



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Hugo Guilherme Martins Tolentino de Souza

Impacto da gastroplastia sob o metabolismo da tetraidrobiopterina e biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos com obesidade

Florianópolis
2023

Hugo Guilherme Martins Tolentino de Souza

Impacto da gastroplastia sob o metabolismo da tetraidrobiopterina e biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos com obesidade

Defesa de dissertação de Mestrado em Bioquímica
submetida ao Programa de Pós graduação em
Bioquímica da Universidade Federal de Santa
Catarina
Orientadora: Alexandra Latini

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martins Tolentino de Souza, Hugo Guilherme
Impacto da gastroplastia sob o metabolismo da
tetraidrobiopterina e biomarcadores de estresse oxidativo
em indivíduos com obesidade / Hugo Guilherme Martins
Tolentino de Souza ; orientadora, Alexandra Latini, 2023.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Tetraidrobiopterina. 3. Obesidade. 4.
Gastroplastia. 5. Metainflamação. I. Latini, Alexandra. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. III. Título.

Hugo Guilherme Martins Tolentino de Souza

Impacto da gastroplastia sob o metabolismo da tetraidrobiopterina e biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos com obesidade

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 14 de julho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Carla Inês Tasca, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Aline Remor Dr.(a)

Instituição: Universidade do Oeste de Santa Catarina

Prof.(a) Tuany Eichwald Dr.(a)

Instituição: Karolinska Institutet

Prof.(a) Alexandre Muller Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Alexandra Susana Latini

Orientadora

Florianópolis, 2023

Dedico este trabalho a minha mãe, Ironice da Costa Martins, meu pai, Hugo Tolentino de Souza Filho e **minha eterna segunda mãe**, Micheline Bastos Gregório.

Eureka!
Arquimedes de Siracusa

Agradecimentos

Gostaria de agradecer inicialmente a entropia da vida, que na sua desordem, proporciona caminhos e vivências que trilhamos com dedicação e amor, dando significado a jornada. Serei sempre grato a vida, a possibilidade de sonhar e a curiosidade de saber.

Agradeço imensamente aos meus familiares, minha mãe Ironice da Costa Martins, e meu pai, Hugo Tolentino de Souza Filho, por acreditarem plenamente em minha capacidade. Agradeço minha irmã Priscila Martins Gonçalves, por me ouvir e me estimular a manter o foco nos sonhos.

Agradeço ao Leonardo Bragagnolo, pelo amor e companheirismo incondicional durante o período de mestrado. Agradeço também ao meu cachorro Apolo, que deixava as “voltas para casa” uma explosão de dopamina com seus lambeijos.

Agradeço a Alexandra Latini, por todos os ensinamentos científicos, principalmente por ensinar olhar para o horizonte na ciência. Muito obrigado pela paciência e dedicação ao longo deste período do mestrado.

Agradeço também ao Romuel e a Jennyffer, companheiros de laboratório que mais convivi e que me proporcionaram aprendizados que levarei para sempre em minha vida. Agradeço as alunas de iniciação científica Ana Carolina e Maria Eduarda, pelo auxílio nas etapas finais do trabalho. Sem a ajuda de vocês não teria conseguido!

Agradeço também ao Luís Felipe Marqueze, que apesar de ter convivido por pouco tempo no laboratório, foi de grande ajuda e apoio nas etapas finais deste trabalho. Agradeço também a todos os membros da equipe LABOX, que foi minha casa científica neste período que aprendi tanto.

Agradeço a todos os professores do PPGBQA, todos são inspirações na pesquisa. Agradeço aos amigos que fiz na UFSC, ao Gianni, Beatriz, Pedro, Melânia, Ana, Louise, Lucas, Bruna, Robson. Recebi tantas ajudas neste período que não caberiam o nome de todos aqui para agradecer... Muito obrigado!

Agradeço ao corpo técnico do LAMEB, em especial a Bibiana e a Flavia, que nunca mediram esforços para me auxiliar quando necessário.

Agradeço aos participantes que aceitaram participar deste projeto, aos médicos que fizeram ser capaz a coleta dessas amostras tão preciosas e os técnicos do hospital universitário que sempre estavam dispostos a realizar as coletas das amostras biológicas dos participantes.

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela expansão do tecido adiposo devido ao acúmulo de gordura excessivo. A gastroplastia tem mostrado ser o tratamento mais eficaz para reduzir a massa corporal e os distúrbios metabólicos característicos da obesidade grave. Biomarcadores antropométricos e bioquímicos-clínicos atualmente não fornecem informações detalhadas sobre o grau de inflamação no tecido adiposo (TA). A busca por novos biomarcadores que reflitam a severidade da obesidade, bem como a monitorização dos desfechos clínicos após a gastroplastia é uma necessidade ainda não atendida. Ambientes inflamatórios crônicos têm sido associados à regulação positiva de pequenas moléculas, como a tetraidrobiopterina (BH4), que se acumulam em fluidos biológicos. **Objetivos:** Mensurar os produtos do metabolismo da BH4 em fluidos biológicos de indivíduos elegíveis a cirurgia bariátrica antes do momento da cirurgia e após 12 meses da intervenção cirúrgica. **Métodos:** Estudo longitudinal conduzido entre 03/2021 e 06/2023 que incluiu 54 indivíduos com obesidade grave elegíveis para cirurgia bariátrica no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC). Um grupo de voluntários saudáveis definidos como controles foi incluído para comparação de parâmetros bioquímicos. Foram coletados dados antropométricos e bioquímicos pela equipe médica de endocrinologia e metabologia do HU-UFSC, além de amostras de sangue e urina antes da cirurgia e 12 meses após a intervenção (25 indivíduos após 12 meses). Durante a cirurgia, foram coletadas amostras de TA visceral e subcutâneo. As amostras de fluidos biológicos foram utilizadas para avaliar os parâmetros do metabolismo da BH4 e o nível de estresse oxidativo, enquanto as amostras de TA foram usadas para avaliar o metabolismo da BH4 e os níveis de estresse oxidativo. **Resultados:** Foram observados níveis urinários significativamente diminuídos de BH4 [$t_{(107)} = 6,00$; $P < 0,001$], e valores plasmáticos aumentados de neopterinina [$t_{(77)} = 2,45$; $P < 0,05$] nos indivíduos com obesidade. Os indivíduos com obesidade apresentaram também níveis elevados de marcadores de inflamação e de estresse oxidativo no plasma, evidenciado pelos valores aumentados de proteína C reativa (PCR) [$t_{(70)} = 4,18$; $P < 0,001$], razão entre neutrófilos e linfócitos (NLR) [$t_{(75)} = 3,68$; $P < 0,001$] e entre plaquetas e linfócitos (PLR) [$t_{(72)} = 2,18$; $P < 0,05$]. Além disso, houve uma redução significativa nos níveis de glutatona (GSH) [$t_{(79)} = 2,65$; $P < 0,01$], e aumento significativo de espécies reativas de ácido barbitúrico (TBA-RS) [$t_{(46)} = 3,55$; $P < 0,001$]. Um aumento significativo do metabolismo da BH4 no tecido adiposo visceral (TAV) foi observado em comparação com o tecido adiposo subcutâneo (TAS), evidenciado pelo maior conteúdo da enzima sepiapterina redutase [$t_{(85)} = 3,97$; $P < 0,001$]. Além disso, observamos um aumento significativo nos níveis de GSH [$t_{(92)} = 2,1$; $P < 0,05$]; e da razão entre GSH e GSSG (forma oxidada da GSH) no TAV [$t_{(90)} = 1,67$; $P < 0,05$]. Por meio da análise da curva característica de operação do receptor (ROC), foi identificado que os níveis urinários de BH4 classificaram com alta sensibilidade indivíduos com obesidade elegíveis para cirurgia bariátrica, com uma área sob a curva (AUC) de 0,82 (IC 95%: 0,73 - 0,90), sensibilidade de 82 % e especificidade de 68,5 %, utilizando um valor de corte de 0,37 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina. Após 12 meses da gastroplastia foi observado um aumento significativo nos níveis urinários de BH4 [$t_{(11)} = 2,76$; $P < 0,01$], e uma redução significativa nos níveis plasmáticos de neopterinina [$t_{(23)} = 4,53$; $P < 0,001$]. Também verificamos que os parâmetros inflamatórios e oxidativos, como PCR [$W_{(20)} = -167$; $P < 0,001$], NLR [$W_{(20)} = -153$; $P < 0,001$]; PLR [$t_{(18)} = 2,22$; $P < 0,05$], GSH [$t_{(18)} = 1,98$; $P < 0,05$], e TBA-RS [$t_{(13)} = 5,30$; $P < 0,001$] foram restaurados após 12 meses da intervenção cirúrgica. **Conclusão:** A mensuração BH4

e neopterinina em fluidos biológicos tem o potencial de se transformar em ferramentas quantitativas que permitam classificar indivíduos com obesidade, e monitorar as melhoras promovidas pela gastroplastia.

