta”, que inclui os “tumores pluri hormonais” e os “tumores de células nulas”, definidos por uma população monomórfica de células com múltiplas expressões de fatores de transcrição (Melmed *et al.*, 2022). Apesar dos avanços representarem um progresso significativo na avaliação diagnóstica dos PitNETs, ainda persistem desafios importantes para clínicos e patologistas. Uma das principais limitações da classificação da OMS tem sido a ausência de critérios padronizados para determinar a imunopositividade dos fatores de transcrição, o que torna essa avaliação suscetível a interpretações subjetivas (De Souza *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024).

Quadro 1 - Classificação dos tumores neuroendócrinos da hipófise de acordo com o tipo, subtipo, fator de transcrição e hormônios secretados.

LINHAGEM PIT-1	
TUMORES SOMATOTRÓFICOS	Densamente granulados, caracterizados pela expressão do fator de transcrição PIT-1 e secreção do hormônio do crescimento (GH) associado à subunidade alfa.
	Esparsamente granulados, também há expressão de PIT-1, mas a secreção se restringe predominantemente ao GH.
TUMORES LACTOTRÓFICOS	Esparsamente granulados, expressam PIT-1 e receptores de estrogênio alfa (ER α), com secreção de prolactina em padrão paranuclear.
	Densamente granulados, apresentam expressão de PIT-1 e ER α , com secreção difusa e citoplasmática de prolactina.
TUMOR MAMOSOMATOTRÓFICO	Caracteriza-se pela coexpressão de GH (predominante), prolactina e subunidade alfa, sob regulação de PIT-1 e ER α .
TUMOR TIREOTRÓFICO	Apresenta expressão de PIT-1 e GATA3, com secreção da subunidade alfa e do hormônio estimulante da tireoide (TSH β).
TUMOR DE LINHAGEM PIT-1 PLURI HORMONAIS MADURO	Compostos por células monomórficas com expressão predominante de GH, podendo secretar outros hormônios dessa linhagem de forma variável (PRL, TSH).
TUMOR DE LINHAGEM PIT-1 IMATURO	Apresentam células monomórficas com coloração focal ou variável, sem produção hormonal definida ou com expressão de múltiplos hormônios da linhagem PIT-1.
TUMOR DE CÉLULAS-TRONCO ACIDÓFILAS	Definido por células monomórficas com expressão predominante de PRL e secreção focal e variável de GH, sob regulação de PIT-1 e ER α .
TUMOR MISTO SOMATOTRÓFICO E LACTOTRÓFICO	Composto por duas populações celulares morfológicamente distintas, uma secretando GH e outra secretando prolactina, ambos sob controle de PIT-1 e ER α .

(Continua)

(Continuação)

LINHAGEM T-PIT	
TUMORES CORTICOTRÓFICOS	Apresenta expressão de T-PIT e secreção de ACTH e outros derivados do pró-opiomelanocortina (POMC).
	Regulado por T-PIT, com secreção de ACTH e derivados do POMC, porém com menor conteúdo de grânulos citoplasmáticos.
LINHAGEM SF-1	
TUMOR GONADOTRÓFICO	Caracterizados pela expressão de SF-1, ER α e GATA3, com secreção variável da subunidade alfa, LH e FSH. Em alguns casos, não há secreção hormonal evidente.
TUMORES SEM LINHAGEM CELULAR DISTINTA	
TUMOR PLURI HORMONAL	Compostos por uma população monomórfica de células, que expressam múltiplas combinações hormonais de forma simultânea.
TUMOR DE CÉLULAS NULAS	Não apresentam expressão de fatores de transcrição ou secreção hormonal detectável.

(Conclusão)

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Com o aprimoramento constante das ferramentas de análise fenotípica, os patologistas passaram a dispor de uma classificação com valor preditivo, capaz de contribuir tanto para a escolha terapêutica quanto para a definição de um prognóstico mais acurado (Simsek Bagir *et al.*, 2020; Melmed *et al.*, 2022). A maioria desses tumores apresenta comportamento biológico benigno (>99%), baixo índice proliferativo e evolução clínica indolente, adquirindo apenas raramente características agressivas. A transformação maligna com invasão de tecidos adjacentes é incomum, sendo raros os casos de metástases crânio-espinais e/ou sistêmicas (Rutkowski; Zada, 2019).

Além disso, a ampliação dos critérios histopatológicos para realização dos diagnósticos tem gerado custos elevados, sublinhando a necessidade de simplificar a abordagem por meio de algoritmos práticos (Melmed *et al.*, 2022). É importante destacar que mutações oncogênicas são raramente observadas em PitNETs, assim como a malignização de tumores pré-existentes. Contudo, alterações em determinados genes específicos podem

desempenhar papel crucial no desenvolvimento de subtipos de PitNETs (Mota *et al.*, 2024).

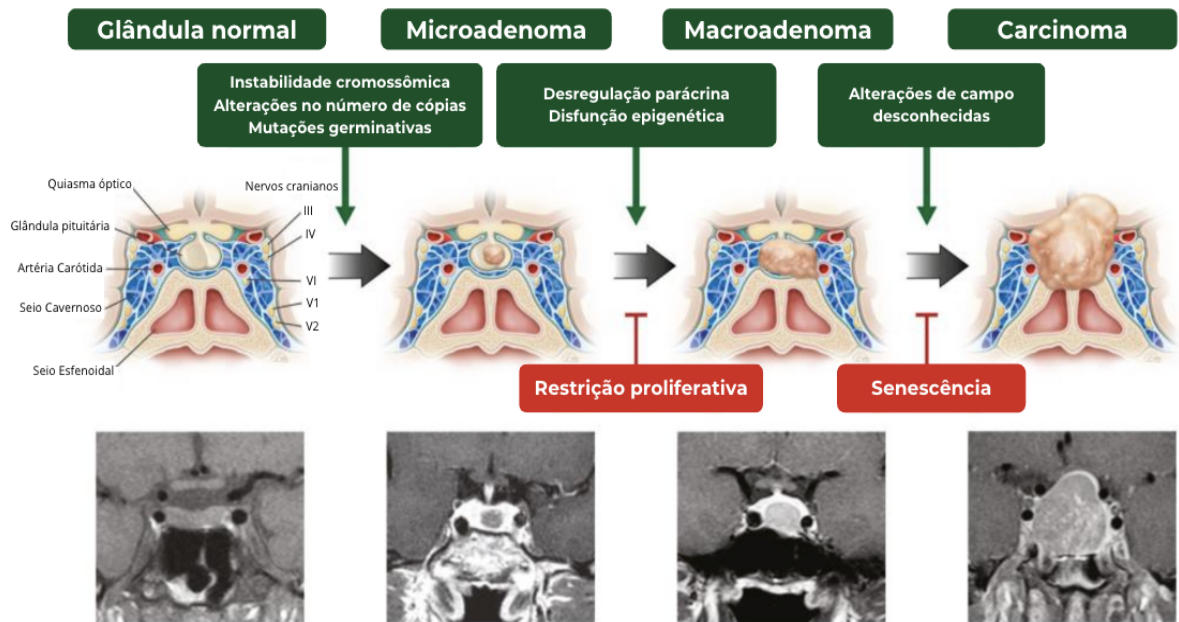
A identificação precisa do tipo de tumor e sua classificação são fundamentais para determinar a abordagem terapêutica adequada, que pode incluir cirurgia, tratamento medicamentoso ou somente acompanhamento clínico (Melmed *et al.*, 2022). As opções terapêuticas para PitNETs são definidas com base no subtipo tumoral e na presença ou ausência de produção hormonal, no tamanho, na extensão da invasão tecidual e na compressão de estruturas adjacentes (Almalki *et al.*, 2020). O tratamento pode variar desde terapias medicamentosas — como o uso de agonistas dopaminérgicos para o manejo de prolactinomas — até intervenções cirúrgicas realizadas por via transesfenoidal ou transcraniana, com ou sem associação à radioterapia (Yao *et al.*, 2019).

De forma geral, para pacientes que necessitam de intervenção, a cirurgia endoscópica transesfenoidal é considerada a terapia de primeira linha, exceto nos casos de prolactinomas, cujo tratamento inicial preferencial é medicamentoso, utilizando bromocriptina ou cabergolina (Melmed *et al.*, 2020). A cirurgia endoscópica transesfenoidal representa um avanço significativo ao permitir a remoção precisa dos tumores com mínima interferência nos tecidos circundantes, resultando em melhores desfechos clínicos (Kolodny *et al.*, 2020). Já os microadenomas não funcionais que não causam sintomas podem não necessitar de tratamento imediato, mas devem ser acompanhados por meio de ressonância magnética em intervalos regulares (Drummond; Ribeiro-Oliveira Jr; Soares, 2022).

Ademais, alguns macroadenomas podem exigir intervenção cirúrgica por meio de craniotomia. Embora represente uma alternativa terapêutica relevante, esse procedimento está associado a maior morbidade quando comparado a via transesfenoidal (Chen *et al.*, 2018). Após a cirurgia, estima-se que entre 5% e 15% dos pacientes apresentem recorrência de PitNETs ao longo do seguimento. Nos PitNETs não funcionantes, essa taxa de recorrência é particularmente significativa, uma vez que, mesmo após a ressecção cirúrgica inicial, uma parcela expressiva dos pacientes apresenta recidiva tumoral em até cinco anos (Martins *et al.*, 2023).

Corroborando essas evidências, estudo recente demonstrou que aproximadamente 50% dos pacientes com PitNETs foram submetidos à cirurgia; entretanto, cerca de 25% evoluíram com doença residual ou persistente, exigindo tratamento adjuvante — como radioterapia ou terapia medicamentosa — para adequado controle da doença (Jimenez-Canizales *et al.*, 2023). Esses achados reforçam que, embora a cirurgia represente o tratamento de escolha na maioria dos casos, a complexidade biológica e clínica desses tumores frequentemente demanda uma abordagem multimodal e individualizada.

Figura 2 - Tumor neuroendócrino da hipófise — PitNET



Fonte: Adaptado de Melmed., *et al* (2022).

Figura 2 - Etapas de desenvolvimento do PitNET, que se iniciam com alterações na fase de glândula normal, evoluindo posteriormente para microadenoma, macroadenoma e, por fim, carcinoma.

3.2 SISTEMA PURINÉRGICO

A matriz extracelular das purinas foi inicialmente identificada em 1929 por Drury e Szent-Györgi, que relataram seus efeitos potentes sobre o coração de mamíferos. Posteriormente, em 1959, Pamela Holton sugeriu que o ATP poderia atuar como transmissor neural, capaz de provocar alterações no tônus vascular quando liberado e estimulado (Burnstock *et al.*, 2002). Assim, foi introduzido o termo “sinalização purinérgica” para descrever esse novo sistema de comunicação, caracterizado pela interação entre purinas extracelulares, enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos e nucleosídeos, e receptores que se ligam a essas moléculas (Di Virgilio; Adinolfi, 2017).

Em 1972, Burnstock apresentou o conceito de sinalização purinérgica, no qual nucleotídeos e nucleosídeos passaram a ser compreendidos de acordo com sua localização no ambiente intracelular, onde estão envolvidos no metabolismo e no fornecimento de energia para as células, e no ambiente extracelular, onde funcionam como mediadores na sinalização purinérgica (Burnstock *et al.*, 2002).

Nesse contexto, o principal nucleotídeo extracelular é a adenosina trifosfato (ATP), cujos produtos de hidrólise — adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e adenosina (ADO) — desempenham papéis fisiológicos relevantes (Di Virgilio, 2012). Além disso, evidências demonstraram que pirimidinas extracelulares, como trifosfato de uridina (UTP), difosfato de uridina (UDP) e açúcares conjugados ao UDP (como UDP-glicose), também atuam como moléculas sinalizadoras, ativando receptores purinérgicos fora das células (Kepp *et al.*, 2021; Yegutkin; Boison, 2022).

Atualmente, é amplamente reconhecida pela comunidade científica a função do ATP como neurotransmissor, atuando tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema nervoso periférico (SNP) (Melmed *et al.*, 2022). Além disso, o ATP participa de múltiplos processos celulares essenciais, como a regulação da morte celular programada (podendo estimular ou inibir), a proliferação, migração e diferenciação celular, bem como a secreção de fatores de crescimento e de mediadores inflamatórios (Burnstock, 2002).

Para o controle molecular ser devidamente estabelecido, foram identificadas duas principais famílias de receptores purinérgicos: os receptores P1, específicos para adenosina (Ado), e os receptores P2, que reconhecem ATP, ADP, UTP, UDP e UDP-glicose (Di Virgilio, 2012). Os receptores P1 são do tipo metabotrópico, acoplados à proteína G, e subdividem-se em quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3 (Di Virgilio; Adinolfi, 2017). Entre eles, os receptores A2A e A2B promovem a ativação da adenilil ciclase, aumentando a produção de AMP cíclico (cAMP), enquanto os receptores A1 e A3 inibem essa enzima, reduzindo os níveis de cAMP (Robson; Sévigny; Zimmermann, 2006).

Ademais, os receptores P2 são divididos em duas subclasses principais: P2X, de natureza ionotrópica, e P2Y, de natureza metabotrópica. A família P2Y conta com oito subtipos descritos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14. Destes, os subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 estão associados à ativação da fosfolipase C (Di Virgilio; Adinolfi, 2017). Por outro lado, a família P2X compreende sete receptores (P2X1 a P2X7), entre os quais se destaca o P2X7, amplamente estudado no contexto das neoplasias. A ativação desse receptor pelo ATP promove o influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} , bem como o efluxo de íons K^+ , desempenhando papel crucial na regulação da sinalização intracelular (Costa *et al.*, 2022).

Entre as enzimas identificadas nesse sistema, a CD39 inclui oito membros e desempenha papel fundamental na degradação de nucleotídeos extracelulares, convertendo ATP em ADP e AMP. A CD73, por sua vez, catalisa a hidrólise do AMP em adenosina e também desfosforila diversos nucleotídeos 5'-monofosfatados, formando seus respectivos

nucleosídeos (Di Virgilio; Adinolfi, 2017). Enquanto isso, a adenosina desaminase (ADA) é responsável pela conversão da adenosina em inosina e hipoxantina. Essa enzima apresenta três subtipos: ADAR1, ADAR2 e ADAR3. Dentre eles, ADAR1 e ADAR2 possuem atividade enzimática, enquanto ADAR3 não apresenta atividade catalítica. A ADAR2 é considerada o principal componente enzimático presente no soro, estando envolvida na estimulação de células T (Manica; Bagatini, 2021).

3.3 SISTEMA PURINÉRGICO E TUMOR NEUROENDÓCRINO DA HIPÓFISE

O ATP desempenha papel crucial na configuração do microambiente tumoral (TME), mediando diversas funções dos componentes presentes no meio extracelular, especialmente na regulação da atividade de células imunológicas malignas ou com diferenciação terminal incompleta (Li *et al.*, 2024). A concentração de ATP extracelular no TME é regulada pelo equilíbrio dinâmico entre sua liberação e degradação. Diferentes tipos celulares, como células cancerígenas, neutrófilos infiltrantes de tumor e macrófagos associados ao tumor, liberam ATP como parte de seus processos fisiológicos normais ou em resposta a condições de estresse (Manica; Bagatini, 2021; Costa, 2022).

Ademais, as enzimas CD39 e CD73 destacam-se como as principais metabolizadoras de nucleotídeos no TME, sendo responsáveis por converter ATP em adenosina. Essa conversão exerce papel essencial ao promover a transição de células imunológicas de um estado pró-inflamatório para um estado anti-inflamatório (Di Virgilio, 2012). Essas enzimas apresentam ampla expressão em diferentes tipos celulares, incluindo fibroblastos associados a tumores, um subconjunto imunossupressor de células NK, macrófagos relacionados ao tumor e células supressoras derivadas de mieloides (Costa, 2022).

Outrossim, a cascata envolve a enzima de superfície celular adenosina desaminase (ADA), responsável por desaminar hidroliticamente o metabólito adenosina, convertendo-o em inosina. A deficiência dessa enzima pode levar a condições patológicas ou à exacerbação de doenças crônicas, em virtude do aumento anormal dos níveis de adenosina extracelular (Di Virgilio, 2012). A adenosina, por sua vez, atua como biomarcador de lesão celular, mediando efeitos anti-inflamatórios e funcionando como uma potente molécula imunossupressora (Robson; Sévigny; Zimmermann, 2006).

Além disso, as enzimas CD39 e CD73 apresentam ampla distribuição em diversos tecidos e tipos celulares. A CD39 é altamente expressa em células endoteliais, células musculares lisas, células dendríticas e linfócitos, enquanto a CD73 é encontrada em múltiplos

órgãos, como cólon, rins, cérebro, fígado, coração, próstata e pulmões (Di Virgilio, 2012). Ambas também estão presentes em plaquetas, onde desempenham funções essenciais no contexto vascular e imunológico (Costa, 2022).

É relevante destacar que a degradação extracelular de ATP não exige necessariamente a coexpressão de CD39 e CD73 na mesma célula, podendo ocorrer de maneira eficiente quando essas ectonucleotidases são expressas em células distintas, mas próximas, dentro do microambiente tumoral (TME) (Di Virgilio, 2012). Além disso, a expressão dessas enzimas é regulada por condições típicas do TME, como a hipóxia, que atua como estímulo positivo para a expressão de CD39 e CD73 por meio de mecanismos transcricionais mediados pela subunidade alfa do fator induzível por hipóxia (Li *et al.*, 2024).

Outros fatores também contribuem para essa regulação, incluindo baixa disponibilidade de glicose, pH ácido, fator transformador de crescimento β (TGF- β), interferons tipo I e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Esses elementos reforçam a adaptação metabólica e imunossupressora, promovendo a progressão tumoral (Figueiredo, 2019; Maynard; Sfanos, 2022). A degradação extracelular de ATP, mediada sequencialmente pelas enzimas CD39 e CD73, exerce papel significativo na imunossupressão, não somente pela redução da imunoestimulação dependente de ATP, mas também pela geração de adenosina, que, por sua vez, contribui para a progressão tumoral por meio de mecanismos imunológicos e não imunológicos (Di Virgilio; Adinolfi, 2017).

A superexpressão de CD39 em células malignas está associada à supressão da imunidade anticancerígena, enquanto a superexpressão de CD73 relaciona-se ao aumento da capacidade de invasão tumoral e do potencial metastático (Gao *et al.*, 2017). Esse efeito ocorre principalmente pela sinalização mediada pela adenosina via receptor A2B, mecanismo que se associa à redução da sobrevida dos pacientes (Costa, 2022).

A dinâmica entre células imunológicas, plaquetas e enzimas do sistema purinérgico exerce papel central na progressão tumoral. A ativação exacerbada e a superexpressão de linfócitos infiltrantes de tumor revelam um papel duplo: por um lado, linfócitos T citotóxicos e células NK reconhecem antígenos tumorais e desencadeiam lise celular, atuando como barreira antitumoral; por outro, subpopulações regulatórias e linfócitos em estado de exaustão favorecem um microambiente imunossupressor (Friman *et al.*, 2017; Chen; Mellman, 2017).

Nesse contexto, a ativação plaquetária também contribui de forma decisiva, uma vez que as plaquetas liberam mediadores inflamatórios, fatores de crescimento, TGF- β , VEGF e ATP, promovendo angiogênese, remodelamento da matriz extracelular e disseminação metastática (Franco; Corken; Ware, 2015). Além disso, a interação direta entre plaquetas e

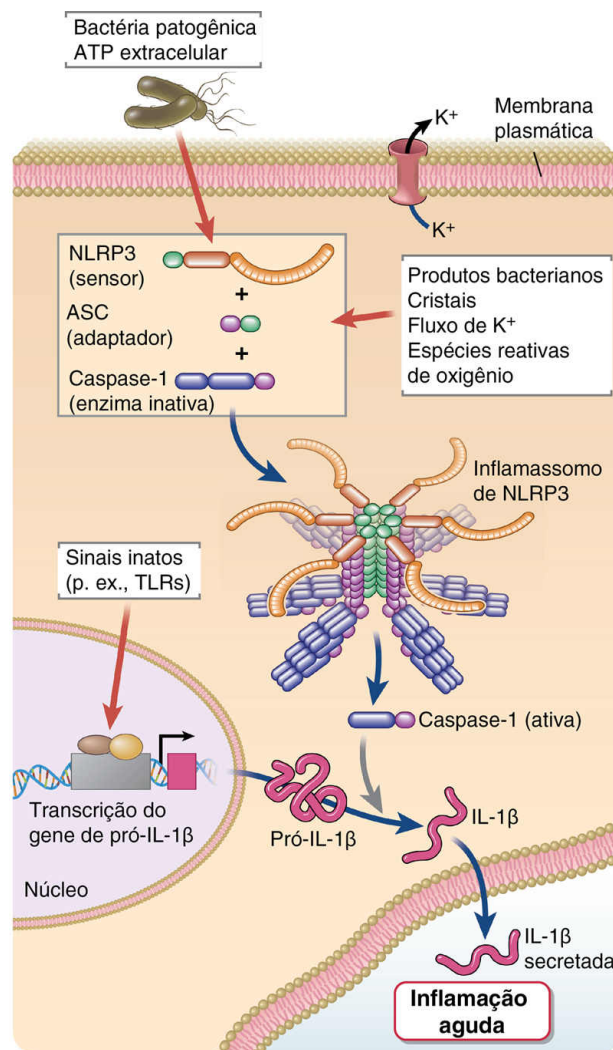
células tumorais protege estas últimas contra o ataque imunológico e facilita sua adesão ao endotélio durante a circulação, bem como a colonização de sítios metastáticos (Labelle; Begum; Hynes, 2011). Assim, tanto linfócitos quanto plaquetas desempenham funções que podem ser antagônicas, mas que, no balanço global, tendem a favorecer o avanço do tumor, configurando-se como importantes marcadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos (Buergy *et al.*, 2012; Mei *et al.*, 2014).

Diversos estudos destacam a relação entre a elevada expressão de enzimas geradoras de adenosina ou de seus receptores com a piora na progressão tumoral (Di Virgilio, 2012). A atividade aumentada de CD39 está correlacionada a estágios avançados da doença (estadiamento TNM) e a prognósticos desfavoráveis em diferentes tipos de tumores, desempenhando papel crucial tanto no início da angiogênese quanto na progressão da neovascularização. Além disso, altos níveis de células CD4⁺ e CD8⁺ no TME podem estar associados à progressão tumoral ou ao desenvolvimento de resistência às terapias (Kunzli *et al.*, 2011). No contexto tumoral, no qual ATP e AMP são continuamente liberados no espaço extracelular, a atividade da CD73 é intensificada, contribuindo para a criação de um microambiente imunossupressor e pró-tumoral (Li *et al.*, 2024).

Biomarcadores intratumorais relacionados à atividade de CD73 também são associados a uma evolução desfavorável em diversos tipos de neoplasias (Kuzli *et al.*, 2011). Nessa conjuntura, a CD73 pode interagir com componentes da matriz extracelular, como fibronectina e laminina, favorecendo a motilidade das células cancerígenas. Essa interação contribui para a disseminação celular e reforça a metástase na progressão tumoral (Li *et al.*, 2024). Ademais, o eixo CD39/CD73, presente em células imunes associadas ao tumor, desempenha papel central no esgotamento imunológico, prejudicando a resposta imune antitumoral. Esse comprometimento do sistema imunológico favorece a progressão tumoral, reforçando a relevância dessas enzimas no TME (Hesse *et al.*, 2024).

O estudo das implicações do sistema purinérgico em diferentes tipos de tumores tem se consolidado como uma ferramenta crucial para a compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes (Di Virgilio; Adinolfi, 2017). O ATP, liberado por células neoplásicas disfuncionais após dano celular, contribui para o estabelecimento de um processo inflamatório crônico ao ativar receptores purinérgicos — principalmente P2X7 — em células imunes e tumorais. Esse mecanismo pode levar à ativação do inflamassoma NLRP3 e à subsequente secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, promovendo um ambiente pró-tumorigênico e favorável à progressão tumoral (Pelegrin; Surprenant, 2009; Kumari *et al.*, 2016).

Figura 3 - Ativação do inflamassoma NLRP3



Fonte: Abbas; Lichtman; Pillai (2019).

Figura 3 - A ativação do inflamassomo NLRP3, que processa pró-IL-1 em IL-1 ativa. Os inflamassomos com outras proteínas NLRP atuam similarmente. Vários PAMPs ou DAMPs induzem expressão de pró-IL-1 β via sinalização de receptor de reconhecimento de padrão. ASC, proteína do tipo speck associada à apoptose contendo CARD; IL-1, interleucina-1.

Além disso, alguns neurônios pertencentes aos sistemas nervosos magnocelular, parvocelular e autônomo co-secretam ATP, enquanto células endócrinas ou as estruturas ao seu redor, também podem liberá-lo (Hesse *et al.*, 2024). No meio extracelular, o ATP atua como ligante para duas famílias de receptores purinérgicos: os P2X, os quais são canais iônicos com dois domínios transmembrana (P2XR_s), e os P2Y, que possuem sete domínios transmembrana (P2YR_s) (Di Virgilio, 2012). Ambos os receptores são amplamente expressos em diversas células endócrinas, desempenhando papéis fundamentais em processos celulares e na comunicação intercelular (Li *et al.*, 2024).

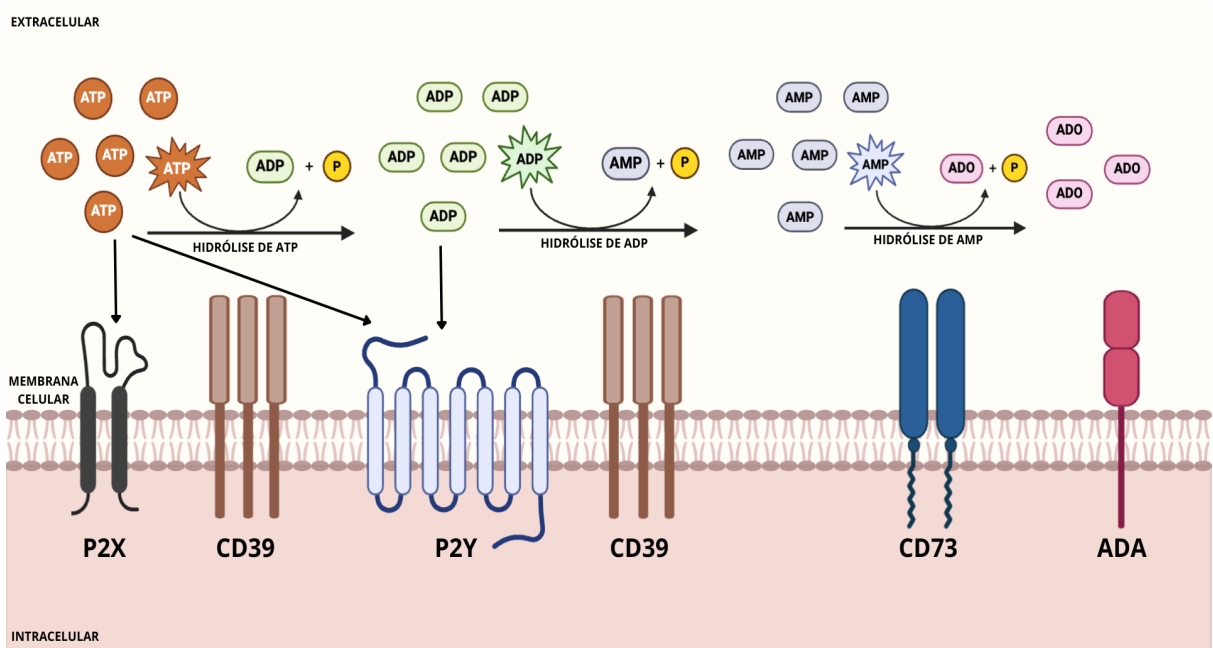
Outrossim, a sinalização purinérgica mediada pelo ATP e pelos receptores P2X exerce papel crucial na regulação da atividade celular em PitNETs, influenciando tanto o controle das células endócrinas quanto a modulação da secreção hormonal (Di Virgilio, 2012). O ATP, juntamente com ADP e adenosina, atua como agonista natural, gerando efeitos variados na sinalização do cálcio intracelular, a depender do subtipo de receptor purinérgico expresso (Manica; Bagatini, 2021). Os receptores P2X são canais iônicos cuja ativação pelo ATP promove influxo de cálcio, regulando a liberação hormonal (Di Virgilio, 2012). A presença de subunidades como P2X2, P2X3, P2X4, P2X6 e P2X7 em células hipofisárias sugere um papel direto desses receptores na fisiologia hipofisária e na homeostase endócrina, por meio da regulação da secreção hormonal (Li *et al.*, 2024).

No contexto dos PitNETs, a ativação excessiva ou desregulada dos receptores P2X pode estar associada tanto ao crescimento tumoral quanto a alterações na secreção hormonal, características frequentemente observadas nesses tumores (Costa *et al.*, 2022). Estudos apontam a expressão de receptores específicos — como P2X2 em terminais neuro-hipofisários e células gonadotróficas, e P2X4 em células lactotróficas — evidenciando que os efeitos do ATP e do ADP variam entre os diferentes tipos celulares da hipófise (Li *et al.*, 2024).

A ativação desses receptores em células tumorais pode desencadear sinais que estimulam a proliferação celular por meio de vias de sinalização intracelular que favorecem a sobrevivência e a divisão celular (Stojilkovic *et al.*, 2010). No entanto, a identificação detalhada dos receptores em outros tipos celulares, como somatotróficas, corticotróficas e tireotróficas, ainda é limitada, ressaltando a necessidade de estudos adicionais para esclarecer a relação entre a sinalização purinérgica e o desenvolvimento e progressão tumoral (Andrejew *et al.*, 2020).

Em PitNETs, a sinalização mediada pelo receptor P2X7 pode desempenhar um papel importante tanto na progressão tumoral quanto na regulação de respostas inflamatórias locais, impactando diretamente o TME (Di Virgilio, 2012). Dependendo do subtipo de receptor purinérgico expresso, essa sinalização pode modular a homeostase do cálcio intracelular de diferentes maneiras, influenciando processos, como: proliferação celular, secreção hormonal e morte celular (Costa *et al.*, 2022). Dessa forma, a sinalização purinérgica mediada por receptores P2X apresenta implicações significativas tanto na fisiologia normal da hipófise quanto na patologia associada aos PitNETs (Li *et al.*, 2024).

Figura 4 - Principais componentes da sinalização purinérgica



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 4 - O ATP é liberado no espaço extracelular, atuando nos receptores P2X e P2Y. No meio extracelular o ATP pode ser hidrolisado pela CD39, CD73 em ADP, AMP, ADO.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Este estudo transversal foi desenvolvido ao longo de janeiro de 2024. Foram incluídos 39 indivíduos residentes no município de Chapecó, oeste do estado de Santa Catarina (SC). Desse total, 17 eram pacientes (homens e mulheres), selecionados por contato prévio dos pesquisadores com o serviço de neurologia de um Hospital Regional referência no oeste de Santa Catarina, em Chapecó (SC).

Os pacientes voluntários tinham idade igual ou superior a 18 anos e diagnóstico prévio de PitNETs, conforme o departamento de neurologia/oncologia do hospital. Além disso, os pacientes selecionados foram submetidos à ressecção cirúrgica do PitNETs no período de 12 a 24 meses antes desta pesquisa.

Os pacientes incluídos neste estudo estavam em uso de medicamentos para tratar doenças de base, incluindo anti-hipertensivos, antidiabéticos, antidepressivos, inibidores da HMG-CoA redutase e levotiroxina. Vinte e dois indivíduos saudáveis, sem qualquer doença de base em tratamento, como problemas cardiovasculares, câncer, diabetes ou qualquer outra doença crônica transmissível, ou não transmissível, também foram recrutados para compor o grupo controle.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Chapecó (SC), sob protocolo n.º 6.602.966. A coleta de informações e materiais biológicos foi realizada somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Para o registro dos dados antropométricos, os participantes foram pesados e medidos com roupas leves e sem calçados. Foi utilizado uma balança digital com capacidade de 150 kg e um estadiômetro portátil. A composição corporal foi classificada com base no índice de massa corporal (IMC), seguindo a tabela de classificação para adultos da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2024), aplicável a ambos os sexos.

4.3 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Um total de 30 mL de sangue total foi coletado de pacientes em jejum e controles por profissionais qualificados. Um sistema de coleta a vácuo (Vacutainer® , BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) foi utilizado em tubos com gel separador, tubos contendo EDTA e tubos contendo citrato de sódio. O material coletado foi homogeneizado e transportado em caixa de isopor com gelo até o local de processamento.

4.4 PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO E SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)

As amostras coletadas foram processadas no laboratório de bioquímica da UFFS — Campus Chapecó (SC). O sangue coletado em tubos de citrato de sódio foi armazenado em microtubos a -80 °C até a realização das análises. O sangue armazenado nos tubos com gel separador e EDTA foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 min. Em seguida, o soro foi obtido dos tubos com gel separador, que também foi armazenado em microtubos a -80 °C até a realização das análises necessárias.

Em relação aos tubos com EDTA, foi coletada a camada leucocitária da qual foram obtidas as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), conforme protocolo estabelecido por Böyum (1968), com adaptações. Para tanto, a camada leucocitária foi diluída em solução salina (1:1). Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo cônico contendo Ficoll-Histopaque e centrifugada a 1800 rpm por 30 min. Após a centrifugação, a camada intermediária contendo as PBMCs foi coletada.

Em seguida, as células foram transferidas para um novo tubo, lavadas duas vezes com 10 mL de solução salina e centrifugadas novamente por 5 min a 1500 rpm. Quando necessário, as células foram lavadas com 5 mL de tampão hemolítico para eliminação de resíduos de hemácias, seguida de centrifugação por 5 min a 1500 rpm. Os PBMCs resultantes foram armazenados em microtubos com 600 µL de solução salina e congelados a -80 °C até que os experimentos fossem realizados para avaliar a atividade enzimática das ectonucleotidases (Leal, 2005).

5. ANÁLISE DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E INTERLEUCINA 1 β

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ECTONUCLEOTIDASES

A atividade das ectonucleotidases foi avaliada em amostras de PBMC de indivíduos controle e pacientes. Para avaliar as atividades de ATPase, ADPase e AMPase, os substratos ATP, ADP e AMP foram utilizados, respectivamente, com a medição do fosfato inorgânico (Pi) produzido como resultado da atividade hidrolítica no final de cada reação. Assim, após os ajustes de proteína, 20 μ L de cada amostra de PBMC foram adicionados a uma mistura de reação de cada enzima e pré-incubados a 37 °C por 10 min.

A reação foi iniciada pela adição dos substratos específicos para cada enzima. Após a incubação a 37 °C por 70 min, as reações foram interrompidas pela adição de 150 μ L de ácido tricloroacético (TCA; 15%), e o fosfato inorgânico liberado devido à hidrólise, foi determinado usando verde malaquita como reagente colorimétrico. Uma curva padrão foi preparada com KH_2PO_4 . A absorbância foi medida a 630 nm, e os resultados foram apresentados como nmol/Pi/min/mg de proteína. Os resultados foram corrigidos para hidrólise não enzimática (Lunkes *et al.*, 2003; Pilla *et al.*, 1996)

5.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATP EXTRACELULAR (eATP)

Para a determinação de ATP extracelular (eATP), foi utilizado o Molecular Probes™ ATP Determination Kit (Invitrogen™, Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Cada conteúdo de reação consistiu em 1,25 μ g/mL de luciferase de vagalume, 50 μ M de D-luciferina e 1 mM de DTT em tampão de reação 1x. Em seguida, 10 μ L da amostra de soro foram misturados com 90 μ L do conteúdo da reação e incubados a 37 °C por 15 min. Após o tempo de incubação, a luminescência foi medida com um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 560 nm (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™, Waltham, MA, EUA). Uma curva padrão de ATP foi preparada em concentrações variando de 1 nM a 1 μ M. Os resultados foram expressos em nM de ATP extracelular. (Karamohamed; Guidotti, 2001).

5.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DAS AMOSTRAS

A quantificação dos níveis de proteína nas amostras foi determinada conforme o método de Bradford (1976) e ajustada conforme necessário para cada análise. Quando necessário, as amostras foram diluídas com solução salina ou conforme exigido pelos protocolos.

5.4 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foram determinados os níveis da interleucina 1 β , utilizando BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (catálogo n.º 551809), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram apresentados como picograma por mL (pg/mL).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 9.0.1 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Outliers foram analisados pelo software e removidos utilizando o Teste de Grubbs. Em relação às variáveis estudadas, as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste *T* de *Student* para dados paramétricos e teste de *Mann-Whitney* para dados não paramétricos.