Palavras-chave: metainflamação, tecido adiposo, neopterinina, doenças metabólicas, inflamação crônica, cirurgia bariátrica

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a chronic inflammatory disease characterized by the expansion of adipose tissue due to fat accumulation. Gastroplasty has been shown to be the most effective treatment for reducing body mass and metabolic disorders associated with severe obesity. Currently, anthropometric and biochemical-clinical biomarkers do not provide detailed information about the degree of inflammation in adipose tissue (AT). The search for new biomarkers that reflect the severity of obesity, as well as the monitoring of clinical outcomes after gastroplasty, remains an unmet need. Chronic inflammatory environments have been associated with the upregulation of small molecules, such as tetrahydrobiopterin (BH4), which accumulate in biological fluids. **Objectives:** To measure BH4 metabolism products in biological fluids of individuals eligible for bariatric surgery before surgery and after 12 months of surgery. **Methods:** A longitudinal study conducted between 03/2021 and /2023, which included 54 individuals with severe obesity eligible for bariatric surgery at the Polydoro Ernani University Hospital of São Thiago, Federal University of Santa Catarina (HU-UFSC). A group of healthy volunteers defined as controls was included for biochemical parameter comparison. Anthropometric and biochemical data were collected by the medical team of endocrinology and metabolism at HU-UFSC, along with blood and urine samples before surgery and 12 months after the intervention (25 individuals after 12 months). During surgery, samples of visceral and subcutaneous AT were collected. Biological fluid samples were used to evaluate BH4 metabolism parameters and oxidative stress levels, while AT samples were used to assess BH4 metabolism and oxidative stress levels. **Results:** Significantly decreased urinary levels of BH4 [$t_{(107)}= 6.00$; $P < 0.001$], and increased plasma levels of neopterin [$t_{(77)}= 2.45$; $P < 0.05$] were observed in individuals with obesity. Individuals with obesity also showed elevated levels of inflammation and oxidative stress markers in plasma, as evidenced by increased levels of C-reactive protein (CRP) [$t_{(70)}= 4.18$; $P < 0.001$], neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) [$t_{(75)}= 3.68$; $P < 0.001$], and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) [$t_{(72)}= 2.18$; $P < 0.05$]. Additionally, there was a significant reduction in glutathione (GSH) levels [$t_{(79)}= 2.65$; $P < 0.01$] and a significant increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) [$t_{(46)}= 3.55$; $P < 0.001$]. A significant increase in BH4 metabolism in visceral adipose tissue (VAT) was observed compared to subcutaneous adipose tissue (SAT), as evidenced by the higher content of sepiapterin reductase enzyme [$t_{(85)}= 3.97$; $P < 0.001$]. Furthermore, a significant increase in GSH levels [$t_{(92)}= 2.1$; $P < 0.05$] and the ratio of GSH to GSSG (oxidized form of GSH) in VAT [$t_{(90)}= 1.67$; $P < 0.05$] was observed. By analyzing the receiver operating characteristic (ROC) curve, it was identified that urinary BH4 levels classified individuals with obesity eligible for bariatric surgery with high sensitivity, with an area under the curve (AUC) of 0.82 (95% CI: 0.73 - 0.90), sensitivity of 82%, and specificity of 68.5%, using a cutoff value of 0.37 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ of creatinine. After 12 months of gastroplasty, a significant increase in urinary BH4 levels [$t_{(11)}= 2.76$; $P < 0.01$] and a significant reduction in plasma levels of neopterin [$t_{(23)}= 4.53$; $P < 0.001$] were observed. Furthermore, it was found that inflammatory and oxidative parameters, such as CRP [$W_{(20)} = -167$; $P < 0.001$], NLR [$W_{(20)} = -153$; $P < 0.001$], PLR [$t_{(18)} = 2.22$; $P < 0.05$], GSH [$t_{(18)} = 1.98$; $P < 0.05$], and TBA-RS [$t_{(13)} = 5.30$; $P < 0.001$], were restored after 12 months of surgical intervention. **Conclusion:** The measurement of BH4 and neopterin in biological fluids has the potential to become quantitative tools that allow for the classification of individuals with obesity and monitoring of improvements promoted by gastroplasty.

Keywords: meta-inflammation, adipose tissue, neopterin, metabolic diseases, chronic inflammation, bariatric surgery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representações dos procedimentos cirúrgicos <i>bypass</i> e <i>sleeve</i>	23
Figura 2. Principais diferenças dos adipócitos no tecido adiposo (TA) branco (TAB), marrom (TAM) e bege.	28
Figura 3. Distribuição do tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM) no indivíduo com obesidade apresentando acúmulo ectópico de gordura em diferentes órgãos.	31
Figura 4. Perfil de células inflamatórias no tecido adiposo saudável e na obesidade.	33
Figura 5. Cofatores produzidos de forma endógena que compartilham o anel pteridínico.	36
Figura 6. Vias metabólicas envolvidas na biossíntese da tetraidrobiopterina (BH4) e as enzimas que a utilizam como cofator.	38
Figura 7. Delineamento experimental.	26
Figura 8. Fluxograma de inclusão e exclusão dos participantes.	26
Figura 9. Homogenato de tecido adiposo após homogeneização e centrifugação ...	30
Figura 10. Níveis de metabólitos do metabolismo da tetraidrobiopterina (BH4) em fluidos biológicos de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.	35
Figura 11 . Níveis de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no sangue de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.	37
Figura 12. Curva característica de operação do receptor (ROC) para níveis urinários de tetraidrobiopterina (BH4), de níveis plasmáticos de neopterina, glutathione (GSH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e de proteína C reativa (PCR), e de valores sanguíneos da razão de neutrófilos por linfócitos (NLR), e da razão de plaquetas por linfócitos (PLR) em indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.	39
Figura 13. Distribuição dos níveis urinários de BH4 em indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica de acordo com o sexo, índice de HOMA-IR, diagnóstico de HAS, função hepática e marcadores sanguíneos de inflamação.	41
Figura 14. Distribuição dos níveis plasmáticos de neopterina em indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica de acordo	

com o sexo, índice de HOMA-IR, diagnóstico de HAS, função hepática e marcadores sanguíneos de inflamação.	42
Figura 15. Conteúdo proteico de sepiapterina redutase (SPR) no tecido adiposo subcutâneo (TAS) e visceral (TAV) de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.....	43
Figura 16. Concentrações de glutathiona (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no tecido adiposo subcutâneo (TAS) e visceral (TAV) de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.....	44
Figura 17. Mapa de calor relacionando os níveis de tetraidrobiopterina (BH4) urinária e de neopterina plasmática com variáveis antropométricas, inflamatórias e de estresse oxidativo obtidas de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.....	46
Figura 18. Mapa de calor relacionando os níveis de tetraidrobiopterina (BH4), neopterina e biomarcadores de estresse oxidativo no plasma e TA com variáveis do perfil glicêmico e lipídico obtidas de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.....	47
Figura 19. Efeito da redução de peso provocado pela cirurgia bariátrica sobre os níveis de tetraidrobiopterina (BH4) e neopterina em fluidos biológicos de indivíduos acometidos por obesidade e submetidos a gastroplastia.	49
Figura 20. Efeito da redução de peso provocado pela cirurgia bariátrica sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em fluidos biológicos de indivíduos acometidos por obesidade e submetidos a gastroplastia.	51
Figura 21. Curva característica de operação do receptor (ROC) para níveis urinários de tetraidrobiopterina (BH4), de níveis plasmáticos de neopterina, glutathiona (GSH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e de proteína C reativa (PCR), e de valores sanguíneos da razão de neutrófilos por linfócitos (NLR), e da razão de plaquetas por linfócitos (PLR) em indivíduos com obesidade 12 meses após da intervenção com cirurgia bariátrica.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificações antropométricas utilizadas para a avaliação do estado corporal e severidade da obesidade	20
Quadro 2. Hormônios relacionados à regulação do peso e seus efeitos metabólicos.	22
Quadro 3. Definições de diferentes biomarcadores existentes	25
Quadro 4 - Principais adipocinas e seu efeito fisiológico relatados na literatura	29
Quadro 5. Características demográficas e antropométricas dos participantes no momento Pré	26
Quadro 6. Características demográficas e antropométricas dos participantes no momento Pós	27
Quadro 7. Valores da área baixo da curva (AUC) gerada pela análise da curva característica de operação do receptor (ROC) de biomarcadores para identificação de indivíduos com obesidade.	40
Quadro 8. Comparação das variáveis antropométricas e bioquímicas no momento da intervenção cirúrgica (Pré) e após 12 meses (Pós) nos participantes afetados por obesidade e submetidos a cirurgia bariátrica.	48
Quadro 9. Valores da área baixo da curva (AUC) gerada pela análise da curva característica de operação do receptor (ROC) de biomarcadores para identificação de indivíduos com obesidade 12 meses após a gastroplastia.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ALT	Alanino aminotransferase
AR	Aldose redutase
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área abaixo da curva
BH2	Diidrobiopterina
BH4	Tetraidrobiopterina
CR	Carbonil redutase
CT	Colesterol total
DHFR	Diidrofolato redutase
DHPR	Diidropteridina redutase
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GTP	Trifosfato de guanosina
GCH1	Gene para guanosina cicloidrolase 1
GGT	Gamma glutamil transferase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GTPCH	Enzima GTP cicloidrolase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hb1Ac	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
HOMA-IR	do inglês <i>Homeostatic model assesment</i>
HU/UFSC	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon γ
IIQ	Intervalo interquartil;
IL-1 β	Interleucina 1 β
IMC	Índice de massa corporal