As diferenças entre os subgrupos para as atividades enzimáticas foram avaliadas por meio da análise de variância de um fator (*ANOVA One-way*). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro-padrão para variáveis paramétricas e como medianas e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para variáveis não paramétricas. Diferenças com a probabilidade de rejeição da hipótese nula, com valor inferior a 5% ($p < 0,05$), foram consideradas estatisticamente significativas.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS PARTICIPANTES

A Tabela 1 apresenta as características sociodemográficas e antropométricas dos participantes desta pesquisa, incluindo idade, sexo e índice de massa corporal (IMC). A média de idade dos indivíduos do grupo PitNET foi de 57,78 anos ($\pm 13,52$), enquanto no grupo controle foi de 51,88 anos ($\pm 13,62$). Observou-se predominância do sexo feminino no grupo PitNET (64,70%; n=11), em relação ao sexo masculino (35,30%; n=6).

Em relação à composição corporal, a média do IMC dos pacientes do grupo PitNET foi de 30,70 ($\pm 7,61$) e do grupo controle foi de 28,79 ($\pm 3,50$). Analisando detalhadamente, no grupo PitNET, 29,41% (n=5) dos indivíduos eram obesos, 52,95% (n=9) apresentavam sobrepeso e 17,64% (n=3) eram eutróficos. Da mesma forma, no grupo controle, 40,90% (n=9) dos participantes eram obesos, 31,82% (n=7) estavam acima do peso e 27,28% (n=6) eram eutróficos.

Entre as principais doenças crônicas de base, a hipertensão arterial foi a mais prevalente no grupo PitNET (23,53%; n=4), seguida da associação hipertensão arterial + diabetes tipo 2 (11,76%; n=2) e hipertensão arterial + dislipidemia (11,76%; n=2). Além disso, 23,53% (n=4) dos pacientes relataram não possuir nenhuma doença crônica, enquanto outras condições isoladas ou associadas corresponderam a 5,88% (n=1). No que se refere aos hábitos de vida, o tabagismo foi identificado em 11,76% (n=2) e o etilismo em 5,88% (n=1), enquanto a maioria dos pacientes com PitNET (82,35%; n=14) relatou não apresentar maus hábitos.

Tabela 1 - Caracterização sociodemográfica e antropométrica conforme parâmetros da OMS.

CARACTERÍSTICAS	PitNET	Controles
NÚMERO AMOSTRAL	n=17	n=22
IDADE (ANOS)	57,78 ± 13,52	51,88 ± 13,62
GÊNERO (%)		
Feminino	64,70% (n=11)	50,00% (n=11)
Masculino	35,30% (n=6)	50,00% (n=11)
IMC (KG/M2)	30,70 ± 7,61	28,79 ± 3,50
Eutrofia	17,64% (n=3)	27,28% (n=6)
Sobrepeso	52,95% (n=9)	31,82% (n=7)
Obesidade	29,41% (n=5)	40,90% (n=9)
DOENÇAS CRÔNICAS DE BASE (%)		
Hipertensão arterial	23,53% (n=4)	-
Diabetes (tipo 2)	5,88% (n=1)	-
Hipotireoidismo	5,88% (n=1)	-
Dislipidemia	5,88% (n=1)	-
Hipertensão arterial + diabetes (tipo 2)	11,76% (n=2)	-
Hipertensão arterial + dislipidemia	11,76% (n=2)	-
Hipotireoidismo + depressão	5,88% (n=1)	-
Hipertensão arterial + diabetes (tipo 2) + dislipidemia + depressão	5,88% (n=1)	-
Nenhuma doença	23,53% (n=4)	-
TABAGISMO E ETILISMO (%)		
Tabagismo	11,76% (n=2)	-
Etilismo	5,88% (n=1)	-
Não fumantes e abstêmios	82,35% (n=14)	-

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

6.2 CARACTERÍSTICAS DOS TUMORES NEUROENDÓCRINOS DA HIPÓFISE

A Tabela 2 demonstra a classificação dos PitNETs dos participantes, estratificados por tipo e linhagem tumoral. Todos os casos foram macroadenomas. Os tumores gonadotróficos tiveram maior incidência (23,52%; n=4), enquanto os da linhagem celular PIT-1 concentraram o maior número de pacientes (35,30%; n=6).

Tabela 2 - Classificação tumoral de acordo com o tamanho, a linhagem celular e a produção hormonal conforme subtipo histológico

CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES	
POR TAMANHO	
Microadenoma	5,88% (n=1)
Macroadenoma	94,11% (n=16)
POR LINHAGEM CELULAR	
PIT-1	35,30% (n=6)
T-PIT	11,76% (n=2)
SF-1	23,52% (n=4)
Nenhuma linhagem celular distinta	29,41% (n=5)
POR SUBTIPO HISTOLÓGICO	
Tumor somatotrófico densamente granuloso	5,88% (n=1)
Tumor somatotrófico	17,64% (n=3)
Tumor lactotrófico esparsamente granuloso	5,88% (n=1)
Tumor lactotrófico densamente granuloso	5,88% (n=1)
Tumor corticotrófico densamente granuloso	11,76% (n=2)
Tumor gonadotrófico	23,52% (n=4)
Tumores com linhagem multi-hormonal	17,64% (n=3)
Tumores com linhagem celular-nula	11,76% (n=2)

Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

6.3 ALTERAÇÕES DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA NAS ECTONUCLEOTIDASES

Buscando identificar possíveis alterações na sinalização purinérgica, avaliamos a atividade das ectonucleotidases na hidrólise de nucleotídeos e do nucleosídeo Ado em PBMCs e em plaquetas, nos grupos controle (GC) e PitNET (GP). Assim, constatamos que o GP apresentou níveis aumentados de ATP extracelular ($p=0,0004$) em comparação ao GC (Fig. 5).

Além disso, verificamos uma redução na hidrólise de ATP em PBMCs mediada pela enzima CD39 ($p=0,0039$) em GP quando comparado com o GC (Fig. 6A). Por outro lado, observou-se um aumento significativo na hidrólise de AMP em plaquetas realizadas pela enzima CD73 ($p=0,0096$) em GP quando comparado com o GC (Fig. 7C). Apesar disso, não foram observadas diferenças de significância estatística entre os grupos para hidrólise de ADP (Fig. 6B) e AMP (Fig. 6C) em PBMCs, nem para a hidrólise de ATP (Fig. 7A) e ADP (Fig. 7B) em plaquetas.

Outrossim, analisamos a expressão gênica e proteica das enzimas purinérgicas CD39 e CD73, bem como os níveis de IL-1 β . Nesse caso, verificamos um aumento significativo ($p=0,0349$) na expressão gênica de CD73 (Fig. 8B), acompanhado de aumento da expressão proteica ($p=0,0013$) (Fig. 8D). Também foi observado aumento altamente significativo da expressão proteica de CD39 ($p<0,0001$) no GP em comparação ao GC (Fig. 8C). Ademais, registramos elevação significativa nos níveis de IL-1 β ($p=0,0017$) no GP em relação ao GC (Fig. 9).

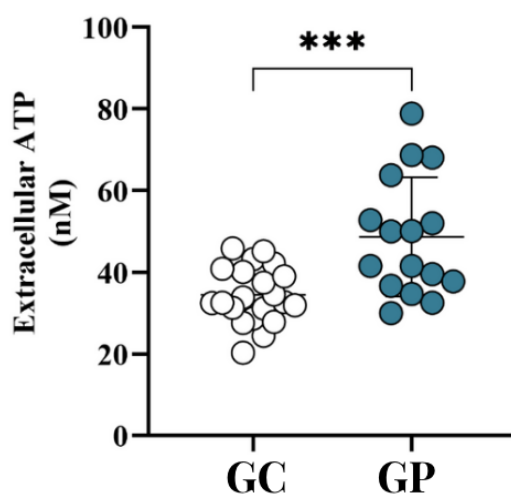


Figura 5 - A imagem demonstra os níveis de ATP extracelular em amostra sanguínea de GC e GP. Os dados são apresentados como erro padrão médio. Análise estatística: ANOVA One-Way. IC 95% foram considerados estatisticamente significativos. *** $p=0,0004$.

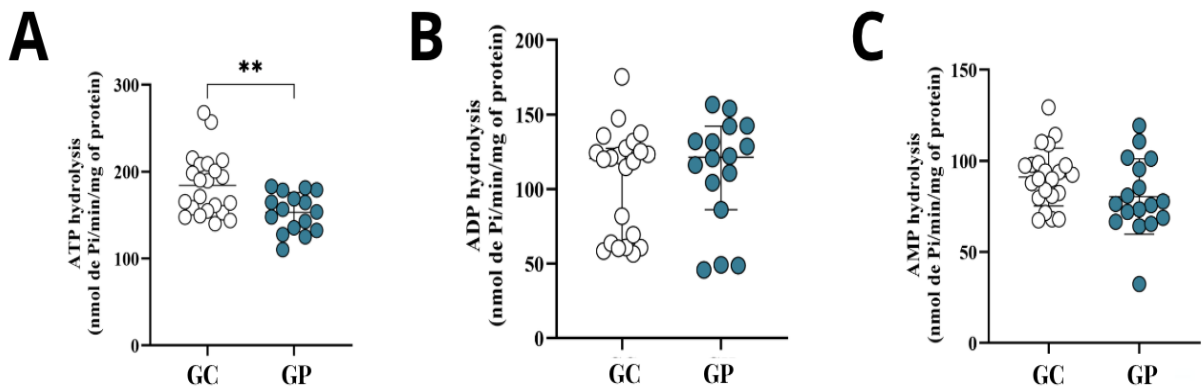


Figura 6 - As imagens demonstram atividade das enzimas purinérgicas CD39 e CD73 em PBMCs em GP comparado ao GC. As imagens demonstram a atividade da enzima CD39 para a hidrólise de ATP (A) e ADP (B) em PBMCs e a atividade da CD73 para a hidrólise de AMP (C). A análise estatística: ANOVA One-Way. IC 95% foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados em A foram expressos como erro padrão médio, (n=22) para GC, (n= 16) para GP; $**p=0.0039$. Os resultados em B foram expressos como erro padrão médio, (n=22) para GC, (n= 16) para GP; $p=0.6933$. Os resultados em C foram expressos como erro padrão médio, (n=22) para GC, (n= 17) para GP; $p=0.0757$.

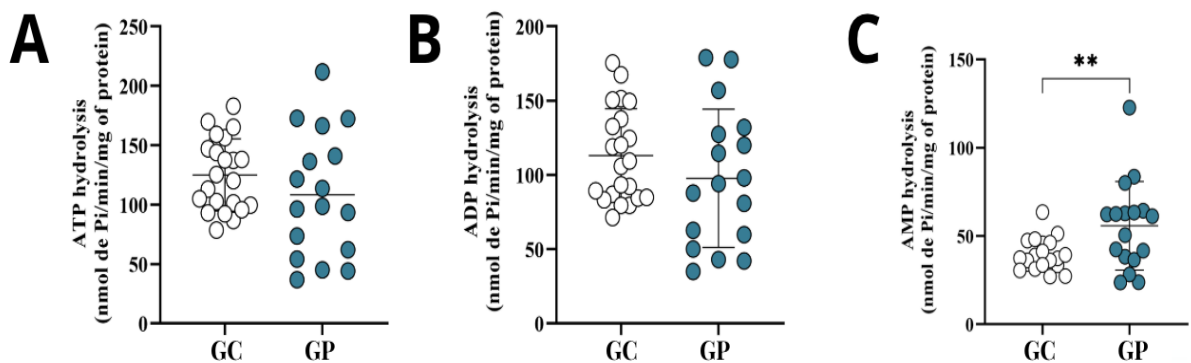


Figura 7 - As imagens demonstram atividade das enzimas purinérgicas CD39 e CD73 em plaquetas em GP comparado ao GC. As imagens demonstram a atividade da CD39 para a hidrólise de ATP (D) e ADP (E) e a atividade da CD73 para a hidrólise de AMP (F). A análise estatística: ANOVA One-Way. IC 95% foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados em D foram expressos como erro padrão médio, (n=22) para GC, (n= 17) para GP; $p=0.2160$. Os resultados em E foram expressos como erro padrão médio, (n=22) para GC, (n= 17) para GP; $p=0.2259$. Os resultados em F foram expressos como erro padrão médio, (n=20) para GC, (n= 17) para GP; $**p=0.0096$.

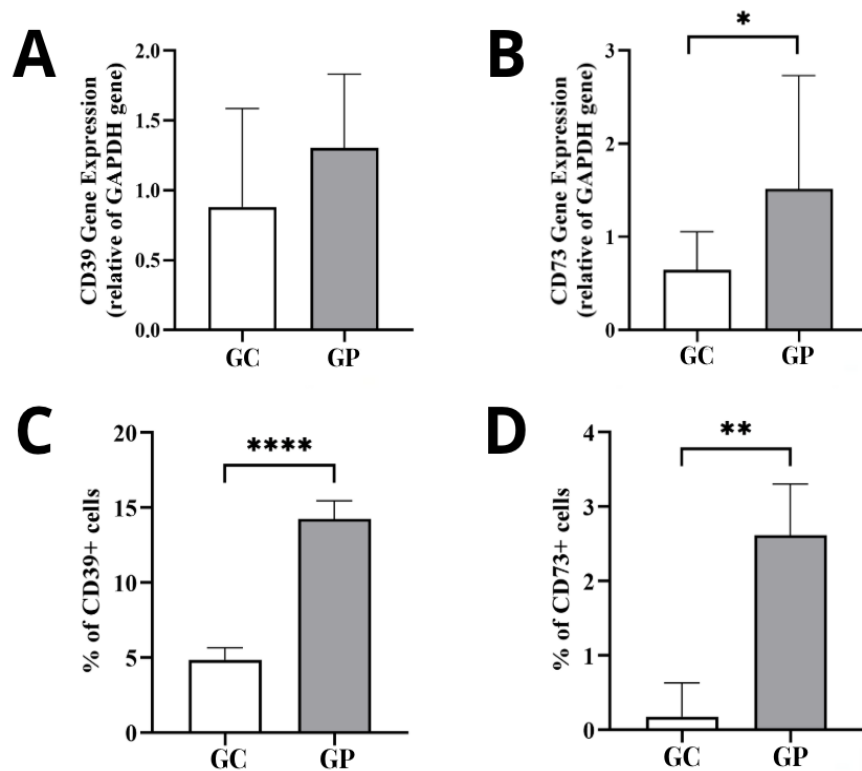


Figura 8 - As imagens demonstram a expressão gênica e expressão proteica das enzimas purinérgicas CD39 e CD73 em GC e GP. As imagens mostram a expressão gênica das enzimas purinérgicas CD39 (A) e CD73 (B), bem como a expressão proteica das enzimas purinérgicas CD39 (C) e CD73 (D). A análise estatística: ANOVA one-way. IC 95% foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados em A foram expressos como erro padrão médio, (n=9) para GC, (n=6) para GP; $p=0.2334$. Os resultados em B foram expressos como erro padrão médio, (n=9) para GC, (n=8) para GP; $p=0.0349$. Os resultados em C foram expressos como erro padrão médio, (n=12) para GC, (n=9) para GP; **** $p=0.0001$. Os resultados em D foram expressos como erro padrão médio, (n=9) para GC, (n=9) para GP; ** $p=0.0013$.

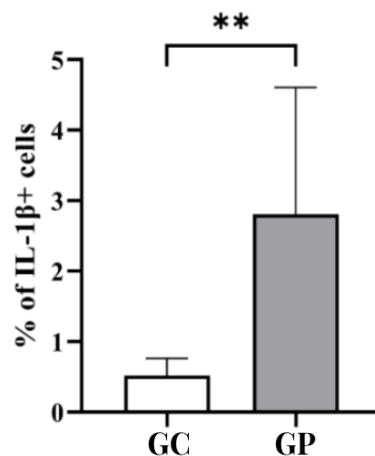


Figura 9 - A imagem demonstra o resultado dos níveis de Interleucina-1 β por citometria de fluxo, em grupo controle e grupo PitNETs. A análise estatística: ANOVA One-Way. IC 95% foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como erro padrão médio, (n=9) para GC, (n=9) para GP; ** $p=0.0017$.

Tabela 3 - Síntese dos resultados da atividade, expressão gênica e proteica das enzimas purinérgicas e níveis de IL-1 β em pacientes submetidos a ressecção cirúrgica e em controles

Análise das enzimas purinérgicas CD39, CD73 e da IL-1 β	Erro padrão no grupo Controles	Erro padrão no grupo PitNET	p-Valor
Níveis de ATP Extracelular	1.501	3.653	***0,0004
Hidrólise de ATP em PBMCs	7.511	5.665	**0,0039
Hidrólise de ATP em plaquetas	6.462	12.77	0,2160
Hidrólise de ADP em PBMCs	7.511	9.109	0,6933
Hidrólise de ADP em plaquetas	6.723	11.29	0,2259
Hidrólise de AMP em PBMCs	3.390	5.022	0,0757
Hidrólise de AMP em plaquetas	2.005	6.076	**0,0096
Expressão gênica de CD39	0.2351	0.2153	0,2334
Expressão gênica de CD73	0.1738	0.3040	*0,0349
Expressão proteica de CD39	0.7998	1.232	****< 0,0001
Expressão proteica de CD73	0.09221	0.6880	**0,0013
Níveis de IL-1 β	0.07983	0.5999	**0,0017

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

7 DISCUSSÃO

O perfil sociodemográfico e clínico-patológico dos participantes deste estudo revelou que a média de idade entre os pacientes diagnosticados com PitNET foi de 57,78 anos ($\pm 13,52$). Além disso, o IMC médio foi de 30,70 ($\pm 7,61$) indicando obesidade como comorbidade relevante, condição reconhecida como fator de risco para o surgimento de diversos tipos de neoplasias, incluindo tumores hipofisários (Avgerinos *et al.*, 2019). Outro achado importante foi a elevada frequência de hipertensão arterial isolada ou associada ao diabetes mellitus, visto que a obesidade e a síndrome metabólica causam alterações endócrino-metabólicas que favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de tumores (OMS, 2024).

É importante destacar que o excesso de tecido adiposo promove um estado inflamatório crônico de baixo grau, caracterizado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas, contribuindo para resistência à insulina, disfunção endotelial e alterações no microambiente tumoral. Esse cenário favorece a proliferação celular, a progressão de neoplasias e impacta negativamente o prognóstico, além de dificultar o tratamento (Iyengar *et al.*, 2016). Nesse sentido, destaca-se a relevância da prevenção por meio da erradicação de maus hábitos.

Outrossim, do ponto de vista histopatológico, os PitNETs são classificados em tumores neuroendócrinos da hipófise não funcionantes e tumores neuroendócrinos secretores (Melmed *et al.*, 2022). Estes últimos incluem prolactinomas, corticotropinomas, somatotropinomas, tireotrofinomas, gonadotropinomas e adenomas pluri hormonais, definidos com base no hormônio secretado, na celularidade, no tamanho e nas alterações estruturais decorrentes da atividade hormonal (Setton *et al.*, 2022). Desse modo, estudos demonstram que os PitNETs secretores correspondem a aproximadamente dois terços do total de PitNETs, sendo os prolactinomas os tumores que apresentam maior incidência, representando aproximadamente 40% do total dos tumores secretores, seguidos pelos tumores gonadotróficos e somatotróficos. (Costa *et al.*, 2024).

Nesse contexto, no presente estudo, observamos maior incidência em tumores classificados como macroadenomas, com predominância da linhagem celular PIT-1 e do subtipo histológico gonadotróficos. Esses achados corroboram com estudos prévios, que relatam a predominância de macroadenomas gonadotrópicos derivados de células de linhagem PIT-1 (Melmed *et al.*, 2024; Costa *et al.*, 2024). Além disso, vale ressaltar a maior incidência dos tumores secretores em indivíduos entre 30 e 60 anos, com prevalência do sexo feminino,

achado compatível com dados epidemiológicos que apontam maior frequência em mulheres na faixa etária entre 20 a 50 anos (Mete *et al.*, 2018)

No que se refere ao metabolismo extracelular das purinas, avaliamos a atividade enzimática de CD39 e CD73 em PBMCs e plaquetas, além de expressão gênica por RT-PCR e proteica por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram aumento significativo dos níveis séricos de ATP extracelular no grupo PitNET em comparação ao controle. O ATP, em condições fisiológicas, permanece predominantemente em meio intracelular; contudo, em situações de necrose, hipóxia ou estresse metabólico, ele é liberado para o meio extracelular, onde atua como DAMP (damage-associated molecular pattern), ativando células do sistema imune (Di Virgilio *et al.*, 2018).

Esses achados são corroborados por Feng *et al.* (2011), que relacionaram altas concentrações de ATP extracelular à lise tumoral e à redução da atividade da CD39. Com base nisso, e no desequilíbrio fisiológico decorrente da doença, seria esperado que, após a ressecção cirúrgica, os níveis séricos de ATP extracelular retornassem a valores basais, em razão da remoção do fator desencadeador das alterações homeostáticas (Di Virgilio; Sarti; Coutinho-Silva, 2020). No entanto, em nosso estudo, o ATP extracelular manteve-se elevado mesmo após a ressecção cirúrgica transesfenoidal hipofisária, o que sugere que, mesmo com a remoção dos PitNETs, os pacientes podem continuar apresentando um processo pró-inflamatório residual, refratário ao procedimento.

Outrossim, o ATP extracelular exerce sua principal ação por meio da ativação do receptor P2X7, expresso em macrófagos, monócitos e outras células imunocompetentes (Ferley *et al.*, 2020). A ligação do ATP a esses receptores provoca influxo de íons, alteração na permeabilidade de membrana e ativação do inflamassoma NLRP3, complexo multiproteico responsável pela detecção de sinais de perigo celular, resultando na secreção de citocinas (Martínez-García *et al.*, 2019). Consequentemente, a ativação do inflamassoma leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras e ativação da caspase-1, que processa a pró-IL-1 β em IL-1 β madura, promovendo a proliferação de linfócitos e intensificando a resposta imune, desse modo, ampliando a inflamação local e sistêmica (Zhang; Mosser, 2008).

Nesse contexto, tais achados corroboram com nossos resultados, que evidenciaram aumento significativo de IL-1 β . Dados semelhantes foram descritos em pesquisa envolvendo alguns tumores cerebrais, como os gliomas, onde ocorreu aumento persistente da produção de IL-1 β , desencadeando uma resposta pró-inflamatória associada a angiogênese, o remodelamento da matriz extracelular, a evasão da resposta imune e a progressão neoplásica (Chen *et al.*, 2025).

A interação entre IL-1 β e a sinalização purinérgica pode favorecer o crescimento tumoral e a resistência terapêutica, uma vez que essa interleucina exerce papel multifacetado na progressão tumoral e na modulação da inflamação (Pelegriin; Surprenant, 2009). Nesse cenário, nossos achados reforçam essa hipótese, pois os elevados níveis de ATP extracelular foram acompanhados de aumento significativo de IL-1 β (Di Virgilio *et al.*, 2018; Martínez-García *et al.*, 2019). Assim, alterações persistentes nas vias purinérgicas descritas em PitNETs e outros tumores sólidos, têm sido associados a maior agressividade e recorrência, reforçando seu potencial como marcador de mau prognóstico, ajudando a explicar as altas taxas de recidiva observadas após a ressecção cirúrgica de PitNETs.

Em concordância, Manica *et al.* (2015) relata efeito pró-inflamatório residual em melanomas cutâneos, caracterizado por redução da hidrólise de ATP, ADP e AMP associada à menor atividade das ATPases nos pacientes avaliados. Nessa conjuntura, esse estudo reforça que embora a maior disponibilidade de ATP extracelular esteja ocorrendo e favoreça a atividade de CD39 com a alta concentração de substrato, ocorreu a manutenção da cascata inflamatória. Além disso, a alteração na expressão gênica de CD39 e CD73, corrobora para a permanência do processo inflamatório (Michaud *et al.*, 2011; Pietrocola *et al.*, 2016).

Nesse caso, estudos indicam que a alta disponibilidade de ATP extracelular pode favorecer a atividade da CD39 devido à alta concentração de substrato, porém, em algumas condições, o ATP extracelular elevado pode inibir a atividade de CD39 (Di Virgilio; Adinolfi, 2017). Isso ocorre porque altas concentrações de ATP podem saturar a enzima, reduzindo sua capacidade de metabolizar o ATP eficientemente (Kepp *et al.*, 2021; Yegutkin; Boison, 2022). Além disso, o excesso de ATP pode ativar vias inflamatórias alternativas, que competem com a função reguladora da CD39, contribuindo para um estado inflamatório persistente (Costa *et al.*, 2022). Esses achados sugerem que determinados tumores podem liberar moléculas na circulação sistêmica capazes de gerar microambientes favoráveis às recidivas tumorais.

Ademais, considerando o papel das ectonucleotidases no controle dos níveis de ATP, avaliamos a atividade das enzimas purinérgicas CD39 e CD73 em PBMCs e plaquetas no grupo PitNET e controles. Desse modo, convergente com altos níveis de ATP, foi observado uma redução significativa na hidrólise de ATP pela enzima CD39 em PBMCs nos pacientes deste estudo, justificando os níveis aumentados de ATP extracelular. Em contraste, verificou-se aumento significativo na hidrólise de AMP nas plaquetas, realizada pela enzima CD73. Nessa conjectura, pesquisa recente com pacientes em estágio inicial de câncer de bexiga demonstrou resultados semelhantes, relacionando o avanço tumoral e a invasão tecidual ao aumento da hidrólise de nucleotídeos e da atividade das ectonucleotidases (Hesse

et al., 2024). Assim, a maior disponibilidade de ATP extracelular pode favorecer a atividade máxima de CD39, haja vista a presença de substrato em elevadas concentrações, reforçando o papel da atividade das enzimas purinérgicas com a progressão tumoral (Kunzli *et al.*, 2007; Morello *et al.*, 2021). Todos esses achados indicam que os pacientes no grupo PitNET tiveram alterações na sinalização purinérgica com a cascata em direção ao acúmulo de ATP extracelular.

Além disso, o ADP tem sua importância no processo de sinalização purinérgica, desempenhando funções sinalizadoras endógenas em casos de dano celular, induzindo a agregação plaquetária (Di Virgilio, 2012). Nessa conjectura, segundo Morello *et al.* (2021), as altas concentrações de ADP são comumente encontradas em estágios tumorais avançados, especialmente em fases metastáticas, estimulando a formação de trombos. Nesse contexto, os pacientes deste estudo provavelmente não devem apresentar riscos trombóticos provenientes da alteração de ADP, haja vista que esse nucleotídeo está sendo amplamente hidrolisado a AMP. Desse modo, entende-se que as células cancerígenas podem criar um microambiente favorável à sua manutenção desse processo por meio da liberação aumentada de ATP por células tumorais apoptóticas e linfócitos infiltrantes (Kunzli *et al.*, 2011).

Outrossim, também verificamos aumento significativo da expressão gênica e proteica em CD73, bem como o aumento consideravelmente significativo da expressão proteica de CD39 no grupo PitNET em relação ao controle. O aumento da expressão gênica de CD73 pode estar associado a ambientes inflamatórios ou hipóxicos, nos quais a geração de adenosina favorece a homeostase tecidual (Di Virgilio *et al.*, 2018). A produção elevada de adenosina pode induzir feedback positivo sobre a expressão de CD39 em células imunes, como mecanismo regulatório da inflamação (Michaud *et al.*, 2011;). Isso ocorre porque a geração de adenosina a partir do AMP (mediado por CD73) pode estimular a expressão de CD39 em células imunes, buscando regular a inflamação (Di Virgilio *et al.*, 2018). Estudos têm revelado, que a superexpressão de CD39 em células malignas está associada com uma imunidade antitumoral prejudicada (Pietrocola *et al.*, 2016) e a superexpressão da CD73 foi relacionada ao aumento da capacidade de invasão e potencial metastático (Gao *et al.*, 2017).

Nesse cenário, estudo recente demonstrou que em tumores sólidos, como câncer de bexiga, adenocarcinoma de pâncreas e glioblastoma, apresentam baixa expressão das ATPases, enquanto as linhagens de câncer de bexiga e glioblastoma apresentaram alta expressão de enzimas do eixo CD39/CD73 (Hesse *et al.*, 2024), o que corrobora com nosso estudo, pois, assim como os glioblastomas, os tumores relacionados ao sistema nervoso evidenciaram aumento na hidrólise de AMP, e consequentemente a isso, elevação nos níveis

de adenosina. Além disso, altos níveis de enzimas geradoras de adenosina ou de receptores de adenosina são relacionados a pior prognóstico, estando associado a progressão do câncer (Pulte *et al.*, 2011).

Dessa forma, podemos concluir que o aumento da expressão protéica e gênica de CD73 e CD39 está intimamente relacionado à regulação da hidrólise de ATP e AMP, influenciando os níveis de nucleotídeos extracelulares e a resposta imune. Essa interação complexa tem implicações significativas na fisiologia e na patologia, destacando a importância do metabolismo de nucleotídeos na modulação da inflamação e na homeostase imunológica. Assim, a manipulação dessas vias pode constituir estratégia terapêutica promissora para restaurar a função imune e controlar os processos inflamatórios observados neste estudo.

Por fim, os achados reforçam a necessidade de acompanhamento prolongado em pacientes com PitNETs, uma vez que a desregulação da sinalização purinérgica pode contribuir para a recorrência tumoral. Ademais, ressalta-se a importância de novas investigações voltadas a elucidar os efeitos dessa via em outros tumores neuroendócrinos, ampliando a compreensão dos mecanismos envolvidos e favorecendo o desenvolvimento de estratégias de manejo clínico mais eficazes e individualizados.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações observadas na expressão e a atividade das enzimas CD39 e CD73, associado ao aumento nos níveis de IL-1 β , podem contribuir para o desequilíbrio nos níveis de ATP extracelular e de AMP, favorecendo a formação de um microambiente tumoral supressor ou promotor carcinogênese. Assim, em condições patológicas, como tumores e doenças inflamatórias, esses processos podem induzir um perfil inflamatório sistêmico que estimula tanto a imunossupressão quanto a progressão tumoral, em decorrência das mudanças na concentração dessas moléculas e da alteração da atividade das enzimas purinérgicas.

Além disso, a ampla hidrólise de AMP em plaquetas, observada no estudo, sugere um efeito protetor contra distúrbios trombóticos, ao promover a formação de adenosina, molécula com propriedade vasodilatadora e antiagregante plaquetário. Essa dinâmica indica que a atividade purinérgica plaquetária pode contribuir para a manutenção da homeostase vascular, podendo reduzir o risco de eventos tromboembólicos. Todavia, o aumento de adenosina no microambiente tumoral tem efeitos imunossupressores, razão pela qual o impacto clínico global deve ser interpretado à luz de outros determinantes hemostáticos e inflamatórios.

Nesse contexto, observou-se ainda que, mesmo após a ressecção cirúrgica transesfenoidal do PitNET — considerada a principal abordagem terapêutica resolutiva e à qual os participantes do estudo foram submetidos —, persistiu a desregulação da sinalização purinérgica. Em conjunto, esses achados reforçam a possibilidade de recorrência tumoral ao longo da vida, uma vez que tais alterações configuram potenciais marcadores de mau prognóstico. Ressalta-se também a possibilidade de doença residual, visto que, além da elevada taxa de recidiva observada nos cinco primeiros anos após a intervenção cirúrgica, também foram identificadas alterações persistentes na sinalização purinérgica.

Por fim, os biomarcadores identificados neste estudo evidenciam-se promissores como ferramentas de apoio na prática clínica, contribuindo tanto para o monitoramento quanto para o planejamento terapêutico. Ressalta-se, porém, que ainda são escassos os estudos que abordam de forma abrangente esse tipo de tumor, necessitando, desse modo, de novos estudos longitudinais e prospectivos, com acompanhamento pós-cirúrgico dos pacientes, a fim de avaliar as taxas de recorrência e o prognóstico desses biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- ALMALKI, M. et al. Contemporary management of clinically non-functioning pituitary adenomas: a clinical review. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**, v. 13, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1177/1179551420932921.
- ANDREJEW, R. et al. O receptor P2X7: centro central das doenças cerebrais. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 124, 2020. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00124.
- ASA, S. L. et al. Visão geral da classificação de tumores hipofisários da OMS de 2022. **Endocrine Pathology**, v. 33, n. 1, p. 6-26, 2022. DOI: 10.1007/s12022-022-09708-5.
- BUERGY, D.; WENZ, F.; GRODEN, C.; BROCKMANN, M. A. Tumor–platelet interaction in solid tumors. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 12, p. 2747-2760, 2012.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p. 364-373, 2002.
- CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. **Nature**, v. 541, n. 7637, p. 321-330, 2017. DOI: 10.1038/nature21349.
- CHEN, Z. et al. Surgical approaches to pituitary adenomas. **Pituitary Surgery Handbook**, v. 5, n. 2, p. 127-140, 2018.
- CHEN, Z. et al. A paracrine circuit of IL-1 β /IL-1R1 between myeloid and tumor cells drives genotype-dependent glioblastoma progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 133, n. 10, p. e161289, 2023. DOI: 10.1172/JCI161289.
- COSTA, A. P. A. et al. Revisão de literatura: participação do sistema purinérgico em processos neuroinflamatórios. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 26, n. 2, p. 112-119, 2022.
- DALY, A.; BECKERS, A. The epidemiology of pituitary adenomas. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 347-355, 2020.
- DAY, P.; LAVIN, N.; BANNISTER, W.; JENKINS, P. J. Prevalence of clinically non-functioning pituitary adenomas in the community: a UK experience. **Pituitary**, v. 19, n. 3, p. 292-295, 2016. DOI: 10.1007/s11102-015-0713-y.
- DE SOUSA, S. M. et al. Pituitary tumours: molecular and genetic aspects. **Journal of Endocrinology** [Internet], v. 257, n. 3, 2023. Disponível em: <https://joe.bioscientifica.com>.
- DI VIRGILIO, F. Purines, purinergic receptors, and cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441-5447, 2012. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1600.
- DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. **Oncogene**, v. 36, p. 293-303, 2017. DOI: 10.1038/onc.2016.206.

DI VIRGILIO, F.; VUERICH, M.; SARTI, A. C.; et al. Purinergic signaling in inflammation and cancer. **Immunological Reviews**, v. 280, n. 1, p. 197-208, 2018.

DI VIRGILIO, F.; SARTI, A. C.; COUTINHO-SILVA, R. Purinergic signalling, DAMPs, and inflammation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 5, p. C832-C835, 2020. DOI: 10.1152/ajpcell.00053.2020.

DI VIRGILIO, F.; SARTI, A. C.; FALZONI, S.; DE MARCHI, E.; ADINOLFI, E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 18, n. 7, p. 601-618, 2018. DOI: 10.1038/s41568-018-0037-0.

DRUMMOND, J.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J.; SOARES, L. Non-functioning pituitary adenomas. **Endotext** [Internet], 2022. Disponível em: <https://www.endotext.org>.

FENG, L. et al. Extracellular ATP and adenosine in tumor microenvironment: roles in cancer growth, metastasis, and immunity. **Cancer Letters**, v. 317, n. 1, p. 1-7, 2011.

FERLEY, J. et al. The role of extracellular ATP in pituitary neuroendocrine tumor progression: implications for inflammation and carcinogenesis. **Endocrine-Related Cancer**, v. 27, n. 4, p. 215-230, 2020. DOI: 10.1530/ERC-19-0492.

FIGUEIREDO, C. R. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 3, p. 55, 2019. Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa. DOI: 10.5935/1676-2444.20190010.

FRANCO, A. T.; CORKEN, A.; WARE, J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. **Blood**, v. 126, n. 5, p. 582-588, 2015.

FRIDMAN, W. H.; ZITVOGEL, L.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; KROEMER, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 12, p. 717-734, 2017. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.101.

GAO, Z. W. et al. CD73 promotes tumor cell proliferation by regulating the EGFR/ERK pathway in human breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 54061-54070, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.18031.

HO, K. K. Y. et al. A proposed clinical classification for pituitary neoplasms to guide therapy and prognosis. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 209-214, 2024. DOI: 10.1016/S2213-8587(23)00457-5.

HESSE, J. et al. Intercellular crosstalk shapes purinergic metabolism and signaling in cancer cells. **Cell Reports**, v. 1, 2024. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113643.

KARAMOHAMED, S.; GUIDOTTI, G. Bioluminometric method for real-time detection of ATPase activity. **BioTechniques**, v. 31, n. 2, p. 420-425, 2001. DOI: 10.2144/01312rr04.