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
NLR	Neutrófilos/ linfócitos
NO	Óxido nítrico
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
ns	Não significativo
PCD	Pterina-4-alfa-carbinolamina desidratase
PLR	plaquetas/ linfócitos
PCR	Proteína C reativa
PTPS	6-piruvil tetraidropterina sintase
ROC	Curva de operação do receptor
SPR	Sepiapterina redutase
SUS	Sistema único de saúde
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
TBA-RS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGC	Triglicerídeos
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	OBESIDADE	20
2.2	BIOMARCADORES.....	24
2.3	TECIDO ADIPOSEO.....	27
2.3.1	TECIDO ADIPOSEO NA OBESIDADE	30
2.4	A ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE NA OBESIDADE	31
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO NA OBESIDADE.....	34
2.6	METABOLISMO DA BH4	36
2.6.1	BH4 NO CONTEXTO INFLAMATÓRIO E OXIDANTE.....	38
3	HIPÓTESE	41
4	OBJETIVOS.....	42
4.1	OBJETIVO GERAL.....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5	METODOLOGIA	43
5.1	INCLUSÃO DOS PACIENTES COM OBESIDADE PARA O ESTUDO.....	43
5.2	SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE.....	27
5.3	COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	27
5.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	28
5.4.1	AMOSTRAS DE SANGUE	28
5.4.2	AMOSTRAS DE URINA	29
5.4.3	AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO	29
5.5	EXAMES LABORATORIAIS	30
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE BH4 E NEOPTERINA EM AMOSTRAS DE PLASMA E URINA	30
5.6.1	QUANTIFICAÇÃO DA BH4 NA URINA POR HPLC	30
5.6.2	QUANTIFICAÇÃO DE NEOPTERINA POR ELISA.....	31
5.6.3	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CREATININA.....	31
5.7	MENSURAÇÕES DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO ...	31
5.7.1	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH NO PLASMA E TECIDO ADIPOSEO.	31
5.7.2	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSSG NO TECIDO ADIPOSEO.....	32

5.7.3	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TBA-RS NO PLASMA E TECIDO ADIPOSEO	33
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE SEPIAPTERINA REDUTASE NO TA	33
5.8.1	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
6	RESULTADOS.....	35
7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÃO	64
9	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	65
10	PERSPECTIVAS.....	66
11	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde (WHO, 2018). O diagnóstico da obesidade é baseado no índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 30. Além deste marcador antropométrico, a circunferência abdominal também é utilizada na prática clínica para acompanhar a evolução da obesidade e pode ser um indicativo de complicações cardiovasculares (ROSS et al., 2020). No entanto, essas abordagens não oferecem uma avaliação detalhada da distribuição da gordura nos tecidos, nem permitem a identificação do grau de inflamação sistêmico ou localizado no tecido adiposo (TA). A falta de biomarcadores quantificáveis tem sido um desafio no campo da pesquisa clínica, comprometendo o acompanhamento e as intervenções no tratamento da obesidade.

A excessiva expansão do TA na obesidade provoca estresse mecânico, hipóxia e necrose dos adipócitos. Esses processos desencadeiam sinalizações pró-inflamatórias que mudam o perfil da resposta das células imunes residentes no tecido adiposo, como macrófagos e linfócitos, para um fenótipo pró-inflamatório, o que promove a liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL-1 β) e interferon gamma (IFN- γ), e maior infiltrado imune, sustentando o desenvolvimento da inflamação crônica na obesidade e de suas comorbidades (REILLY; SALTIEL, 2017). Além disso, o aumento de infiltrado imune no TA promove estresse oxidativo tecidual, pelo aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) nessas células imunes. O estresse oxidativo também pode se estender a nível sistêmico, fato que ocorre pelo extravasamento de lipídeos do TA e consequente acúmulo ectópico em outros tecidos (MARSEGLIA et al., 2014). Esse ambiente pró-inflamatório propicia um cenário permissivo para a regulação positiva da síntese de pequenas moléculas, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo da tetraidrobiopterina (BH4). No entanto, é importante considerar que o estado pró-oxidativo também pode provocar a queda na concentração dessa novas moléculas. Isso pode levar a um desequilíbrio no metabolismo da BH4 e contribuir para a disfunção celular e tecidual associada à obesidade e ao estresse oxidativo. Essa regulação positiva do fluxo metabólico do

metabolismo da BH4 leva ao acúmulo de metabólitos que podem ser quantificados em fluidos biológicos, e que nos últimos anos têm mostrado ter alto potencial para ser empregados como índices que podem correlacionar com o estado inflamatório, por exemplo a neopterina, ou com o estado oxidativo, como a BH4, em diversas doenças inflamatórias crônicas.

A BH4 é um cofator essencial para a síntese de neurotransmissores aminérgicos e de óxido nítrico (NO), e para o metabolismo da fenilalanina e éter lipídicos [para revisão ver (Eichwald et al., 2023)]. As concentrações intracelulares de BH4 podem ser rapidamente aumentadas pelos mediadores inflamatórios que acumulam em fluidos biológicos de indivíduos afetados por obesidade (REILLY; SALTIEL, 2017; WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). Por exemplo, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α provocam o aumento da expressão de *Gch1*, gene que codifica para a enzima limitante da síntese de BH4, a guanosina trifosfato cicloidrolase (GTPCH). Este estímulo pode aumentar em até 100 vezes em células imunes, enquanto que o restante do metabolismo permanece quase inalterado. Isso leva ao acúmulo de intermediários metabólicos que resultam na produção não enzimática de neopterina, um biomarcador usado na prática clínica para avaliar de forma sensível a ativação do sistema imune (FUCHS et al., 1993). Ainda, nosso grupo de pesquisa demonstrou que concentrações excessivas da BH4 aumentam a agressividade da resposta imune, evidenciada por um aumento do infiltrado imunológico incluindo macrófagos e linfócitos T CD4+ em tecidos de modelos animais de doenças inflamatórias crônicas (CRONIN et al., 2018; LATREMOLIERE et al., 2015).

Por outro lado, sabe-se que a BH4 possui capacidade de neutralização de ERO e ERN, apresentando um papel de proteção celular frente ao estresse oxidativo gerado na inflamação (FOXTON; LAND; HEALES, 2007; PATEL et al., 2002). Assim, o estado pró-oxidante na obesidade pode consumir as novas moléculas de BH4 que são sintetizadas durante o aumento do seu fluxo de síntese que ocorre durante ativação pro-inflamatória das células imunes no TA. Dessa forma, as concentrações dos produtos do metabolismo da BH4 em fluidos biológicos de indivíduos com obesidade podem estar alterados e refletir o grau inflamatório e oxidativo do TA.

Dentre os tratamentos para a obesidade disponíveis a gastroplastia tem se destacado como a intervenção cirúrgica utilizada para casos de obesidade grave em indivíduos com

- IMC > 50 kg/m²;
- IMC > 40 kg/m² com ou sem comorbidades que não tiveram sucesso no tratamento clínico realizado por no mínimo dois anos;
- IMC > a 35 kg/m², com comorbidades causadas ou agravadas pela obesidade, sem sucesso no tratamento clínico, realizado por no mínimo dois anos, proporcionando benefícios significativos na perda de peso, na melhoria de parâmetros metabólicos, e no aumento da expectativa de vida (NGUYEN; VARELA, 2017).

No entanto, a compreensão dos mecanismos subjacentes aos benefícios da gastroplastia ainda é um campo em expansão. Nesse sentido, a identificação de biomarcadores que acompanhem a progressão da obesidade, assim como os efeitos da gastroplastia, permitirá avaliar a resposta individual e melhor acompanhamento clínico dos indivíduos.

Baseado nas informações apresentadas é plausível que *i)* a obesidade promova alterações no metabolismo da BH₄, tanto pelo componente pró-inflamatório com pró-oxidativo presente na doença, *ii)* as concentrações de BH₄ e neopterina em fluidos biológicos poderiam ser utilizados como biomarcadores do grau inflamatório e oxidante no TA, e que *iii)* essas concentrações também possam auxiliar na identificação *a priori* dos indivíduos com obesidade que são elegíveis a cirurgia bariátrica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença inflamatória crônica definida pelo acúmulo excessivo de gordura e que compromete com a saúde do indivíduo (WHO, 2018). Avaliações antropométricas como o IMC e circunferência abdominal caracterizam a severidade da doença, que é subdividida em grau 1, 2, e 3, conforme descrito na Quadro 1 (ROSS et al., 2020). A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças não comunicáveis como como DM2, esteatose hepática, hipertensão, dislipidemias, artrite, depressão, câncer, entre outros (BLÜHER, 2019; STEFAN; BIRKENFELD; SCHULZE, 2021). Nas últimas décadas, a obesidade tem tomado proporções epidêmicas ao redor do mundo, e a estimativa é que em 2030, 17.5 % da população adulta mundial tenha obesidade (WOF, 2022). No Brasil, a prevalência da obesidade aumentou de 9.6 % para 22.8 % em homens e 14.5 % para 30.2 % em mulheres entre o período de 2002 a 2019 (IBGE; BRASIL, 2020). O ônus econômico gerado pela obesidade difere em cada país, porém, uma estimativa aponta que os custos financeiros com esta doença em 2060 seja de em média 3.4 % do produto interno bruto mundial (OKUNOGBE et al., 2021). Somente no Brasil em 2018, os custos no tratamento para obesidade subsidiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) chegaram ao valor de 1.42 bilhão ao ano, o que representou 40 % do orçamento total do ano de 2018 para o tratamento de doenças na rede do SUS (FIGUEIREDO et al., 2021).