KARMAKAR, M.; KATSNELSON, M. A.; DUBYAK, G. R.; et al. NLRP3 inflammasome activation by extracellular ATP in primary human monocytes is dependent on P2X7 receptor, potassium efflux, and calcium influx. **Journal of Immunology**, v. 197, n. 2, p. 465-476, 2016.

KEPP, O. et al. ATP and cancer immunosurveillance. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 13, e108255, 2021. DOI: 10.15252/embj.2021108255.

KUMARI, N. et al. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 11553-11572, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-5098-7.

KUNZLI, B. et al. Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 2, p. 231-241, 2011. DOI: 10.1007/s11302-011-9228-5.

LA ROSA, S.; UCCELLA, S. Classification of neuroendocrine neoplasms: lights and shadows. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 22, n. 3, p. 527-538, 2021. DOI: 10.1007/s11154-020-09589-x.

LEDDEROSE, S. et al. P2X1 and P2X7 receptor overexpression is a negative predictor of survival in muscle-invasive bladder cancer. **Cancers**, v. 15, n. 8, p. 2321, 2023. DOI: 10.3390/cancers15082321.

LI, G. et al. Biological behavior and clinical outcome of pituitary adenomas are affected by the microenvironment. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 30, n. 5, p. e14729, 2024. DOI: 10.1111/cns.14729.

LIE, J. et al. Expression of CD39 and CD73 in the tumor microenvironment correlates with clinical outcome in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 45122-45132, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.17407.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, p. 189-194, 2003. DOI: 10.1016/S0049-3848(03)00157-9.

MANICA, A. et al. Alterations in ectonucleotidase activities and nucleotide hydrolysis in human melanoma cell lines: implications for inflammation and tumor progression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 12, p. 2816-2825, 2015. DOI: 10.1002/jcb.25225.

MANICA, A.; BAGATINI, M. Melanoma cutâneo e sistema purinérgico. In: **Sinalização Purinérgica: Implicações Fisiopatológicas**. Chapecó: UFFS, 2021. p. 156-171.

MARTÍNEZ-GARCÍA, J. J.; MARTÍNEZ-BANACLOCHA, H.; ANGOSTO-BAZARRA, D.; et al. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of inflammation and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5082, 2019.

MARTINS, E. A. et al. Tumor hipofisário: avaliação clínica e possíveis condutas cirúrgicas. **Revista Foco**, v. 16, n. 8, p. e2950, 2023. DOI: 10.54751/revistafoco.v16n8-2950.

MAYNARD, J.; SFANOS, K. P2 purinergic receptor dysregulation in urologic disease. **Purinergic Signalling**, v. 18, n. 3, p. 267-287, 2022. DOI: 10.1007/s11302-022-09875-1.

MEI, Z. et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 6, p. 1595-1605, 2014. DOI: 10.1038/bjc.2014.46.

MELMED, S. et al. Clinical biology of the pituitary adenoma. **Endocrine Reviews**, v. 43, n. 6, p. 1003-1037, 2022. DOI: 10.1210/endrev/bnac018.

MELMED, S.; KOLODNY, M. Medical management of pituitary tumors. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 3, p. 477-503, 2020. DOI: 10.1210/er.2018-00217.

MICHAUD, M. et al. Autophagy and the immune response: a double-edged sword that controls cell proliferation and death. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 517-526, 2011. DOI: 10.1038/nri3025.

MORELLO, G. et al. ATP signaling and the inflammatory microenvironment in pituitary tumors: mechanisms and therapeutic perspectives. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. e12945, 2021. DOI: 10.1111/jne.12945.

MOTA, F. M. et al. Impacto da imunohistoquímica no diagnóstico, tratamento e prognóstico dos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 2, p. e68895, 2024. DOI: 10.34119/bjhrv7n2-68895.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphatases. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 14, p. 2114-2127, 2009. DOI: 10.1038/emboj.2009.163.

PICCINI, A.; CARTA, S.; TASSI, S.; et al. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 23, p. 8067-8072, 2008.

PIETROCOLA, F. et al. Autophagy in cancer therapy: function and regulation of autophagy and its interplay with apoptosis and cell proliferation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 1, p. 11-31, 2016. DOI: 10.1038/nrd.2015.8.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase (apyrase, EC 3.6.1.5) activity in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, p. 225-230, 1996. DOI: 10.3109/09537109609023573.

PULTE, D. et al. CD39: a key regulator of purinergic signaling in thrombosis and inflammation. **Purinergic Signalling**, v. 7, n. 2, p. 255-264, 2011. DOI: 10.1007/s11302-011-9237-4.

RAAPPANA, A. et al. Incidence of pituitary adenomas in Northern Finland in 1992–2007. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4268-4275, 2010. DOI: 10.1210/jc.2010-0537.

ROBSON, S.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006. DOI: 10.1007/s11302-006-9003-y.

RUTKOWSKI, M.; ZADA, G. Management of pituitary adenomas invading the cavernous sinus. **Neurosurgical Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 445-455, 2019.

SATO, M. et al. Analysis of tumor angiogenesis and immune microenvironment in non-functional pituitary endocrine tumors. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 695, 2019. DOI: 10.3390/jcm8050695.

SETTON, L. R. A. et al. Cirurgia endoscópica endonasal transesfenoidal para tumores da hipófise, principais complicações e desafios: uma revisão de literatura para o médico generalista. **Journal Archives of Health**, v. 3, n. 7, p. 704-722, 2022.

SILVA, E.; OLIVEIRA, C.; SOUZA, L. Impacto da imunohistoquímica no diagnóstico, tratamento e prognóstico dos tumores hipofisários. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, p. 15987-16002, 2022. DOI: 10.34119/bjhrv5n3-1097.

SIMSEK BAGIR, G. et al. Knosp and Hardy grading systems are useful in predicting persistence of male hypogonadism in prolactinomas following prolactin normalization. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, 2020. DOI: 10.4274/tjem.galenos.2019.92470.

SHARIQ, O. A.; LINES, K. E. Epigenetic dysregulation in pituitary tumors. **International Journal of Endocrine Oncology**, v. 6, n. 3, p. IJE19, 2019. DOI: 10.2217/ije-2019-0005.

SHEN, K. et al. MON-LB48 genomic landscape of sporadic thyrotropinomas. **Journal of the Endocrine Society**, v. 4, suppl. 1, p. MON-LB48, 2020. DOI: 10.1210/jendso/bvaa046.626.

STOJILKOVIC, S. S. et al. Purinergic receptor and ion channel signalling in the pituitary gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 2, p. 184-191, 2010.

TRITOS, N.; MILLER, K. Diagnosis and management of pituitary adenomas: a review. **JAMA**, v. 329, n. 16, p. 1386-1398, 2023. DOI: 10.1001/jama.2023.2512.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight**. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.

XEKOUKI, P. et al. Pituitary adenoma with paraganglioma/pheochromocytoma (3PAs) and succinate dehydrogenase defects in humans and mice. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 5, p. E710-E719, 2015. DOI: 10.1210/jc.2014-4133.

YEGUTKIN, G. G.; BOISON, D. ATP and adenosine metabolism in cancer: exploitation for therapeutic gain. **Pharmacological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 799-824, 2022.

ZHANG, Y. et al. P2X7 mediates ATP-driven invasiveness in prostate cancer cells. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114371, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0114371.

ZHANG, Q.; MOSSER, D. Activation of naïve and memory T cells by ATP via the P2X7 receptor. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 7349-7358, 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.181.11.7349.

ANEXO A — Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNOCHAPECÓ COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS CURSO DE MEDICINA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar como voluntário em uma pesquisa. Após leitura e esclarecimento sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, rubricue todas as páginas e assine no final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador.

Título da pesquisa: Qualidade Assistencial a pacientes portadores de patologias neuroendocrinológicas em Chapecó e região.

Pesquisador responsável: Esp. Marielle Lang Makiyama

Endereço: Rua Fernando Machado, 615, Centro. Chapecó–SC, CEP 89803003

Telefone para contato: (49) 99811-2825

E-mail: lelilang@yahoo.com.br

O Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos, é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa em padrões éticos. O CEP/Unochapecó está localizado na própria Instituição Bloco P. Horário de funcionamento definido de segunda a sexta-feira das 8h às 12h e das 13h30min às 17h30min para contato dos pesquisadores e participantes das pesquisas. Telefone e e-mail para contato, (49) 3321-8142, cep@unochapeco.edu.br.

O objetivo desta pesquisa é analisar a qualidade assistencial prestada aos pacientes submetidos às cirurgias neuroendocrinológicas no hospital de referência regional em Chapecó/SC. Descrever a origem e a existência de seguimento clínico pós-operatório dos pacientes operados, verificar o tempo entre o diagnóstico e abordagem cirúrgica hipofisária e identificar a incidência e prevalência de patologias neuroendocrinológicas em Chapecó e região. Além disso, verificar e correlacionar os dados clínicos, histológicos e bioquímicos dos pacientes.

A sua participação na pesquisa consiste em responder um breve questionário sobre acompanhamento pós-neurocirúrgico com o neurocirurgião e/ou com um endocrinologista,

coleta de sangue e peça tumoral durante a cirurgia. Para essa pergunta poderão ser obtidas três possíveis respostas: sim (ainda acompanha), não (não acompanha) e sem seguimento atual (acompanhou por um tempo, mas perdeu seguimento). Em caso de resposta negativa será verificado o motivo da perda do seguimento terapêutico. Além disso, por meio dos contatos com os pacientes, será explicado os motivos do trabalho em questão. A sua participação poderá envolver os seguintes riscos ou desconfortos: invasão de privacidade na investigação da patologia, tratamento e seguimentos terapêuticos; responder a questões sensíveis, tais como atos ilegais, violência, sexualidade; revitimizar e perder o autocontrole e a integridade ao revelar pensamentos e sentimentos nunca revelados; discriminação e estigmatização a partir do conteúdo revelado; divulgação de dados confidenciais (registrados no TCLE); tomar o tempo do sujeito ao responder ao questionário/entrevista. Entretanto, lhe será garantida assistência imediata, sem ônus de qualquer espécie a sua pessoa, com todos os cuidados necessários à sua participação, de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem-estar físico e psicológico. Os dados obtidos através desse contato serão respeitados e analisados com cautela e responsabilidade. Todos os contatos e uso das informações obtidas serão realizados após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos — CEP/UNOCHAPECÓ. Os participantes poderão sentir algum constrangimento, timidez ou perturbação durante a coleta de medidas antropométricas, ou coleta sanguínea. Embora sejam raros, os eventos adversos graves relacionados com punção sanguínea podem incluir perda dos sentidos com crises convulsivas crônicas tônicas. Os eventos menos graves incluem dor no sítio da venipuntura, ansiedade e desmaio. Os eventos adversos mais documentados ocorrem em serviços de transfusão de sangue, onde deficiências, na prática de venopuntura ou a anormalidade anatômica resultam na produção de contusões, hematomas e lesão de estruturas anatômicas nas proximidades da entrada da agulha (WHO, 2010). A identidade de todos os pacientes do estudo será preservada. Além disso, serão observadas todas as normas e recomendações sanitárias quanto aos riscos de infecção por SARS-CoV-2, a fim de proteger contra a COVID-19 os participantes e pesquisadores envolvidos neste estudo.

Os benefícios esperados pela sua participação na pesquisa são a geração de dados importantes, desconhecidos até o momento, que poderão adequar a qualidade assistencial e gerar protocolos de cuidados desses pacientes. Ademais, evidenciar a qualidade assistencial prestada aos pacientes com patologias neuro hipofisárias submetidos a tratamento cirúrgico, sua origem, intervalo entre diagnóstico e tratamento e seu seguimento ambulatorial pós-operatório. Esse é de importância científica e social, uma vez que os dados acima não foram levantados no município de Chapecó e por não existir um fluxograma de seguimento desses pacientes após a realização da neurocirurgia. Assim sendo, o trabalho aqui descrito surtirá material teórico-científico para os profissionais da área de saúde, podendo contribuir para que a medicina baseada em evidência seja cada vez mais frequente e referência procedimentos e protocolos assistenciais, auxiliando profissionais da saúde a aperfeiçoar sua qualidade assistencial. Além disso, o conhecimento de novos marcadores relacionados ao surgimento e progressão das doenças é de suma importância para um melhor prognóstico.

As informações obtidas através da coleta de dados e amostras biológicas serão utilizadas para alcançar os objetivos acima propostos, e para a composição do relatório de pesquisa, resguardando sempre sua identidade durante todas as fases da pesquisa. Ao término da pesquisa, os resultados obtidos serão retornados a sua pessoa pela apresentação do trabalho

em banca e possível publicação em revista científica. Você poderá recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, favor entrar em contato com o pesquisador responsável.

É garantido indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa a sua pessoa. Após a leitura e esclarecimento de todas as dúvidas pelo pesquisador, o TCLE deverá ser rubricado por ambos (pesquisador e pesquisado), nas duas vias em todas as folhas e assinado em seu término.

CONSENTIMENTO DA PESSOA COMO PARTICIPANTE DE PESQUISA

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos, bem como os riscos e benefícios decorrentes da minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento e ter acesso ao registro do consentimento sempre que solicitado.

Local: _____ Data ____/____/____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO B — Artigo

**DYSREGULATION OF PURINERGIC SIGNALING SUSTAINS CHRONIC
INFLAMMATION AND OXIDATIVE IMBALANCE IN PATIENTS AFTER PITNET
SURGICAL RESECTION**
**A DESREGULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA SUSTENTA A
INFLAMAÇÃO CRÔNICA E O DESEQUILÍBRIO OXIDATIVO EM PACIENTES APÓS
A RESSECÇÃO CIRÚRGICA DE PITNET**

Geile Fistarol, Luiz A. de Oliveira, Gilnei B. da Silva, Daiane Manica, Marceli C. Hanauer,
Paula Dallagnol, Rafael A. Narzetti, Maria L. Bergamini, Vitória C. de Melo, Tais Vidal,
Micheli M. Pillat, Jussara de Lima, Marcelo L. V. da Cunha, Marielle L. Makiyama, Filomena
Marafon, Anieli P. Kempka, Ariane Zamoner, Margarete D. Bagatini.

Publicado por: Int. J. Mol. Sci. 2025, 26(14), 6890; <https://doi.org/10.3390/ijms26146890>

Submissão recebida: 14 de junho de 2025 / Revisado: 13 de julho de 2025 / Aceito: 14 de
julho de 2025 / Publicado: 17 de julho de 2025.

Article

Dysregulation of Purinergic Signaling Sustains Chronic Inflammation and Oxidative Imbalance in Patients After PitNET Surgical Resection

Geile Fistarol ^{1,†}, Luiz A. de Oliveira ¹, Gilnei B. da Silva ^{2,†}, Daiane Manica ³, Marceli C. Hanauer ⁴, Paula Dallagnol ¹, Rafael A. Narzetti ³, Maria L. Bergamini ¹ , Vitória C. de Melo ¹ , Tais Vidal ⁵, Micheli M. Pillat ⁵ , Jussara de Lima ^{1,6}, Marcelo L. V. da Cunha ⁶, Marielle L. Makiyama ¹, Filomena Marafon ¹, Anieli P. Kempka ² , Ariane Zamoner ³  and Margarete D. Bagatini ^{1,3,*} 

¹ Postgraduate Program in Biomedical Science, Federal University of Fronteira Sul, Chapecó 89815-899, SC, Brazil; geile.fistarol@gmail.com (G.F.); albertoufsj@hotmail.com (L.A.d.O.); paula.dallagnol@hotmail.com (P.D.); jhudiima@hotmail.com (J.d.L.); endocrinologiamarielle@yahoo.com (M.L.M.); marafon.filo@gmail.com (F.M.); maria.bergamini@estudante.ufes.edu.br (M.L.B.); vitoriacapelli@hotmail.com (V.C.d.M.)

² Multicentric Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, State University of Santa Catarina, Lages 88520-000, SC, Brazil; gilnei.silva@edu.udesc.br (G.B.d.S.); anielia.kempka@udesc.br (A.P.K.)

³ Postgraduate Program in Biochemistry, University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-970, SC, Brazil; daianemanica2011@hotmail.com (D.M.); rafaelnarzetti@uricer.edu.br (R.A.N.); arianezps@gmail.com (A.Z.)

⁴ Department of Nursing, Postgraduate Program in Nursing, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-970, SC, Brazil; tilitobinha@gmail.com

⁵ Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil; tais.vidal@ufsm.br (T.V.); micheli.pillat@ufsm.br (M.M.P.)

⁶ Regional Hospital of West, Center of Neurosurgery, Chapecó 89812-505, SC, Brazil; marcelolive@yahoo.com.br

* Correspondence: margarete.bagatini@uffs.edu.br

† These authors contributed equally to this article and shared first authorship.



Academic Editor: Atsushi Matsuzawa

Received: 14 June 2025

Revised: 13 July 2025

Accepted: 14 July 2025

Published: 17 July 2025

Citation: Fistarol, G.; de Oliveira, L.A.; da Silva, G.B.; Manica, D.; Hanauer, M.C.; Dallagnol, P.; Narzetti, R.A.; Bergamini, M.L.; de Melo, V.C.; Vidal, T.; et al. Dysregulation of Purinergic Signaling Sustains Chronic Inflammation and Oxidative Imbalance in Patients After PitNET Surgical Resection. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 6890. <https://doi.org/10.3390/ijms26146890>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) are the most common intracranial tumors. Evidence suggests that these types of tumors may have high recurrence rates. In this context, the purinergic system, oxidative stress, and inflammation are important signaling pathways involved in the cancer's pathophysiology. This study aimed to evaluate the sociodemographic and diagnostic profiles, as well as assess the purinergic signaling, immunological, and redox profiles, of patients after PitNET resection. We collected sociodemographic data and the patients' diagnostic profiles. We also collected blood samples to analyze glycemia, triglycerides, albumin, and ATP levels. The ectonucleotidase activity was determined in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In addition, we evaluated their redox and immunological profiles. There was a prevalence of gonadotropic macroadenoma derived from PIT-1 cells. We found that patients included in the PitNET group had increased glycemia, serum ATP levels, and ATP hydrolysis in PBMCs. Analyzing their immunological profiles, we found that patients had increased levels of IL-6, IL-10, and TNF, while the IL-27 level was decreased. Regarding their redox profiles, PitNET patients had increased levels of ROS and protein carbonylation. Unexpectedly, patients also showed increased levels of non-protein thiols (NPSHs), total thiols (PSHs), and ascorbic acid. Thus, the dysregulation of purinergic signaling sustained chronic inflammation and oxidative imbalance in PitNET patients for a long time after surgical resection. These data suggest that patients with PitNETs require long-term accompanying to prevent cancer recurrence prognosis. The biomarkers highlighted in this study may be good tools to help the medical approaches.