Quadro 1. Classificações antropométricas utilizadas para a avaliação do estado corporal e severidade da obesidade

Classificação	IMC (kg/m ²)	Circunferência abdominal (cm)	
		Masculino	Feminino
Abaixo do peso	< 18,5	-	-
Peso normal	18,5 a 24,9	≥ 90	≥ 80
Sobrepeso	25,0 a 29,9	≥ 100	≥ 90
Obesidade grau 1	30,0 a 34,9	≥ 110	≥ 105
Obesidade grau 2	35,0 a 39,9	≥ 125	≥ 115
Obesidade grau 3	≥ 40		

Abreviações: IMC = índice de massa corporal

Fonte: (WHO, 2018)

A patogenia da obesidade é complexa, multifatorial e se desenvolve em um acúmulo excessivo de gordura levando a expansão do TA (BLÜHER, 2019). A principal causa que leva a este acúmulo se deve a quebra da homeostasia metabólica-energética, promovendo um baixo gasto energético pelo metabolismo do indivíduo e que pode estar vinculado a uma desregulação do apetite, aumentando a ingesta de alimentos, e que conseqüentemente, leva ao aumento de peso (THEILADE et al., 2021). Porém, a descoberta de genes específicos associados a predisposição a obesidade e de fatores epigenéticos que afetam seu desenvolvimento, adicionam mais complexidade a patogenia desta doença (LOOS; YEO, 2022). Além disso, fatores socioculturais relacionados a hábitos alimentares impactam o desenvolvimento da doença, principalmente pelo demasiado consumo de alimentos ultra processados, com altas quantidades de açúcares e pobre em micronutrientes (LÓPEZ-TABOADA; GONZÁLEZ-PARDO; CONEJO, 2020).

O peso corporal nos humanos é mantido em equilíbrio com a quantidade de calorias diárias ingeridas e a demanda energética do organismo (LIN; LI, 2021). Esse equilíbrio é mantido por sinais do sistema nervoso central (SNC) e órgãos periféricos, que regulam o gasto energético e a ingestão alimentar. Alguns desses sinais, órgão de produção, e efeito na manutenção do peso estão dispostos no Quadro 2 (GONZALEZ-CAMPOY, 2019; THEILADE et al., 2021). Quando o consumo calórico excede a demanda energética, parte dessa energia é armazenada na forma de triglicerídeos no TA. Em contrapartida, quando o consumo calórico é insuficiente para sustentar a demanda energética diária do organismo, a reserva energética do TA é mobilizada para fornecer nutrientes aos outros órgãos. Essa capacidade de armazenar e mobilizar energia é uma característica evolutiva, pois permite que tenhamos uma reserva energética em caso de escassez de nutrientes (PARRA-PERALBO; TALAMILLO; BARRIO, 2021). Entretanto, o excesso de energia consumida em relação a demanda energética, pode levar ao acúmulo excessivo de gordura no TA e conseqüentemente a obesidade (LIN; LI, 2021).

Quadro 2. Hormônios relacionados à regulação do peso e seus efeitos metabólicos.

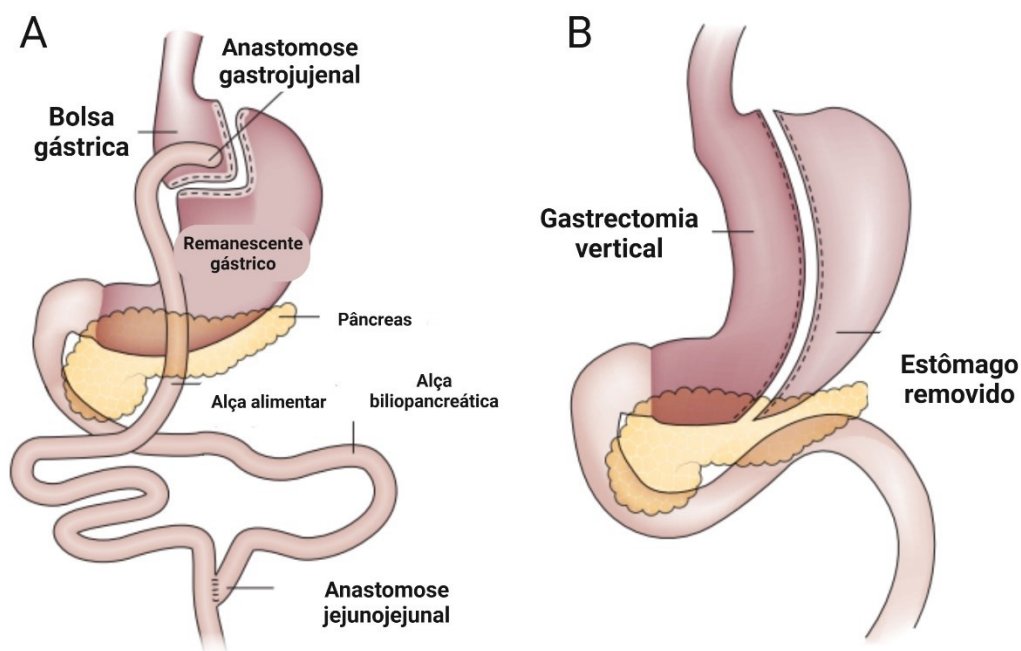
Hormônio	Órgão de produção	Efeito na manutenção do peso
Leptina	Tecido adiposo	Sinaliza as reservas de energia e inibe a ingestão alimentar
Adiponectina	Tecido adiposo	Sinaliza a função do tecido adiposo, tem efeitos anti-inflamatórios e insulino-sensibilizadores
Insulina	Pâncreas	Regula a captação e metabolismo da glicose, possui efeito anorexígeno no cérebro
Glucagon	Pâncreas	Estimula a liberação de glicose pelo fígado, possui efeito orexígeno no cérebro
Colecistocinina	Intestino delgado	Estimula a secreção biliar e pancreática, induz saciedade
Peptídeo semelhante ao glucagon 1	Intestino delgado	Estimula a secreção de insulina, inibe a secreção de glucagon e o esvaziamento gástrico, reduz o apetite
Grelina	Estômago	Estimula o aumento do apetite
Obestatina	Estômago	Antagoniza os efeitos da grelina, diminui o apetite
Adrenalina	Medula adrenal	Estimula a lipólise e o gasto energético
Cortisol	Córtex adrenal	Aumenta a gliconeogênese e a resistência à insulina, efeitos variáveis sobre o apetite
Tiroxina	Tireoide	Regula o metabolismo basal e o gasto energético
Estrogênios	Órgãos reprodutores	Regulam o metabolismo lipídico, a sensibilidade à insulina e têm efeitos anorexígenos no cérebro

Fonte: (GONZALEZ-CAMPOY, 2019; THEILADE et al., 2021).

Existem tratamentos farmacológicos e intervenções cirúrgicas para a obesidade que são prescritos quando outras medidas não farmacológicas, como dieta e exercício físico, não são suficientes para a redução de peso no indivíduo (CORNIER, 2022). Os tratamentos farmacológicos diferem pelo seu mecanismo de ação, podendo atuar aumentando a saciedade e reduzindo o apetite, modulando neurotransmissores como serotonina e adrenalina, ou reduzindo a absorção de gorduras pela alimentação por bloqueio de enzimas gastrointestinais (MÜLLER et al., 2022). Porém, em indivíduos onde o acúmulo excessivo de gordura compromete a saúde, intervenções cirúrgicas, como a gastroplastia, são empregadas para obter uma redução de peso mais expressiva (NUDEL; SANCHEZ, 2019).

Entre as intervenções cirúrgicas para obesidade, o *bypass* gástrico e a gastrectomia *sleeve* têm sido amplamente utilizados nos últimos anos, e são considerados opções seguras e eficazes para o tratamento da obesidade grave (GHIASSI; MORTON, 2020). A Figura 1 apresenta ilustrações destes procedimentos, onde ambos envolvem a modificação anatômica do sistema digestivo, com o objetivo de limitar a ingestão de alimentos e a absorção de nutrientes. O *bypass* gástrico é um procedimento em que o estômago é dividido em duas partes, criando um pequeno reservatório na parte superior do estômago que é ligado diretamente ao intestino delgado. Isso limita a quantidade de alimentos que podem ser ingeridos e reduz a absorção de nutrientes, resultando em perda de peso significativa. A gastrectomia *sleeve* envolve a remoção de uma grande porção do estômago, deixando apenas uma porção tubular. Isso também limita a quantidade de alimentos que podem ser ingeridos, mas não afeta a absorção de nutrientes (NGUYEN; VARELA, 2017).

Figura 1. Representações dos procedimentos cirúrgicos *bypass* e *sleeve*.



(A) Descrição ilustrativa do procedimento *bypass*, onde é realizada a anastomose (conexão cirúrgica entre dois órgãos) entre o jejuno e a parte superior do estômago que é reduzido. (B) Representação do procedimento da gastrectomia *sleeve* onde é feita uma excisão de uma parte do estômago, que é reduzido e assim restringindo o volume de alimento.

[Traduzido e adaptado de:(NGUYEN; VARELA, 2017)].

2.2 BIOMARCADORES

A descoberta de biomarcadores desempenha um papel fundamental no avanço da medicina personalizada e no diagnóstico precoce de doenças. Atualmente, os sistemas de classificação de doenças baseiam-se principalmente nos sinais e sintomas dos indivíduos, o que pode resultar em categorizações equivocadas de doenças com mecanismos fisiopatológicos distintos com características clínicas semelhantes, bem como de doenças diferentes que compartilham desordens moleculares similares.

Os avanços exponenciais na ciência com desenvolvimento de novas metodologias analíticas, modelos animais genéticos, e o maior entendimento da fisiopatologia de doenças promoveu um aumento de novos potenciais biomarcadores. Essa evolução levou a necessidade de importantes órgãos regulatórios, como o Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), a criação de um documento sobre as melhores práticas no desenvolvimento e estudo de novos potenciais biomarcadores (FDA-NIH., 2016).

Um biomarcador é definido como uma característica anatômica, sorológica ou fisiológica, que pode ser mensurada de maneira objetiva e serve como um indicador de um processo biológico normal, patológico ou de avaliação de intervenção terapêutica (FDA-NIH., 2016). A descoberta de um novo biomarcador envolve etapas desafiadoras que dependem de diferentes processos metodológicos, como técnicas de imagem, ensaios bioquímicos, tecnologia ômicas (como lipidômica, metabolômica, proteômica e genômica) além de avaliações físicas do indivíduo. Os biomarcadores podem ser utilizados para diferentes finalidades biomédicas, e os tipos de biomarcadores bem como suas definições estão dispostos no Quadro 3.

Quadro 3. Definições de diferentes biomarcadores existentes

Tipos de biomarcadores	Definição
Diagnósticos	Utilizados para identificar a presença ou ausência de uma determinada condição ou doença em um indivíduo. Eles auxiliam no diagnóstico precoce, possibilitando um tratamento mais eficaz e reduzindo o risco de complicações.
Farmacodinâmicos	Medem a atividade e os efeitos dos medicamentos no organismo. Eles são usados para entender a resposta individual a um tratamento específico, auxiliando na seleção e ajuste das doses dos medicamentos.
Preditivos	Ajudam a prever a resposta ou a progressão de uma doença em resposta a um tratamento específico. Eles permitem identificar pacientes que são mais propensos a responder positivamente a uma terapia, permitindo uma abordagem personalizada e direcionada ao tratamento.
Monitoramento	Utilizados para acompanhar a evolução da doença ao longo do tempo ou a resposta a um tratamento. Eles permitem avaliar a eficácia de uma terapia, identificar possíveis recaídas e ajustar a abordagem de tratamento conforme necessário.
Prognóstico	Fornecem informações sobre o curso provável de uma doença, incluindo a progressão da doença, a sobrevida e a resposta ao tratamento. Eles auxiliam na estratificação de risco e na tomada de decisões clínicas, permitindo um prognóstico mais preciso e uma abordagem mais personalizada para cada paciente.
Segurança	Usados para avaliar a segurança e tolerabilidade de um medicamento ou tratamento. Eles ajudam a identificar possíveis efeitos colaterais, riscos ou complicações associadas a um tratamento, contribuindo para uma terapia mais segura e minimizando danos potenciais.
Suscetibilidade ou Risco	Indicam a predisposição genética ou o risco aumentado de desenvolver uma determinada condição ou doença. Eles auxiliam na identificação de indivíduos com maior probabilidade de desenvolver certas doenças, permitindo intervenções preventivas precoces, modificações no estilo de vida ou acompanhamento clínico mais rigoroso.

Fonte: (CALIFF, 2018)

O processo de descoberta de um biomarcador para doenças geralmente se inicia com modelos experimentais animais que mimetizam a doença ou modelos pré-clínicos em humanos com tamanho amostral pequeno, avaliando marcadores bioquímicos, escores clínicos ou técnicas de imagens. Na etapa inicial, as amostras de fluidos biológicos, como sangue, urina, saliva, entre outros, de indivíduos afetados pela doença, são avaliadas para estabelecer parâmetros relevantes. Com base nos resultados preliminares que são gerados é possível progredir gradualmente para um maior número de amostras, incluindo comparações com indivíduos saudáveis que não apresentam a doença. Uma etapa fundamental é realização de uma caracterização fenotípica precisa da população em estudo, evitando vieses metodológicos, além do cuidado da manipulação adequada das amostras e utilização das técnicas metodológicas adequadas para sua determinação, principalmente quando o biomarcador em estudo apresenta características físico-químicas instáveis e com possível degradação (CALIFF, 2018).

É essencial também compreender a distinção entre casualidade e causalidade ao avaliar a relevância dos achados durante o desenvolvimento de novos biomarcadores. A casualidade é entendida como à associação estatística entre um biomarcador e uma determinada condição ou doença, sendo uma observação inicial da relação entre o biomarcador e o achado experimental. Por outro lado, a causalidade indica uma relação direta de causa e efeito entre um biomarcador e a condição em questão. Para provar a causalidade é necessário obter evidências robustas como estudos longitudinais com intervenções e a comprovação de mecanismos fisiológicos ou patológicos plausíveis para a doença (ALTMAN; KRZYWINSKI, 2015).

No desenvolvimento de biomarcadores três etapas são essenciais para assegurar sua aplicabilidade clínica. O processo de validação analítica é uma das primeiras etapas e necessária para avaliar características de reprodutibilidade e precisão, como os parâmetros de sensibilidade e especificidade, que são determinados por meio do teste estatístico da Curva Característica de Operação do Receptor (ROC) (KRAUS, 2018; MICHAEL; TIAN; GHEBREMICHAEL, 2019). A segunda etapa é a avaliação da utilidade clínica do biomarcador, na qual se investiga sua relevância como biomarcador específico. Nessa etapa, estudos clínicos buscam avaliar a associação entre os níveis do biomarcador e o curso da doença e se os

benefícios de sua avaliação superam os riscos ou desconfortos durante o cuidado com o indivíduo. Por fim, a validação clínica, que envolve estudos em larga escala com amostras representativas da população-alvo, visa avaliar a precisão do biomarcador em diferentes subgrupos clínicos que possam existir dentro da doença, como sexo, idade e etnia (KRAUS, 2018).


Dessa forma, sabe-se também que o estudo de novos biomarcadores desempenha um papel importante no desenvolvimento de novos alvos farmacológicos. O entendimento do comportamento das moléculas biológicas em relação à fisiopatologia das doenças pode fornecer informações que abram caminho para inovações terapêuticas, identificando alvos farmacológicos mais eficazes (KRAUS, 2018).

2.3 TECIDO ADIPOSEO

O TA é um órgão dinâmico e especializado na manutenção do metabolismo energético e regulação hormonal no organismo (KERSHAW; FLIER, 2004). Além disso, ele é reconhecido como o maior órgão endócrino do corpo humano secretando diversas moléculas conhecidas como adipocinas que exercem influência em processos fisiológicos (FASSHUER; BLÜHER, 2015). O TA é um órgão que se apresenta de forma heterogênea no organismo diferindo na sua localização anatômica, composição celular e perfil metabólico, podendo ser classificado em dois principais tipos: o TA branco (TAB) e o TA marrom (TAM). O TAB é o mais predominante no organismo e está principalmente envolvido no armazenamento de energia e com as secreções de hormônios. O TAB é subdividido em TAB subcutâneo (TAS), que está localizado sob a pele e representa cerca de 80 % da massa total de TA em indivíduos saudáveis, e TAB visceral (TAV), que está localizado na região intra-abdominal e envolve órgãos internos (IBRAHIM, 2010). O TAM por sua vez, é menos abundante e é especializado na termogênese. O TAM é encontrado em regiões interescapular, cervical e axilar (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Ainda, existe a presença do TA bege no organismo, que é derivado do TAB e apresenta maior atividade metabólica para consumo de energia.

O TAB é constituído por diferentes tipos celulares, sendo o principal o adipócito, que possui características morfológicas e metabólicas diferentes em cada tipo de tecido, como disposto na Figura 2. Além dos adipócitos, o TAB é composto por células mesenquimais e células imunes, sendo as mais abundantemente encontradas os macrófagos, mastócitos e linfócitos T e B, além de eosinófilos (LENZ et al., 2020). Essas células participam da homeostasia do tecido, regulando a inflamação, angiogênese, diferenciação de adipócitos de células mesenquimais e secreção de adipocinas (MICHAILEDIDOU; GOMEZ-SALAZAR; ALEXAKI, 2022; WANG; WU, 2018).

Figura 2. Principais diferenças dos adipócitos no tecido adiposo (TA) branco (TAB), marrom (TAM) e bege.