Keywords: neuroendocrine tumor; surgical resection; purinergic signaling; ectonucleotidases; inflammation; oxidative stress

1. Introduction

Pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) are malignant masses of cells derived from adenohypophysis that affect the neurologic–endocrine axis [1]. Epidemiologically, these malignant neoplasms have an incidence of 3.9 to 7.4 cases per 100,000 inhabitants per year and a prevalence of 76 to 116 cases per 100,000 inhabitants [2]. In addition, PitNETs are the most common type of disease affecting the pituitary gland, accounting for approximately 15% of all brain tumors [3,4].

The possible treatments for PitNETs include anti-secretory drugs, surgical resection, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy [5,6]. However, due to the aggressive nature of PitNETs [5], traditional treatments may have no sustainable effects [7], and tumor recurrence in resected patients is a concern that limits life quality [8,9]. In this panorama, the previous retrospective cohort revealed that 45.71% of patients who received surgical management of the tumors had recidivism [10], which indicates that PitNETs have high rates of recurrence.

Nowadays, several studies have shown that purinergic signaling is involved in the cancer's pathophysiology. This cell signaling pathway has as a key molecule adenosine triphosphate (ATP), which seems to be increased in the tumor microenvironment (TME) [11–13]. In this sense, other dysregulations have also been reported, such as in the hydrolytic activity of CD39 and CD73 enzymes [14–16]. Furthermore, this cell signaling pathway also plays a role in inflammation [17,18], which justifies the reason for it to be broadly investigated. Despite that, currently, no evidence shows the involvement of purinergic signaling in PitNETs' pathophysiology or after surgical resection.

Recent evidence has also shown that purinergic signaling and oxidative stress are interconnected pathways [19] and are present in the tumor context [20,21]. In this context, it is known that redox imbalance produces free radicals, such as reactive oxygen species (ROS), which are molecules capable of causing damage to lipid membranes and DNA [22]. Related to PitNETs, the limited literature available suggests a possible involvement of oxidative stress in the pathophysiology of these neoplasms [23,24], and the need for new solid discoveries in this area is urgent.

Therefore, considering the lack of literature, we aim in this article to highlight the sociodemographic characteristics and cancer classification, as well as evaluate the nuances of the purinergic signaling, oxidative stress, and inflammatory profiles, of long-time post-resected PitNET patients. We hypothesize that the patients have dysregulation of purinergic signaling after surgical resection, which directly impacts their immune profiles and oxidative balance. Taken together, this unfavorable panorama may signal cancer recurrence in the PitNET context, requiring more attentive approaches to prevent a bad long-term prognosis.

2. Results

2.1. Sociodemographic Characteristics of Participants

Table 1 presents the sociodemographic characteristics of the participants involved in this research, including age, gender, and BMI. The mean age of the individuals in the PitNET group was 57.78 years (± 13.52), while in the controls, it was 51.88 (± 13.62). We verified a predominance of female individuals (64.70%; $n = 11$) in the PitNET group in comparison with males (35.30%; $n = 6$). Regarding body composition, the mean BMI of patients in the PitNET

group was $30.70 (\pm 7.61)$, and in the control group, it was $28.79 (\pm 3.50)$. Analyzing in detail, in the PitNET group, 29.41% ($n = 5$) of individuals were obese, 52.95% ($n = 9$) were overweight, and 17.64% ($n = 3$) were eutrophic. Similarly, in the control group, 40.90% ($n = 9$) of the participants were obese, 31.82% ($n = 7$) were overweight, and 27.28% ($n = 6$) were eutrophic.

Table 1. Sociodemographic characterization of subjects. * Based on WHO [25] parameters.

Characteristics	Subject Groups	
	PitNETs $n = 17$	Controls $n = 22$
Age (years old)	57.78 ± 13.52	51.88 ± 13.62
Gender (%)		
Male	35.30 ($n = 6$)	50.00 ($n = 11$)
Female	64.70 ($n = 11$)	50.00 ($n = 11$)
BMI(kg/m ²) *	30.70 ± 7.61	28.79 ± 3.50
Eutrophic	17.64 ($n = 3$)	27.28 ($n = 6$)
Overweight	52.95 ($n = 9$)	31.82 ($n = 7$)
Obesity	29.41 ($n = 5$)	40.90 ($n = 9$)
Baseline chronic diseases (%)		
Arterial hypertension	23.53 ($n = 4$)	-
Diabetes (type 2)	5.88 ($n = 1$)	-
Hypothyroidism	5.88 ($n = 1$)	-
Dyslipidemia	5.88 ($n = 1$)	-
Arterial hypertension + diabetes (type 2)	11.76 ($n = 2$)	-
Arterial hypertension + dyslipidemia	11.76 ($n = 2$)	-
Hypothyroidism + depression	5.88 ($n = 1$)	-
Arterial hypertension + diabetes (type 2) + dyslipidemia + depression	5.88 ($n = 1$)	-
No disease	23.53 ($n = 4$)	-
Bad habits (%)		
Smoking	11.76 ($n = 2$)	-
Alcoholism	5.88 ($n = 1$)	-
No bad habits	82.35 ($n = 14$)	-

Among the main baseline chronic diseases, we found that arterial hypertension was the most prevalent disease in the PitNET group, with 23.53% ($n = 4$) of the total, followed by the association between arterial hypertension + diabetes (type 2) (11.76%; $n = 2$) and arterial hypertension + dyslipidemia (11.76%; $n = 2$). In addition, 23.53% ($n = 4$) of the patients reported not having any type of chronic disease. Other baseline chronic diseases or associations corresponded to 5.88% ($n = 1$) (see more details in Table 1). Regarding bad habits, smoking corresponded to 11.76% ($n = 2$) and alcoholism to 5.88% ($n = 1$), while 82.35% ($n = 14$) of the PitNET patients did not indicate bad habits.

2.2. Tumor Classification of Patients

In this study, we compiled the tumor classification of the patients included in the PitNET group (Table 2), considering the medical diagnosis based on the immunohistochemistry, tumor size, and cell lineage. Thus, 94.11% ($n = 16$) of cases were macroadenomas and 5.88% ($n = 1$) were microadenomas. In the classification of histology, 23.52% ($n = 4$) were cases of the gonadotroph subtype, 17.64% ($n = 3$) the somatotroph subtype, 17.64% ($n = 3$) the multihormonal subtype, 11.76% ($n = 2$) the densely granulated corticotroph subtype, and 11.76% ($n = 2$) null cells. The tumors classified as densely granulated somatotrophs, sparsely granulated lactotrophs, and densely granulated lactotrophs each accounted for 5.88% ($n = 1$) of the total cases. Relative to the cell lineages, 35.30% ($n = 6$) were from PIT-1, 29.41% ($n = 5$) were of no distinct cell lineage, 23.52% ($n = 4$) were from SF-1, and 11.76% ($n = 2$) were from T-PIT.

Table 2. Tumoral classification according to size, hormone production, and cell lineage.

Tumor Classification	
By size	
Microadenoma	5.88% (<i>n</i> = 1)
Macroadenoma	94.11% (<i>n</i> = 16)
By histological subtype	
Densely granulated somatotroph	5.88% (<i>n</i> = 1)
Somatotroph	17.64% (<i>n</i> = 3)
Sparsely granulated lactotroph	5.88% (<i>n</i> = 1)
Densely granulated lactotroph	5.88% (<i>n</i> = 1)
Densely granulated corticotroph	11.76% (<i>n</i> = 2)
Gonadotroph	23.52% (<i>n</i> = 4)
Multihormonal	17.64% (<i>n</i> = 3)
Null cell	11.76% (<i>n</i> = 2)
By cell lineage	
PIT-1	35.30% (<i>n</i> = 6)
T-PIT	11.76% (<i>n</i> = 2)
SF-1	23.52% (<i>n</i> = 4)
No distinct cell lineage	29.41% (<i>n</i> = 5)

2.3. Levels of Biochemical Markers

The blood glucose (glycemia), triglyceride, and albumin levels in the PitNET group and controls are shown in Figure 1A–C. Individuals in the PitNET group had increased glucose levels ($p = 0.0218$) when compared with the control group (Figure 1A). However, there was no statistically significant difference for triglyceride (Figure 1B) and albumin (Figure 1C) levels.

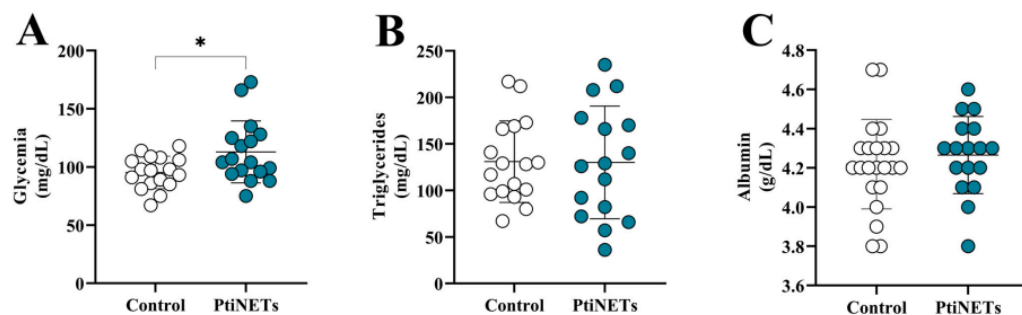


Figure 1. The levels of biochemical markers. In comparison with the controls, patients in the PitNET group presented increased glycemia (A), while there was no statistical significance for the levels of triglycerides (B) and albumin (C). Statistical analysis: Student's *t*-test or the Mann–Whitney test was used to compare the groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. * ($p < 0.05$).

2.4. Patients Presented Purinergic Signaling Alterations

Seeking possible alterations in purinergic signaling, we measured the serum eATP levels, as well as the ectonucleotidase activity in the hydrolysis of nucleotides in PBMCs of both groups (Figure 2A–D). Curiously, we found that the PitNET group had expressively increased levels of eATP ($p = 0.0004$) in comparison with the control group (Figure 2A). In addition, we also found that the PitNET group presented significantly decreased levels of ATP hydrolysis ($p = 0.0039$) (Figure 2B), while there were no statistically significant differences between the PitNET and control groups for the hydrolysis of ADP (Figure 2C) and AMP (Figure 2D).

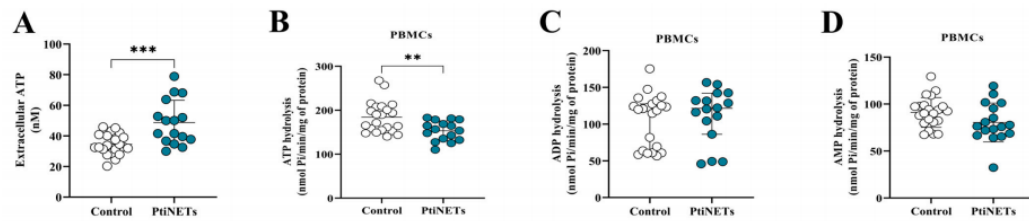


Figure 2. Extracellular ATP (eATP) levels and ectonucleotidases activity in PBMCs. We found that the PitNET group had significantly increased levels of ATP in serum (eATP) in comparison with the control group (A). Regarding the ectonucleotidase activity, we found an increased hydrolysis of ATP (B), while there was no statistical significance for hydrolysis of ADP (C) and AMP (D). Statistical analysis: Student's *t*-test or the Mann–Whitney test was used to compare the groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$).

2.5. Patients Had Alterations in Cytokine Profiles

The results of the dosage of cytokines are shown in Figure 3A–G. The patients belonging to the PitNET group presented increased levels of IL-6 ($p = 0.0413$) when compared with the control group (Figure 3C). Similarly, the levels of IL-10 ($p < 0.0001$) (Figure 3D) and TNF ($p = 0.0259$) (Figure 3F) were also significantly increased. Meanwhile, we found highly reduced levels of IL-27 ($p < 0.0001$) in individuals belonging to the PitNET group when compared with the control group (Figure 3E). There was no statistical significance for the levels of IL-2 (Figure 3A), IL-4 (Figure 3B), and IFN- γ (Figure 3G).

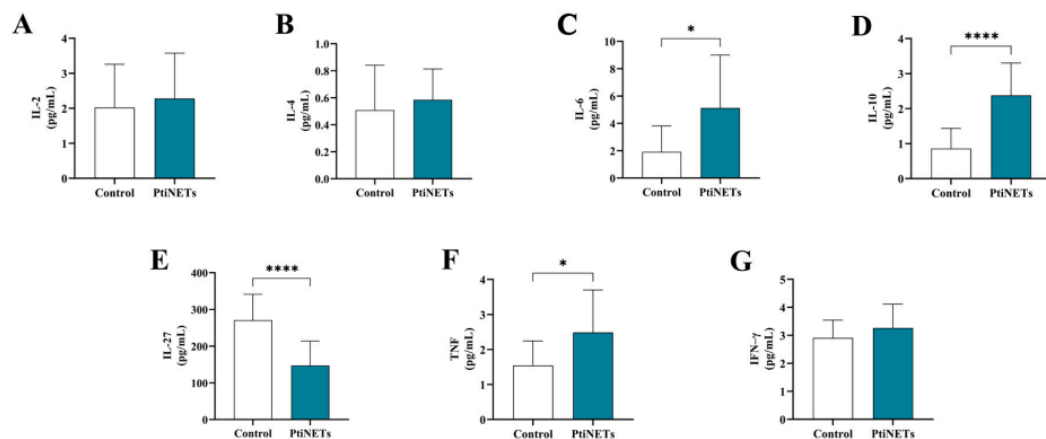


Figure 3. Immunological profiles. The levels of IL-2 (A), IL-4 (B), and IFN- γ (G) were unchanged, while IL-6 (C), IL-10 (D), and TNF (F) were increased in patients with PitNETs. In the case of IL-27, levels were reduced in the PitNET group (E). Statistical analysis: Student's *t*-test or the Mann–Whitney test was used to compare the groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. * ($p < 0.05$); **** ($p < 0.0001$).

2.6. Patients Had an Imbalance in Their Redox Profiles

The redox profiles of the enrolled subjects are shown in Figure 4A–H. The PitNET group had increased levels of ROS ($p = 0.0466$) in comparison with the control group (Figure 4A). Similarly, patients in the PitNET group also presented high levels of protein carbonylation ($p < 0.0001$) (Figure 4D). However, there was no statistical significance for the pro-oxidant marker levels of MPO (Figure 4B) and TBARS (Figure 4C). Regarding the

antioxidant panorama, compared with the controls, we found elevated levels of NPSH ($p = 0.0411$) (Figure 4E), PSH ($p = 0.0001$) (Figure 4F), and ascorbic acid ($p = 0.0001$) (Figure 4G). We did not find statistical differences in the levels of SOD in the comparison of the control versus PitNET groups (Figure 4H).

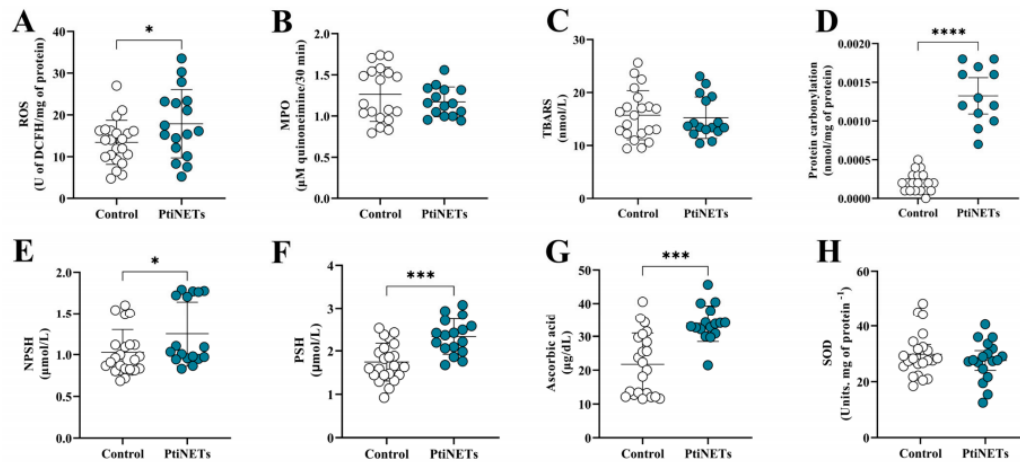


Figure 4. Redox profiles. We discovered that patients from the PitNET group had a redox imbalance, with increased levels of ROS (A) and protein carbonylation (D). In contrast, we also verified an increase in the levels of NPSH (E), PSH (F), and ascorbic acid (G) in the PitNET group. We did not find any statistical significance for the levels of MPO (B), TBARS (C), and SOD (H). Statistical analysis: Student's *t*-test or the Mann–Whitney test was used to compare the groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant. * ($p < 0.05$); *** ($p < 0.001$); **** ($p < 0.0001$).

3. Discussions

As in other cancer types that also require surgical resection, hypophysectomy with extensive removal of the pituitary mass is the usual treatment for neuroendocrine neoplasms that affect this gland. This approach is considered a standard in the treatment of patients [26]. However, evidence has highlighted that some PitNET subtypes have aggressive behaviors toward conventional therapies [7]. From this panorama, we set out to understand the possible intricate nuances behind the physiology of patients after PitNET long-term surgical resection. Surprisingly, we found that patients presented dysregulation of purinergic signaling, with high extracellular levels of ATP, which culminated in chronic inflammation involving increased IL-6, TNF, and IL-10 levels and decreased IL-27 levels, as well as a pro-oxidative state accompanied by elevated ROS and protein carbonylation. Taken together, these findings may signal possible neoplastic recurrences in the post-resected patients.

We started our research by verifying the sociodemographic data. Thus, in this study, the mean age of the patients in the PitNET group was $57.78 (\pm 13.52)$, being very similar to that found in previous work [27]. Furthermore, the BMI of $30.70 (\pm 7.61)$ for the individuals in the PitNET group represents a risk to the development of cancer [28,29], including pituitary cancer [30]. We also verified that patients belonging to the PitNET group presented arterial hypertension or an association between arterial hypertension and diabetes. It is known that a high body fat mass may increase the risk of type 2 diabetes and heart disease and increase the risk of developing certain types of cancer [31].