	TECIDO ADIPOSITO BRANCO	TECIDO ADIPOSITO MARROM	TECIDO ADIPOSITO BEGE
Localização	<ul style="list-style-type: none"> • Subcutâneo • Intra-abdominal • Epicardial • Gonadal 	<ul style="list-style-type: none"> • Interescapular • Paravertebral • Perirrenal • Cervical • Supraclavicular 	Aparecem a partir de estímulos no tecido adiposo branco
Morfologia	Esférica	Elíptica e menor que o adipócito branco	Esférica
Características Celulares	<ul style="list-style-type: none"> • Unilocular • Poucas Mitocôndrias • Núcleo periférico achatado • Pequeno retículo endoplasmático 	<ul style="list-style-type: none"> • Multilocular • Muitas mitocôndrias • Núcleo oval central 	<ul style="list-style-type: none"> • Unilocular com gotículas menores • Biogênese mitocondrial acontece após estimulação
Função	Reserva energética e endócrina	Gasto energético, produção de calor (Termogênese sem tremor)	Potencial Termogênico
Proteína desacopladora	Indetectável	Presente	Presente após estímulos

A Figura 2 compara as diferentes características de localização, morfologia, celulares, funcionais e presença da proteína desacopladora no TAB, TAM e TA bege, respectivamente. O TAB e TAM possuem características bem distintas, como a localização no organismo, tamanho, organização dos lipídeos, presença de mitocôndria e organização do núcleo, além de funções diferentes. A presença da proteína desacopladora, encontrada nas mitocôndrias dos adipócitos do TAM é o que promove o aumento de gasto energético. O TA bege apresenta características semelhantes a ambos tecidos mencionados anteriormente, por exemplo, sua organização de gotícula de gordura é em tamanho esférico, que é semelhante ao adipócito do TAB, enquanto

o aumento do número de mitocôndrias com presença de proteínas desacopladoras é semelhante aos adipócitos do TAM e proporciona o potencial termogênico.

Traduzido de:(EL HADI et al., 2019).

As principais funções de algumas adipocinas liberadas pelo tecido adiposo estão descritas no Quadro 4. A disfunção metabólica causada pela obesidade altera a produção de diversas adipocinas, que sustenta de forma crônica a doença e o desenvolvimento das comorbidades (LEHR; HARTWIG; SELL, 2012). Por exemplo, o aumento exacerbado do TA aumenta as concentrações sanguíneas da leptina, e apesar de possuir um efeito anorexígeno promovendo a redução do apetite em nível do SNC, tem sido demonstrado que a hiperleptinemia plasmática crônica provoca um estado de resistência à leptina no SNC, comprometendo sua função no controle do apetite e levando a hiperfagia (MYERS; COWLEY; MÜNZBERG, 2008). Mais recentemente, foi também demonstrado que a leptina regula a atividade do sistema imune promovendo a ativação de células T, macrófagos e neutrófilos, componente fisiopatológico chave para o desenvolvimento da inflamação crônica sistêmica (TAYLOR, 2021).

Quadro 4 - Principais adipocinas e seu efeito fisiológico relatados na literatura

Adipocinas	Efeito fisiológico
Adiponectina	Anti-inflamatório, aumenta a sensibilidade a insulina
Adipsina	Ativação do sistema do complemento
Chemerina	Regulação da adipogênese e quimiotaxia
Interleucina-10	Anti-inflamatório
Interleucina-1 β	Pró-inflamatório
Interleucina-4	Anti-inflamatório
Interleucina-6	Pleiotrópico
Leptina	Regulação do apetite, ativação de células imunológicas
MCP-1	Quimiotaxia
Omentina	Anti-inflamatório, aumenta a sensibilidade a insulina
PAI-1	Inibe a fibrinólise
Resistina	Pleiotrópico, aumenta a resistência a insulina
TNF- α	Pro-inflamatória

Abreviações: MCP-1= Proteína quimiotática de monócitos 1; PAI-1= Inibidor do ativador de plasminogênio 1; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

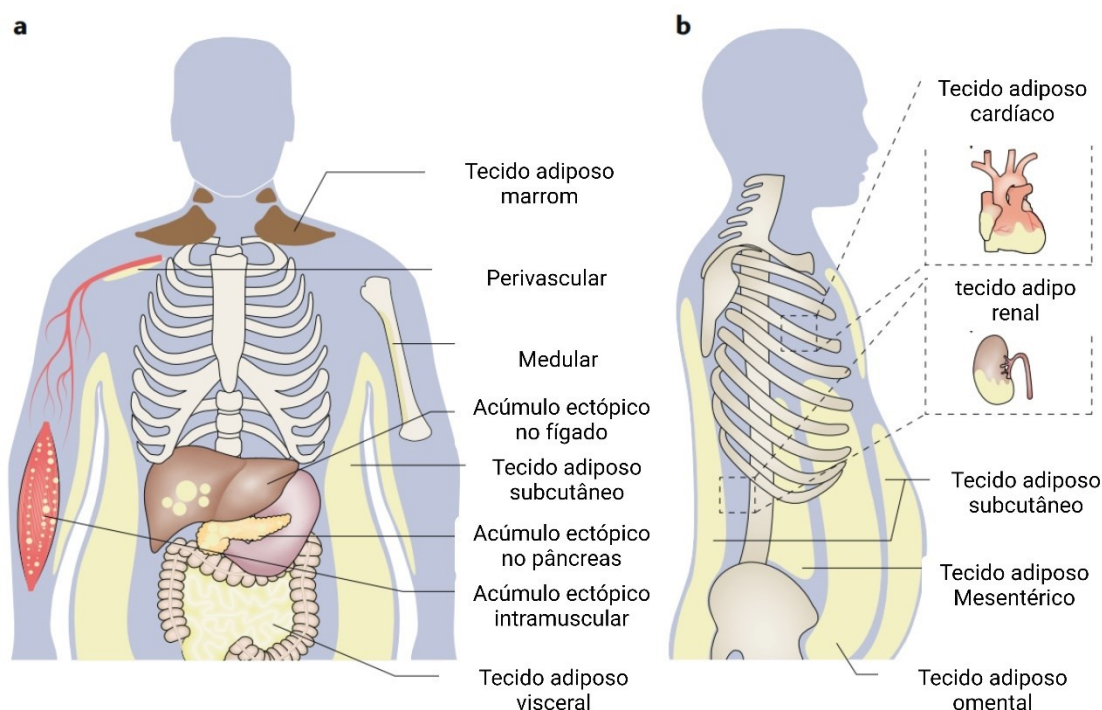
Fonte: (FASSHAEUER; BLÜHER, 2015; TAYLOR, 2021)

Outra importante adipocina impactada pela desregulação metabólica na obesidade é a adiponectina, que tem suas concentrações plasmáticas reduzidas, e por isso, seu papel na homeostasia metabólica com efeito anti-inflamatório e de sensibilização à insulina fica comprometido (GARIBALLA et al., 2019; WOODWARD; AKOUMIANAKIS; ANTONIADES, 2017). Dessa forma, pode ser evidenciado, que o aumento do tecido adiposo propicia um ambiente inflamatório persistente que é definido como metainflamação (HOTAMISLIGIL, 2006).

2.3.1 Tecido adiposo na obesidade

O crescimento do TAB na obesidade promove o extravasamento de ácidos graxos livres, causando lipotoxicidade em outros órgãos como fígado e coração (GRANÉR et al., 2013; ROSSI et al., 2011). O acúmulo de gordura no TAV está relacionado com um pior prognóstico dos desfechos da doença, com maiores riscos no desenvolvimento de doenças cardíacas e resistência à insulina (TANG; ZHANG; TONG, 2016). Recentemente, tem sido relatado que o tamanho do TAV em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV2 que provoca a doença COVID-19, foi correlacionado com a severidade da doença, o que indica a importância da funcionalidade desse tecido para a imunidade e saúde em geral. (CHANDARANA et al., 2021). A Figura 3 mostra a distribuição do TA em indivíduos com obesidade, bem como seu acúmulo ectópico em diferentes órgãos no organismo.

Figura 3. Distribuição do tecido adiposo branco (TAB) e marrom (TAM) no indivíduo com obesidade apresentando acúmulo ectópico de gordura em diferentes órgãos.



A Figura 3 (a) faz uma representação frontal de um indivíduo com obesidade, apresentando as diferentes localizações do tecido adiposo (TA), além do acúmulo ectópico que ocorre quando as reservas de armazenamento chegam ao seu limite. Em (b) apresenta uma representação lateral apresentando algumas categorias do tecido adiposo visceral (TAV) (mesentérico e omental), além da localização do TA que envolve órgão como rins e coração, que também podem sofrer um acúmulo durante o aumento excessivo de armazenamento de gordura.

Traduzido de:(QUAIL; DANNENBERG, 2019).

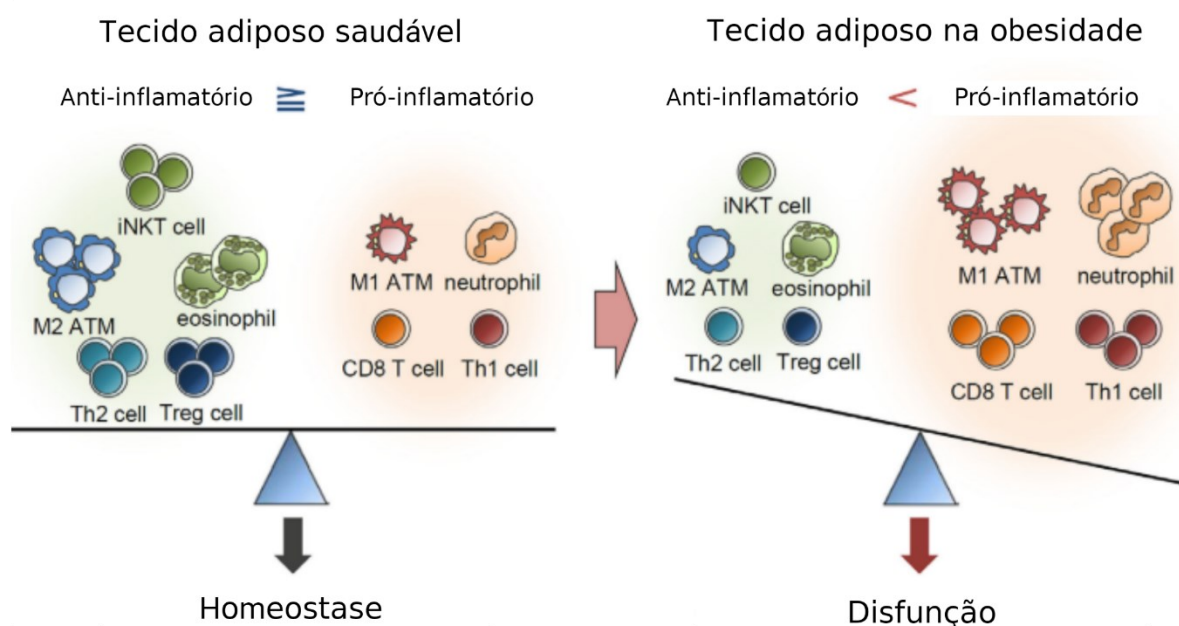
A expansão do TA pode ocorrer pelo aumento do tamanho dos adipócitos, chamado de crescimento hipertrófico, ou pelo recrutamento de células pré-adipocíticas para a diferenciação e formação de novo adipócito, processo chamado de hiperplasia (GHABEN; SCHERER, 2019). Na obesidade, o crescimento hiperplásico e hipertrófico pode ocorrer simultaneamente, porém indivíduos obesos em que os adipócitos se encontram na maioria no estado hipertrófico, apresentam um aumento da inflamação, promovendo a resistência à insulina (VERBOVEN et al., 2018).

2.4 A ATIVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE NA OBESIDADE

A população das células imunes no TA em homeostasia é composta por macrófagos, que em sua maioria apresentam um fenótipo anti-inflamatório, denominado M2, linfócitos, principalmente os T reguladores, T CD4+ Th2, *natural killer*, eosinófilos entre outras (MCLAUGHLIN et al., 2017) . Os adipócitos regulam o fenótipo anti-inflamatório dessas células pela liberação de IL-4 e IL-13, e de maneira sinérgica, as células imunes fazem a remodelação do TA saudável e homeostasia do local, como reparo tecidual e regulação do metabolismo mediante a produção de IL-10 (ITOH et al., 2011). Um exemplo do papel protetor das células imunes é na expansão saudável do TA, onde o aumento do tamanho do adipócito estimula a lipólise, liberando ácidos graxos livres que podem ser captados pelos macrófagos residentes, promovendo um papel de tamponamento lipídico e modulando o estresse fisiológico causado pela produção de níveis basais de ERO durante a expansão do TA (CASTOLDI et al., 2016). Portanto, as células imunes presentes no tecido mantêm um nível de inflamação basal que é uma resposta natural às alterações no metabolismo e renovação do tecido.

Na fisiopatologia da obesidade, é observado uma mudança da população de células imunes infiltradas no TA, com aumento daquelas com fenótipo pró-inflamatório, como macrófagos M1, linfócitos Th1, e redução do número das células imunes anti-inflamatórias citadas anteriormente, como ilustrado na Figura 4 (MCLAUGHLIN et al., 2017).

Figura 4. Perfil de células inflamatórias no tecido adiposo saudável e na obesidade.



A Figura 4 compara a distribuição das células imunes no tecido adiposo saudável e na obesidade. Quando em homeostase, o tecido adiposo apresenta um equilíbrio entre a quantidade de células com perfil anti-inflamatório, como os macrófagos com fenótipo M2 (M2 ATM), eosinófilos, células T regulatórias (Treg), natural killer (iNK) e de resposta Th2 (Th2). Já o tecido adiposo em disfunção, existe uma maior presença de células com fenótipo pró-inflamatório, como os macrófagos com fenótipo M1 (M1 ATM), neutrófilos, e células T CD8 e de resposta Th1 (Th1). Esse desequilíbrio sustenta o estado disfuncional do tecido de armazenamento de lipídeos e regulação hormonal no organismo.

Traduzido e adaptado de: (CHOE et al., 2016)

Diferentes formas para a ativação do sistema imune na doença da obesidade como componente fisiopatológico já foram descritas, uma delas é pelo crescimento hipertrófico exagerado no tecido adiposo, que promove o estresse mecânico tecidual, hipóxia e morte celular dos adipócitos, sinalizando para a geração de ERO, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , além de quimiocinas como a proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1), que estimulam a migração de células inflamatórias para o TA (REILLY; SALTIEL, 2017). A presença da morte celular dos adipócitos de indivíduos obesos foi evidenciada em cortes histológicos do TA, com a presença de uma maior concentração de macrófagos M1 que se localizam ao redor dos adipócitos em necrose, formando estruturas tipo coroa (BIGORNIA et al., 2012).

Os adipócitos em estado hipertrófico também conseguem promover a apresentação de antígenos via aumento da expressão com Complexo Principal de

Histocompatibilidade 2, que sinaliza a ativação dos linfócitos Th1, estimulando extensa produção de IFN- γ , citocina que promove a regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α e IL-1 β , sinalizando as células imunes residentes para a produção de ERO e NO, via enzima óxido nítrico sintase induzível, além de regular positivamente genes, como *Gch1*, que codifica para a síntese do cofator Tetrahydrobiopterina, essencial na ativação da inflamação (DENG et al., 2013; WERNER et al., 1990; XIAO et al., 2016).

O aumento da lipólise evidenciado na massiva hipertrofia do TA estimula a liberação de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, que de maneira crônica, pode levar a um acúmulo ectópico de lipídeos em órgãos como fígado, pâncreas e região perivasculares, causando lipotoxicidade, promovendo inflamação (QUAIL; DANNENBERG, 2019). Além disso, os ácidos graxos livres podem interagir com Receptores *Toll Like* de células imunes, responsáveis pela sinalização de patógenos e estresse celular, estimulando a ativação do sistema imune a nível sistêmico de forma crônica (ROGERO; CALDER, 2018). Outro ponto interessante na ativação do sistema imunológico na obesidade foi a evidência da presença dos receptores para leptina nas células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. A hiperleptinemia em resposta a expansão do tecido adiposo promove a ativação desses receptores que sinalizam a migração e proliferação das células imunológicas, estimulando a produção de citocinas inflamatórias (TAYLOR, 2021). Dessa forma, o crescimento hipertrófico e disfuncional do TA promove uma inflamação crônica de baixo grau que é a característica chave para o desenvolvimento das comorbidades como DM2 e comprometimentos cardiovasculares encontrados nos indivíduos com obesidade (MCLAUGHLIN et al., 2017).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO NA OBESIDADE

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de ERO e ERN entre a capacidade antioxidante do organismo, sendo as principais ERO o radical hidroxila, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio e as principais ERN, o NO, e o peroxinitrito. Essas espécies são produzidas como subprodutos do metabolismo celular normal e podem desempenhar papéis importantes na sinalização celular e na

defesa contra patógenos. No entanto, quando produzidas em excesso, elas podem causar danos celulares e contribuir para o desenvolvimento de doenças (VALKO et al., 2007).

O organismo possui um sistema complexo de defesa antioxidante para neutralizar as ERO e minimizar os danos oxidativos. As principais enzimas antioxidantes incluem a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Essas enzimas convertem as ERO em espécies menos reativas ou as eliminam diretamente, protegendo as células contra o estresse oxidativo (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; DE CASTRO, 1999).

A obesidade promove um estresse oxidativo no tecido adiposo e sistêmico por meio de vários mecanismos, por exemplo, o excesso de nutrientes pode levar ao acúmulo e extravasamento de lipídios em outros tecidos, o que pode aumentar a produção de ERO e afetando a capacidade antioxidante de outras partes do organismo (MARSEGLIA et al., 2014).