In the last update of the WHO to classify endocrine and neuroendocrine tumors, pituitary tumor subtypes were organized according to histology and the cell lineage from which they were derived [32]. Among PitNETs, gonadotrophs originating from PIT-1 cells are one of the most common tumor types [33]. Thus, thinking about elucidating the subtypes of diagnosed PitNETs in this study, we compiled them according to size, histology, and cell lineage (Table 2). Corroborating the data from the literature, we found that the most prevalent tumor was classified as a gonadotropic macroadenoma derived from PIT-1 cells.

In the context of cancer, one of the cell signaling pathways involved in pathophysiology is purinergic signaling, which has been shown to play a role in several cancer types, such as melanoma [34], lung cancer [35], and gastric cancer [36]. A key component of this cell signaling, the nucleotide ATP [13], can be found at higher levels in cancer cells to the detriment of healthy cells [37]. ATP can be released from tumoral cells via cell membrane damage or from membrane channels [38]. We expected that after surgical resection, serum ATP levels would be at a basal level. However, we found high ATP levels in patients in the PitNET group (Figure 2A). This peculiar result regarding ATP levels was also demonstrated by Manica et al. [15] in the melanoma cancer context. These data seem to indicate that some cancer types may release proper molecules into the bloodstream to make niches feasible for future neoplastic recurrences.

Outside the cells, the ectonucleotidases CD39 and CD73 are important components of the purinergic system that regulate the extracellular levels of nucleotides, such as ATP, ADP, and AMP, as well as nucleosides [37]. Thus, considering the role of ectonucleotidases in controlling ATP levels, we performed an assay to verify the enzymatic activity of ectonucleotidases in the hydrolysis of ATP, ADP, and AMP. Convergent with high levels of ATP, we discovered a reduction in the ATPase function of purinergic ectoenzymes (Figure 2B), a result that justifies the increased levels of eATP found in patients. Thus, all these findings indicate that patients in the PitNET group had alterations in purinergic signaling with the cascade toward ATP accumulation in the serum.

Intrinsic to the functions played by ATP, it can activate the P2X7 receptor in inflammatory cells and promote the release of inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF [39,40]. Although a long time had passed since the patients' tumor resection, we investigated whether there was any possibility that high levels of eATP altered their immune profiles. Curiously, we found that the levels of IL-6, IL-10, and TNF were significantly increased, and the IL-27 level was decreased (see Figure 3). Therefore, our results prove that patients were under a chronic inflammatory process due to high levels of eATP for a long time after surgical resection, a condition that may favor carcinogenesis and means poor prognosis in the long term.

Regarding the function of IL-10 in a cancer context, this interleukin may contribute to tumor progression by interrupting inflammation, leading to antitumor immunity. Meanwhile, it recruits and stimulates cytotoxic CD8⁺ cells in the tumor microenvironment, promoting immunological memory and suppressing the local release of pro-inflammatory cytokines [41]. In a study of advanced renal cell carcinoma, it was found that increased levels of IL-10 are associated with the potential development of metastasis [42]. In the case of colorectal cancer, increased IL-10 levels have also been linked to a negative prognosis [43]. Based on these excerpts from the literature, the high IL-10 levels found in the patients in our study are another point of concern that may indicate cancer recurrence.

As shown previously, we found decreased levels of IL-27 in patients from the PitNET group. IL-27 is considered the newest member of the IL-6/IL-12 interleukin family [44]. The role of this interleukin in the human body has still not been elucidated, but it seems to act as a pleiotropic molecule. A body of evidence suggests it is involved in inflammation and

favors tumors, whereas others indicate an anti-inflammatory and anti-cancer effect [45–47]. Despite that, Mascanfroni et al. [48] correlated an increase in CD39 expression positively with IL-27, connecting this interleukin to purinergic signaling. Given the results found for IL-27 levels, it is possible to infer that high levels of ATP may be related to the down-regulation of CD39 controlled by the lower levels of IL-27, favoring the accumulation of this molecule in the peripheral bloodstream of PitNET patients for a long time after surgical resection.

It was recently demonstrated that PitNET patients are associated with elevated levels of ROS and signs of oxidative damage, which promotes the recruitment of immune cells and may lead to a pre-neoplastic condition [23]. In this sense, it is known that ATP is capable of ROS stimulation via P2X7 receptor agonism [12]. Since increased levels of ATP in patients in the PitNET group were found and evidence about the pro-neoplastic role of ROS, we sought to characterize the redox profiles of the individuals included in this research. Factually, we found that patients had elevated levels of ROS and protein carbonylation (Figure 4). These results corroborate the hypothesis that patients still presented a redox imbalance after tumor surgical resection, favoring oxidative damage and possible neoplastic resurgence.

Although the patients presented increased levels of pro-oxidant molecules, we also verified that they presented increased levels of ascorbic acid and PSH/NPSH. In this sense, ascorbic acid is known as a potent antioxidant substance [49], as well as PSH/NPSH [50,51]. In addition, a curious fact we found in a previous study was that metformin, used to treat type 2 diabetes, was able to raise the levels of both ascorbic acid and thiols in patients and PBMCs [52]. Thus, as individuals mainly in the PitNET groups were continuously using this drug to treat type 2 diabetes, a possible explanation for our results was that metformin improved the levels of these antioxidants, but without any efficient effect on oxidative molecules, since increased ROS and protein carbonylation was detected.

All the results found in this research demonstrate that patients with PitNETs require long-term follow-up due to the consequences of purinergic signaling dysregulation, particularly on oxidative stress and cytokine profiles, which can favor tumor recurrence. Moreover, we encourage further studies to deepen the understanding of the impacts of purinergic signaling in other neuroendocrine tumors and to expand the knowledge and medical care for patients.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design and Participant Selection

This cross-sectional study was conducted throughout January 2024. A total of 39 subjects residing in the municipality of Chapecó, western Santa Catarina state (SC), were included. Of this total, 17 were patients (male and female) selected by the researchers' prior contact with the neurology service of the Hospital Regional do Oeste (HRO), in Chapecó, SC. The volunteer patients were 18 years old or older and had a previous diagnosis of PitNETs according to the hospital's neurology/oncology department. In addition, the selected patients had undergone surgical resection of the tumor approximately 12 to 24 months before this research. The patients included in this study were taking medications to treat baseline diseases, including antihypertensives, antidiabetics, antidepressants, HMG-CoA reductase inhibitors, and levothyroxine. Twenty-two healthy individuals without any underlying disease, such as cardiovascular problems, cancer, diabetes, or any other chronic communicable or non-communicable diseases, were also recruited to compose the control group. The control individuals were matched with the patients regarding age and sex.

This project was approved by the Human Research Ethics Committee (HREC) of the Federal University of the Southern Frontier (UFFS), the Chapecó, SC, campus, under

protocol number 6.602.966. The collection of information and biological materials was carried out only after the signing of the free and informed consent form (FICF).

4.2. Anthropometric Assessment

To record anthropometric data, the participants were weighed and measured wearing light clothing and without shoes. A digital scale with a capacity of 150 kg and a portable stadiometer were used. Body composition was classified based on the body mass index (BMI), following the classification table for adults from the World Health Organization [25], applicable to both sexes.

4.3. Collection of Biological Material

A total of 30 mL of whole blood was collected from fasting patients and controls by qualified professionals. A vacuum collection system (Vacutainer®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was used in tubes with separating gel, tubes containing EDTA, and tubes containing sodium citrate. The collected material was homogenized and transported in a polystyrene box containing ice to the processing local.

4.4. Processing of Biological Material and Separation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

The collected samples were processed in the biochemistry laboratory of the UFFS, the Chapecó, SC, campus. The blood collected in sodium citrate tubes was stored in microtubes at -80°C until the analyses were performed. The blood stored in the tubes with separating gel and EDTA was centrifuged at 3500 rpm for 15 min. Afterward, the serum was obtained from the tubes with separating gel, which was also stored in microtubes at -80°C until the necessary analyses were carried out.

Regarding the tubes with EDTA, the buffy coat from which the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained was collected, according to the protocol established by Böyum [53], with adaptations. For this purpose, the buffy coat was diluted in saline solution (1:1). Then, the mixture was transferred to a conical tube containing Ficoll-Histopaque and centrifuged at 1800 rpm for 30 min. After centrifugation, the intermediate layer containing the PBMCs was collected. Then, the cells were transferred to a new tube, washed twice with 10 mL of saline solution, and centrifuged again for 5 min at 1500 rpm. When necessary, the cells were washed with 5 mL of a hemolytic buffer to eliminate red blood cell residues, followed by centrifugation for 5 min at 1500 rpm. The resulting PBMCs were stored in microtubes with 600 μL of saline solution and frozen at -80°C until experiments were performed to evaluate the enzymatic activity of ectonucleotidases.

4.5. Analysis of Peripheral Biochemical Markers

We analyzed the levels of blood glucose, triglycerides, and albumin in participants using colorimetric assays with an automated clinical analyzer (Wiener lab., CM 200). All analyses were performed following the manufacturer's kits (Wiener lab., Rosario, Argentina). The whole blood from subjects was used to detect the levels of blood glucose, while the triglyceride and albumin levels were analyzed in serum. Briefly, we added into each specific analyzer compartment the colorimetric reagent, buffer solution, and samples. Then, approximately 10 μL of the samples was automatically pipetted into an empty well and mixed with the colorimetric reagent and buffer solution. After the incubation time, the colorimetric reaction was read spectrophotometrically by the equipment. The blood glucose and triglyceride results were expressed in milligrams per deciliter (mg/dL). In the case of albumin, the results were expressed in grams per deciliter (g/dL).

4.6. Analysis of Purinergic Signaling

4.6.1. Determination of Extracellular ATP (eATP) Levels

For the determination of extracellular ATP (eATP), the Molecular Probes™ ATP Determination Kit (Invitrogen™, Waltham, MA, USA) was used, following the manufacturer's recommendations. Each reaction content consisted of 1.25 µg/mL of firefly luciferase, 50 µM of D-luciferin, and 1 mM of DTT in 1x reaction buffer. Then, 10 µL of the serum sample was mixed with 90 µL of the reaction content and incubated at 37 °C for 15 min. After the incubation time, the luminescence was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 560 nm (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). An ATP standard curve was prepared at concentrations ranging from 1 nM to 1 µM. The results were expressed in nM of extracellular ATP.

4.6.2. Assessment of Enzymatic Activity of Ectonucleotidases

The activity of ectonucleotidases was evaluated in PBMC samples from control individuals and patients. To evaluate the ATPase, ADPase, and AMPase activities, the substrates ATP, ADP, and AMP were used, respectively, with the measurement of inorganic phosphate (Pi) produced as a result of the hydrolytic activity at the end of each reaction. Thus, after protein adjustments, 20 µL of each PBMC sample was added to a reaction mixture of each enzyme and pre-incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of the specific substrates for each enzyme. After incubation at 37 °C for 70 min, the reactions were stopped by the addition of 150 µL of trichloroacetic acid (TCA; 15%), and the inorganic phosphate released due to hydrolysis was determined using malachite green as a colorimetric reagent. A standard curve was prepared with KH₂PO₄. The absorbance was measured at 630 nm, and the results were presented as nmol/Pi/min/mg protein. The results were corrected for non-enzymatic hydrolysis [54,55].

4.7. Analysis of Immunological Profile

4.7.1. Cytokine Determination by Flow Cytometry

The levels of interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interferon-γ (IFN-γ), and tumor necrosis factor (TNF) were determined using the BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (catalog N°. 551809), following the manufacturer's recommendations. The results were expressed in picograms per mL (pg/mL).

4.7.2. Determination of IL-27 Levels

The levels of IL-27 were assessed by sandwich immunoassays using a human ELISA kit (Invitrogen®), following the manufacturer's instructions. Firstly, the serum was diluted 2x with a diluent buffer. Afterward, 100 µL of each sample was added to a 96-well microplate, covered, and incubated for 2.5 h at 37 °C with gentle shaking. Then, the supernatant was discarded, and the wells were washed 4x with a wash buffer solution and dried by the inversion of the plate against an absorbent sheet. In the sequence, 100 µL of a biotin conjugate was added to each well and incubated with gentle shaking for 1 h at 37 °C. After the plate was washed 4x, 100 µL of a streptavidin-HRP solution was added, followed by incubation for 45 min at room temperature. Finally, 100 µL of a TMB substrate was added to the wells, and the mixtures were incubated for 30 min at room temperature in the dark. The reaction was stopped with 100 µL of a stop solution. The readings were taken at 450 nm with a spectrophotometer (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™). The results were calculated considering the interpolation of the equation of the absorbance curve by the concentration and were expressed in picograms per milligram of protein (pg/mg).

4.8. Analysis of Redox Profile

4.8.1. Reactive Oxygen Species (ROS)

The level of ROS was estimated by the fluorometric protocol established by Ali et al. [56]. For this, 10 μ L of serum was incubated with 10 μ L of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; 7 μ M) and 240 μ L of phosphate-buffered saline (PBS). After 30 min of incubation at 37 °C, the final product of DCFH-DA oxidation, dichlorofluorescein (DCF), was measured. The fluorescence intensity was read with an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX). The results were expressed as a percentage (%) of the fluorescence intensity compared to the control.

4.8.2. Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Assay

We performed a colorimetric assay to analyze lipoperoxidation by measuring the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARSs). For this assay, we followed the protocol developed by Jentzsch et al. [57], with some modifications. Thus, 20 μ L of each serum sample was mixed with 55 μ L of distilled water, 100 μ L of orthophosphoric acid (0.2 M), and 25 μ L of TBA (0.1 M), and the mixture was incubated at 37 °C for 45 min. Finally, the pink product was read with a spectrophotometer (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™) at 532 nm. The results were expressed in nmol/L of TBARS.

4.8.3. Myeloperoxidase (MPO) Enzymatic Activity

We analyzed the MPO activity in PBMCs from patients and controls according to a study by Suzuki et al. [58]. For this, we used a modified peroxidase system, mixing 12 μ L of the samples with 148 μ L of amino antipyrine (AAP) in a phenol solution (2.5 mM AAP; 20 mM phenol) and 17 μ L of H₂O₂ solution (17 mM). After 30 min of incubation at 37 °C, the system was read spectrophotometrically at 492 nm (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™). The results were expressed in μ M of quinoneimine per milligram of protein produced in 30 min (μ Mq/mg/30 min).

4.8.4. Protein Carbonylation

Serum protein carbonylation was determined by the modified method of Wehr and Levini [59]. First, the proteins from 1000 μ L of serum were precipitated with 500 μ L of 10% TCA and centrifuged at 5000 rpm for 5 min, discarding the supernatant. Then, the proteins were incubated for 30 min at room temperature with 150 μ L of DNPH (10 mM). After incubation for 30 min at room temperature, 500 μ L of TCA (10%) was added to the precipitated proteins, and they were centrifuged at 5000 rpm for 5 min. After discarding the supernatant, the red precipitate was washed twice with 1000 μ L of ethanol/ethyl acetate (1/1), followed by centrifugation at 10,000 rpm. Subsequently, the supernatant was removed, and the precipitate was dissolved in 1500 μ L of a protein denaturation solution (SDS 2%; pH 8.0). Readings were performed with a spectrophotometer at a wavelength of 380 nm. The results were expressed in nM of protein carbonyl per mg of protein.

4.8.5. Ascorbic Acid (Vitamin C)

The levels of ascorbic acid were assessed by the method of Jacques-Silva et al. [60], with adaptations. Briefly, 200 μ L of each serum sample was first deproteinized with the addition of an equal volume of trichloroacetic acid (TCA; 10%). Afterward, 100 μ L of the remaining supernatant was mixed with 25 μ L of distilled water, 25 μ L of TCA (13.3%), and 20 μ L of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), followed by 2 h of incubation at 37 °C. After time elapsed, the reaction was stopped by adding 135 μ L of sulfuric acid (65%), and the orange-red product generated was spectrophotometrically read with the absorbance set at 520 nm (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™). The results were expressed in μ g/dL.

4.8.6. Total Thiol (PSH) and Non-Protein Thiol (NPSH)

Both levels of thiols were determined according to Ellman [61], with adjustments. For the total thiol assay, 30 μ L of serum in a 96-well plate was added to 200 μ L of potassium phosphate buffer (PPB) (1M; pH 6.8) and 20 μ L of 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) with immediate reading. For the non-protein thiols, the serum samples were previously deproteinized by adding an equal sample volume of TCA (10%), and the remaining supernatant was used. Then, 40 μ L of each sample was mixed with 260 μ L of PPB and 15 μ L of DTNB, with immediate reading. All reads were measured at 412 nm (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™). The results were expressed in μ M, using a cysteine standard curve as the parameter.

4.8.7. Superoxide Dismutase (SOD) Enzymatic Activity

The superoxide dismutase (SOD) enzyme activity was determined in whole-blood samples from patients and controls, according to the study by McCord and Fridovich [62]. Initially, the concentrated blood samples were diluted in PBS (pH 7.2). Afterward, the samples were mixed with 180 μ L of a glycine buffer (50 mM; pH 10.5). The reaction was initiated by adding 10 μ L of an adrenaline solution (60 mM; pH 2.0), followed by kinetic readings every 30 s, for a total of 10 min, at a wavelength of 480 nm (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific™). Adrenaline's auto-oxidation was used to correct the values obtained in the samples. The results were expressed in units per milligram of protein⁻¹ (units.mg of protein⁻¹).

4.9. Protein Dosage of Samples

The quantification of the protein levels in the samples was determined according to the Bradford [63] method and adjusted as required for each analysis. When necessary, the samples were diluted with saline solution or as required by the protocols.

4.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 9.0.1 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The data normality was analyzed using the Shapiro–Wilk test. Outliers were analyzed and removed using the Grubbs test. Regarding the studied variables, differences between groups were evaluated using Student's *t*-test for parametric data and the Mann–Whitney test for non-parametric data. The results were presented as means $\pm$ standard deviations for parametric variables and as medians and 95% confidence intervals (95% CIs) for non-parametric variables. Differences for which the probability of rejecting the null hypothesis was less than 5% ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

5. Conclusions

For the first time, we found that after surgery resection of PitNETs, patients present dysregulation of purinergic signaling, with high extracellular levels of ATP, which culminates in chronic inflammation and a pro-oxidant state. Taken together, these findings bring to light the possibility of patients having tumor relapses throughout their lives due to poor prognosis markers left by PitNETs. In addition, the biomarkers highlighted in this study may be good tools to help medical approaches. We further highlight that few studies in the literature have focused on broadly understanding this tumor type, and that is why we suggest new prospective longitudinal studies be developed, carrying out post-surgical monitoring of these patients to verify the recurrence rate.

Author Contributions: Conceptualization: G.F., L.A.d.O., G.B.d.S. and D.M. Methodology: G.F., G.B.d.S., D.M., M.C.H., P.D., R.A.N., M.L.B., V.C.d.M., T.V., M.M.P., J.d.L., M.L.V.d.C. and M.L.M. Investigation: G.F., G.B.d.S., D.M., M.C.H., P.D., R.A.N., M.L.B., V.C.d.M., T.V., M.M.P., J.d.L., M.L.V.d.C. and M.L.M. Visualization: G.F., G.B.d.S., D.M., M.C.H., P.D., R.A.N., M.L.B., V.C.d.M., T.V., M.M.P., J.d.L., M.L.V.d.C., M.L.M., F.M., A.Z., A.P.K. and M.D.B. Funding acquisition: M.D.B. Project administration: G.F., G.B.d.S., D.M. and M.D.B. Supervision: M.D.B. Writing—original draft: G.F., L.A.d.O. and G.B.d.S. Writing—review, and editing: G.F., G.B.d.S. and M.D.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors gratefully acknowledge the fellowships received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC, Grant: 2024TR002502 and 2023TR001472), and Federal University of Fronteira Sul (UFFS). MDB is a 2 CNPq Researcher Fellow (PQ2) (310606/2021-7).

Institutional Review Board Statement: This study was evaluated by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Fronteira Sul (UFFS), Chapecó, SC, and approved under protocol n° 6.602.966. All procedures followed the Helsinki Declaration.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all individual participants included in this study.

Data Availability statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available but are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We would like to thank Gabriela G. de Oliveira for her support in carrying out this work. We would also like to thank all the undergraduate students at the Cell Culture Laboratory (LabCell) who in some way contributed to this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Asa, S.L.; Mete, O.; Cusimano, M.D.; McCutcheon, I.E.; Perry, A.; Yamada, S.; Nishioka, H.; Casar-Borota, O.; Uccella, S.; La Rosa, S.; et al. Pituitary Neuroendocrine Tumors: A Model for Neuroendocrine Tumor Classification. *Mod. Pathol.* **2021**, *34*, 1634–1650. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Daly, A.F.; Beckers, A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2020**, *49*, 347–355. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Ostrom, Q.T.; Cioffi, G.; Waite, K.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncol.* **2021**, *23*, iii1–iii105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Tsukamoto, T.; Miki, Y. Imaging of Pituitary Tumors: An Update with the 5th WHO Classifications—Part 1. Pituitary Neuroendocrine Tumor (PitNET)/Pituitary Adenoma. *Jpn. J. Radiol.* **2023**, *41*, 789–806. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Raverot, G.; Ilie, M.D.; Lasolle, H.; Amodru, V.; Trouillas, J.; Castinetti, F.; Brue, T. Aggressive Pituitary Tumours and Pituitary Carcinomas. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2021**, *17*, 671–684. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Feola, T.; Carbonara, F.; Verrico, M.; Di Crescenzo, R.M.; Gianno, F.; Colonnese, C.; Arcella, A.; De Alcubierre, D.; Tomao, S.; Esposito, V.; et al. Immunotherapy for Aggressive and Metastatic Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNETs): State-of-the Art. *Cancers* **2022**, *14*, 4093. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Ilie, M.D.; Lasolle, H.; Raverot, G. Emerging and Novel Treatments for Pituitary Tumors. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Yang, H.; Thornton, L.M.; Shapiro, C.L.; Andersen, B.L. Surviving Recurrence: Psychological and Quality-of-life Recovery. *Cancer* **2008**, *112*, 1178–1187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Osann, K.; Wenzel, L.; McKinney, C.; Wagner, L.; Cella, D.; Fulci, G.; Scroggins, M.J.; Lankes, H.A.; Wang, V.; Nephew, K.P.; et al. Fear of Recurrence, Emotional Well-Being and Quality of Life among Long-Term Advanced Ovarian Cancer Survivors. *Gynecol. Oncol.* **2023**, *171*, 151–158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Jimenez-Canizales, C.E.; Rojas, W.; Alonso, D.; Romero, I.; Tabares, S.; Veronesi Zuluaga, L.A.; Modica, R.; Colao, A. Clinical Presentation and Recurrence of Pituitary Neuroendocrine Tumors: Results from a Single Referral Center in Colombia. *J. Endocrinol. Investig.* **2023**, *46*, 2275–2286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

11. De Marchi, E.; Orioli, E.; Pegoraro, A.; Sangaletti, S.; Portararo, P.; Curti, A.; Colombo, M.P.; Di Virgilio, F.; Adinolfi, E. The P2X7 Receptor Modulates Immune Cells Infiltration, Ectonucleotidases Expression and Extracellular ATP Levels in the Tumor Microenvironment. *Oncogene* **2019**, *38*, 3636–3650. [CrossRef] [PubMed]
12. Kawano, A.; Hayakawa, A.; Kojima, S.; Tsukimoto, M.; Sakamoto, H. Purinergic Signaling Mediates Oxidative Stress in UVA-Exposed THP-1 Cells. *Toxicol. Rep.* **2015**, *2*, 391–400. [CrossRef] [PubMed]
13. Kepp, O.; Bezu, L.; Yamazaki, T.; Di Virgilio, F.; Smyth, M.J.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. ATP and Cancer Immunosurveillance. *EMBO J.* **2021**, *40*, e108130. [CrossRef] [PubMed]
14. Haas, C.B.; Lovász, M.; Braganhol, E.; Pacher, P.; Haskó, G. Ectonucleotidases in Inflammation, Immunity, and Cancer. *J. Immunol.* **2021**, *206*, 1983–1990. [CrossRef] [PubMed]
15. Manica, A.; Da Silva, A.M.; Cardoso, A.M.; Moreno, M.; Leal, D.B.; Dutra Da Silva, A.; Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M.M.; Bagatini, M.D. High Levels of Extracellular ATP Lead to Chronic Inflammatory Response in Melanoma Patients. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 3980–3988. [CrossRef] [PubMed]
16. Mandapathil, M.; Boduc, M.; Roessler, M.; Güldner, C.; Walliczek-Dworschak, U.; Mandic, R. Ectonucleotidase CD39 Expression in Regional Metastases in Head and Neck Cancer. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* **2018**, *138*, 428–432. [CrossRef] [PubMed]
17. Di Virgilio, F.; Vuerich, M. Purinergic Signaling in the Immune System. *Auton. Neurosci.* **2015**, *191*, 117–123. [CrossRef] [PubMed]
18. Burnstock, G.; Boeynaems, J.-M. Purinergic Signalling and Immune Cells. *Purinergic Signal.* **2014**, *10*, 529–564. [CrossRef] [PubMed]
19. Zelentsova, A.S.; Deykin, A.V.; Soldatov, V.O.; Ulezko, A.A.; Borisova, A.Y.; Belyaeva, V.S.; Skorkina, M.Y.; Angelova, P.R. P2X7 Receptor and Purinergic Signaling: Orchestrating Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *eneuro* **2022**, *9*, ENEURO.0092-22.2022. [CrossRef] [PubMed]
20. Jelic, M.D.; Mandic, A.D.; Maricic, S.M.; Srdjenovic, B.U. Oxidative Stress and Its Role in Cancer. *J. Cancer Res. Ther.* **2021**, *17*, 22–28. [CrossRef] [PubMed]
21. Huang, Z.; Zhou, L.; Duan, J.; Qin, S.; Jiang, J.; Chen, H.; Wang, K.; Liu, R.; Yuan, M.; Tang, X.; et al. Oxidative Stress Promotes Liver Cancer Metastasis via RNF25-Mediated E-Cadherin Protein Degradation. *Adv. Sci.* **2024**, *11*, 2306929. [CrossRef] [PubMed]
22. Nguyen, A.; Patel, A.B.; Kioutchoukova, I.P.; Diaz, M.J.; Lucke-Wold, B. Mechanisms of Mitochondrial Oxidative Stress in Brain Injury: From Pathophysiology to Therapeutics. *Oxygen* **2023**, *3*, 163–178. [CrossRef]
23. Zhou, Y.; Zhang, A.; Fang, C.; Yuan, L.; Shao, A.; Xu, Y.; Zhou, D. Oxidative Stress in Pituitary Neuroendocrine Tumors: Affecting the Tumor Microenvironment and Becoming a New Target for Pituitary Neuroendocrine Tumor Therapy. *CNS Neurosci. Ther.* **2023**, *29*, 2744–2759. [CrossRef] [PubMed]
24. Jafari, E.; Ahmadzadehfar, H.; Bagheri, D.; Amini, A.; Assadi, M. Assessment of Early Oxidative Stress Following the Use of Radiotheranostics Agents ¹⁷⁷Lu-PSMA for Prostate Cancer and ¹⁷⁷Lu-DOTATATE for Neuroendocrine Tumors; Radioprotective Effect of Vitamin C. *Nucl. Med. Commun.* **2021**, *42*, 325–331. [CrossRef] [PubMed]
25. World Health Organization. *A Healthy Lifestyle—WHO Recommendations*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010.
26. Trivellin, G.; Hernández-Ramírez, L.C.; Swan, J.; Stratakis, C.A. An Orphan G-Protein-Coupled Receptor Causes Human Gigantism and/or Acromegaly: Molecular Biology and Clinical Correlations. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *32*, 125–140. [CrossRef] [PubMed]
27. Carbonara, F.; Feola, T.; Gianno, F.; Polidoro, M.A.; Di Crescenzo, R.M.; Arcella, A.; De Angelis, M.; Morace, R.; De Alcubierre, D.; Esposito, V.; et al. Clinical and Molecular Characteristics of Gonadotroph Pituitary Tumors According to the WHO Classification. *Endocr. Pathol.* **2024**, *35*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
28. Iyengar, N.M.; Gucalp, A.; Dannenberg, A.J.; Hudis, C.A. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 4270–4276. [CrossRef] [PubMed]
29. Avgerinos, K.I.; Spyrou, N.; Mantzoros, C.S.; Dalamaga, M. Obesity and Cancer Risk: Emerging Biological Mechanisms and Perspectives. *Metabolism* **2019**, *92*, 121–135. [CrossRef] [PubMed]
30. Lochner, R.H.; Delfin, L.; Nezami, B.G.; Cohen, M.L.; Asa, S.L.; Burguera, B.; Couce, M.E. Severe Obesity Associated With Pituitary Corticotroph Hyperplasia and Neoplasia. *Endocr. Pract.* **2023**, *29*, 471–477. [CrossRef] [PubMed]
31. WHO Obesity and Overweight 2024. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 13 July 2025).
32. Asa, S.L.; Mete, O.; Perry, A.; Osamura, R.Y. Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr. Pathol.* **2022**, *33*, 6–26. [CrossRef] [PubMed]
33. Armeni, E.; Grossman, A. The Spectrum of Familial Pituitary Neuroendocrine Tumors. *Endocr. Pathol.* **2023**, *34*, 57–78. [CrossRef] [PubMed]
34. Da Silva, G.B.; Manica, D.; Dallagnol, P.; Narzetti, R.A.; Marafon, F.; Da Silva, A.P.; Matias, L.d.S.; Cassol, J.V.; Moreno, M.; Kempka, A.P.; et al. Rosmarinic Acid Modulates Purinergic Signaling and Induces Apoptosis in Melanoma Cells. *Purinergic Signal.* **2024**, *21*, 353–363. [CrossRef] [PubMed]

35. Zanini, D.; Schmatz, R.; Pimentel, V.C.; Gutierrez, J.M.; Maldonado, P.A.; Thomé, G.R.; Cardoso, A.M.; Stefanello, N.; Oliveira, L.; Chiesa, J.; et al. Lung Cancer Alters the Hydrolysis of Nucleotides and Nucleosides in Platelets. *Biomed. Pharmacother.* **2012**, *66*, 40–45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Dong, C.-R.; Hu, D.-X.; Liu, S.-C.; Luo, H.-L.; Zhang, W.-J. AKT/GSK-3 β /VEGF Signaling Is Involved in P2RY2 Activation-Induced the Proliferation and Metastasis of Gastric Cancer. *Carcinogenesis* **2023**, *44*, 65–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Burnstock, G.; Di Virgilio, F. Purinergic Signalling and Cancer. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 491–540. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Cao, Y.; Chen, E.; Wang, X.; Song, J.; Zhang, H.; Chen, X. An Emerging Master Inducer and Regulator for Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Metastasis: Extracellular and Intracellular ATP and Its Molecular Functions and Therapeutic Potential. *Cancer Cell Int.* **2023**, *23*, 20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Di Virgilio, F.; Vultaggio-Poma, V.; Falzoni, S.; Giuliani, A.L. Extracellular ATP: A Powerful Inflammatory Mediator in the Central Nervous System. *Neuropharmacology* **2023**, *224*, 109333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Di Virgilio, F.; Dal Ben, D.; Sarti, A.C.; Giuliani, A.L.; Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **2017**, *47*, 15–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Carlini, V.; Noonan, D.M.; Abdalalem, E.; Goletti, D.; Sansone, C.; Calabrone, L.; Albini, A. The Multifaceted Nature of IL-10: Regulation, Role in Immunological Homeostasis and Its Relevance to Cancer, COVID-19 and Post-COVID Conditions. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1161067. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Kim, Y.; Yang, H.; Lee, W.S.; Cheon, J.; Sang, Y.B.; Kang, B.; Chon, H.J.; Kim, C. High Levels of Baseline Serum IL-10 Are Associated with Reduced Clinical Benefit from First-Line Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Advanced Renal Cell Carcinoma. *J. Cancer* **2023**, *14*, 935–942. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Czajka-Francuz, P.; Francuz, T.; Cisoń-Jurek, S.; Czajka, A.; Fajkis, M.; Szymczak, B.; Kozaczka, M.; Malinowski, K.P.; Zasada, W.; Wojnar, J.; et al. Serum Cytokine Profile as a Potential Prognostic Tool in Colorectal Cancer Patients—One Center Study. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **2020**, *25*, 867–875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Hunter, C.A. New IL-12-Family Members: IL-23 and IL-27, Cytokines with Divergent Functions. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 521–531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Imamichi, T.; Bai, X.-F.; Robinson, C.; Gee, K. Editorial: IL-27 in Health and Disease. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1191228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kountz, T.S.; Jairaman, A.; Kountz, C.D.; Stauderman, K.A.; Schleimer, R.P.; Prakriya, M. Differential Regulation of ATP- and UTP-Evoked Prostaglandin E2 and IL-6 Production from Human Airway Epithelial Cells. *J. Immunol.* **2021**, *207*, 1275–1287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Nortey, A.; Garcés, K.; Hackam, A. Exploring the Role of Interleukin-27 as a Regulator of Neuronal Survival in Central Nervous System Diseases. *Neural Regen. Res.* **2022**, *17*, 2149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Mascanfroni, I.D.; Yeste, A.; Vieira, S.M.; Burns, E.J.; Patel, B.; Sloma, I.; Wu, Y.; Mayo, L.; Ben-Hamo, R.; Efroni, S.; et al. IL-27 Acts on DCs to Suppress the T Cell Response and Autoimmunity by Inducing Expression of the Immunoregulatory Molecule CD39. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1054–1063. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Doseděl, M.; Jirkovský, E.; Macáková, K.; Krčmová, L.; Javorská, L.; Pourová, J.; Mercolini, L.; Remião, F.; Nováková, L.; Mladěnka, P.; et al. Vitamin C—Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. *Nutrients* **2021**, *13*, 615. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Tossounian, M.-A.; Zhao, Y.; Yu, B.Y.K.; Markey, S.A.; Malanchuk, O.; Zhu, Y.; Cain, A.; Gout, I. Low-Molecular-Weight Thiol Transferases in Redox Regulation and Antioxidant Defence. *Redox Biol.* **2024**, *71*, 103094. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Salbitani, G.; Maresca, V.; Cianciullo, P.; Bossa, R.; Carfagna, S.; Basile, A. Non-Protein Thiol Compounds and Antioxidant Responses Involved in Bryophyte Heavy-Metal Tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5302. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Manica, D.; Sandri, G.; Da Silva, G.B.; Manica, A.; Da Silva Rosa Bonadiman, B.; Dos Santos, D.; Flores, É.M.M.; Bolzan, R.C.; Barcelos, R.C.S.; Tomazoni, F.; et al. Evaluation of the Effects of Metformin on Antioxidant Biomarkers and Mineral Levels in Patients with Type II Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional Study. *J. Diabetes Complications* **2023**, *37*, 108497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Böyum, A. Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. Isolation of Mononuclear Cells by One Centrifugation, and of Granulocytes by Combining Centrifugation and Sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **1968**, *97*, 77–89.
54. Lunkes, G.I.; Lunkes, D.; Stefanello, F.; Morsch, A.; Morsch, V.M.; Mazzanti, C.M.; Schetinger, M.R.C. Enzymes That Hydrolyze Adenine Nucleotides in Diabetes and Associated Pathologies. *Thromb. Res.* **2003**, *109*, 189–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Pilla, C.; Emanuelli, T.; Frassetto, S.S.; Battastini, A.M.O.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J.F. ATP Diphosphohydrolase Activity (Apyrase, EC 3.6.1.5) in Human Blood Platelets. *Platelets* **1996**, *7*, 225–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Ali, S.F.; LeBel, C.P.; Bondy, S.C. Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. *Neurotoxicology* **1992**, *13*, 637–648. [\[PubMed\]](#)
57. Jentzsch, A.M.; Bachmann, H.; Fürst, P.; Biesalski, H.K. Improved Analysis of Malondialdehyde in Human Body Fluids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 251–256. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

58. Suzuki, K.; Ota, H.; Sasagawa, S.; Sakatani, T.; Fujikura, T. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Anal. Biochem.* **1983**, *132*, 345–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wehr, N.B.; Levine, R.L. Quantification of Protein Carbonylation. In *Cell Senescence*; Galluzzi, L., Vitale, I., Kepp, O., Kroemer, G., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2013; ISBN 978-1-62703-238-4.
60. Jacques-Silva, M.C.; Nogueira, C.W.; Broch, L.C.; Flores, É.M.M.; Rocha, J.B.T. Diphenyl Diselenide and Ascorbic Acid Changes Deposition of Selenium and Ascorbic Acid in Liver and Brain of Mice: DEPOSITION OF SELENIUM AND ASCORBIC ACID IN LIVER AND BRAIN OF MICE. *Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *88*, 119–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Ellman, G.L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.