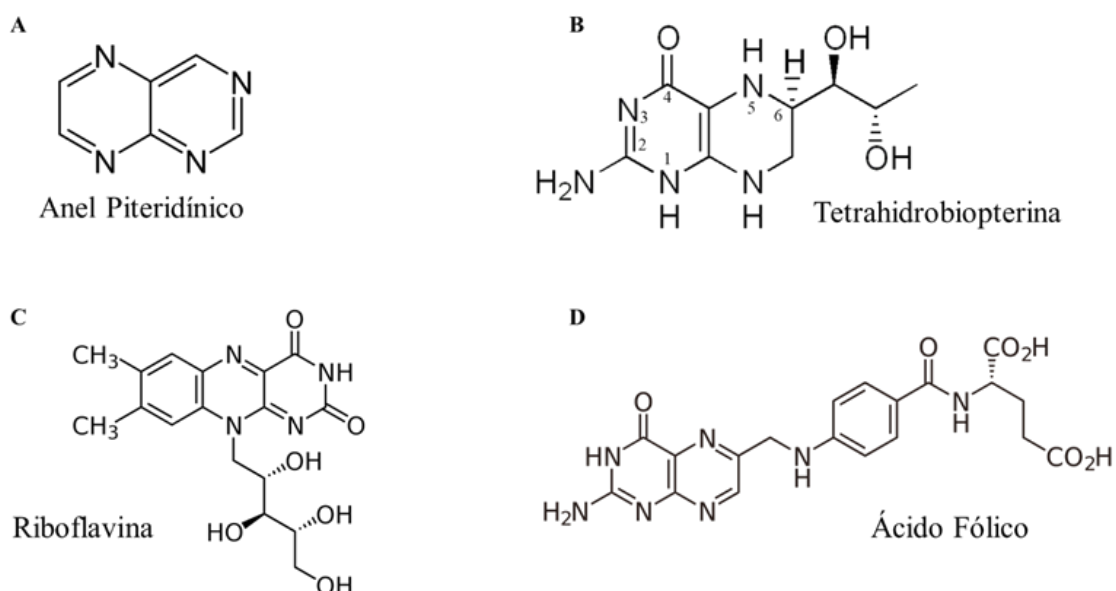
O aumento do estresse oxidativo na obesidade tem sido correlacionado com o desenvolvimento de suas comorbidades, como doenças cardiovasculares e resistência à insulina. Quando um estado hiperglicêmico é instaurado, ocorre dentro do adipócito um desvio das moléculas de glicose para a via da pentose fosfato, com o intuito de produzir NADPH para sustentar a produção de peróxido de hidrogênio pelas NADPH oxidases, que dessensibiliza o receptor da insulina para a redução da captação de glicose (DEN HARTIGH et al., 2017). Esse fino mecanismo indica o papel crucial do estresse oxidativo no desenvolvimento das comorbidades associadas a obesidade. No caso das doenças cardiovasculares, o estresse oxidativo pode comprometer o relaxamento dos vasos sanguíneos por reduzir a síntese de NO pela óxido nítrico sintase III (NOS-III), o que promove o aumento da pressão arterial e pode levar a hipertrofia cardíaca (POWELL-WILEY et al., 2021). A BH4 é uma molécula importante na regulação da função endotelial e tem sido mostrada como afetada pelo estado de estresse oxidativo em doenças cardiovasculares (BENDALL et al., 2014). Portanto, é possível que o estresse oxidativo crônico na obesidade possa impactar o metabolismo da BH4 reduzindo sua biodisponibilidade e conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares

2.6 METABOLISMO DA BH4

A BH4 é um cofator enzimático produzido em todos os tecidos do corpo humano e obrigatório para a produção dos neurotransmissores serotonina e dopamina e de NO, para o metabolismo de fenilalanina e de éteres lipídicos (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). Quimicamente a BH4 é um composto heterocíclico e pertence ao grupo das pterinas por apresentar um anel pteridínico, constituído um anel pirazidíco fundido com um anel de pirimidina, contendo substituições nos carbonos C2, C4 e C6 por um nitrogênio, um oxigênio e um dihidroxipropil, respectivamente (WEI; CRANE; STUEHR, 2003). A composição química é muito similar a vitaminas como o ácido fólico e riovflavina (Figura 5); no entanto as vitaminas são componentes essenciais à dieta, enquanto que a pterina BH4 é sintetizada no organismo.

A estrutura química da BH4 determina diferentes estados de oxidação, existindo na forma totalmente reduzida (BH4), parcialmente oxidada ou reduzida (BH2) e totalmente oxidada (biopterina; B).

Figura 5. Cofatores produzidos de forma endógena que compartilham o anel pteridínico.

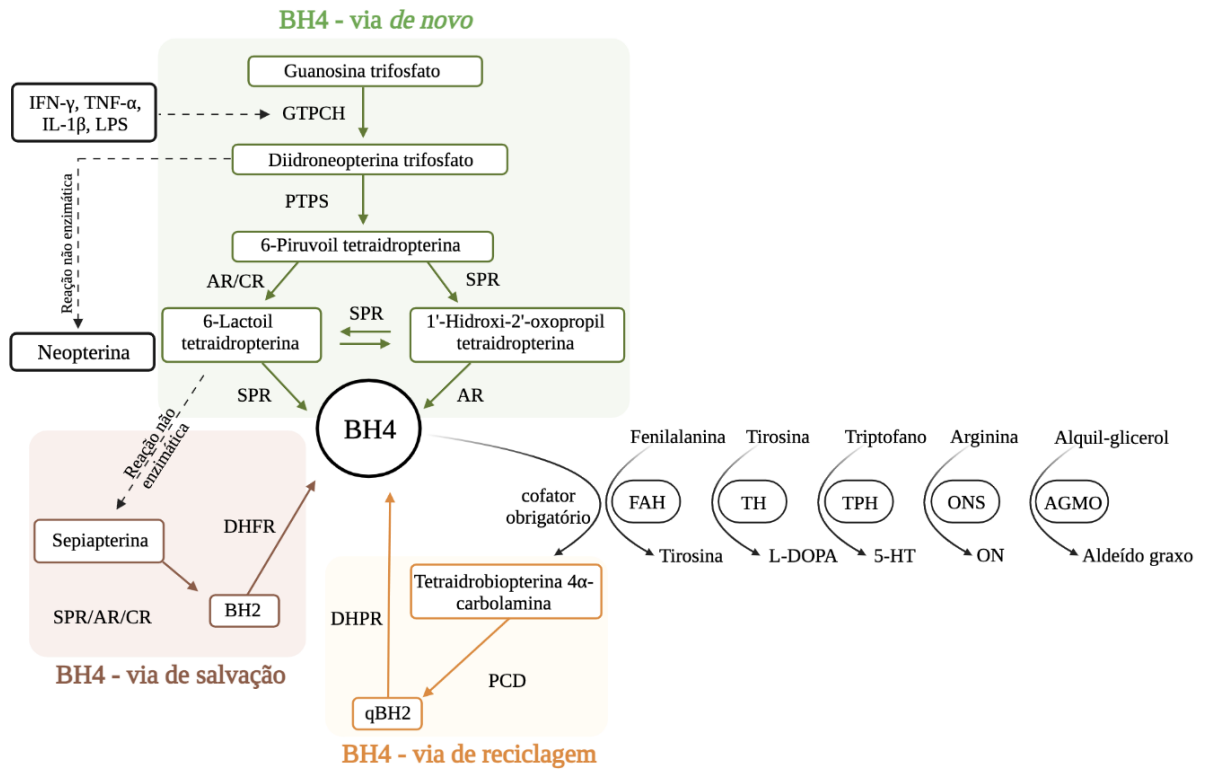


A Figura 5 apresenta em (A) a estrutura química central para a tetraidrobiopterina (B) e para as vitaminas riboflavina (C) e ácido fólico (D), importantes no metabolismo energético e síntese de nucleotídeos, respectivamente

Fonte: (LUCOCK; YATES, 2005; MOSEGAARD et al., 2020).

As concentrações intracelulares da BH4 são finamente reguladas por um metabolismo complexo que envolve uma via de reciclagem, uma de salvação e uma de síntese *de novo*, que está ilustrado na figura 6 (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). A síntese *de novo* da BH4 ocorre em três etapas e inicia pela ação da enzima limitante da via, a GTPCH, que converte uma molécula de guanosina trifosfato em 7,8-dihidroneopterina trifosfato, o qual é posteriormente transformada em 6-pirovoil-tetrahidrobiopterina pela 6-pirovoil-tetrahidropterina sintase (PTPS), para finalmente gerar BH4 pela ação da sepiapterina redutase (SPR) (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). A via de salvação utiliza intermediários da via *de novo* e por meio de enzimas inespecíficas e reações espontâneas gera o metabólito sepiapterina que posteriormente é reduzida em BH2 e depois a BH4. As enzimas envolvidas nestes processos ainda não estão completamente elucidadas, mas tem se proposto que aldose e carbonil redutases, a SPR e a dihidrofolato redutase estariam envolvidas, sendo esta última já evidenciada para a redução de BH2 para BH4. Uma vez que a BH4 é utilizada como cofator enzimático e oxidada em BH2 (forma quininoide: qBH2) é reduzida de volta em BH4 pela via da reciclagem, com a ação da enzima dihidropterina redutase (HIRAKAWA et al., 2009; WERNER; BLAU; THÖNY, 2011)

Figura 6. Vias metabólicas envolvidas na biossíntese da tetraidrobiopterina (BH4) e as enzimas que a utilizam como cofator.



Via de novo: A guanosina trifosfato cicloidrolase (GTPCH), a 6-piruvil tetraidropterina sintase (PTPS) e a sepiapterina redutase (SPR) transformam a guanosina trifosfato em BH4. O último passo enzimático, catalisado pela SPR, pode ser auxiliado pelas redutases inespecíficas aldose redutase (AR) e carbonil redutase (CR). Isso é possível devido a uma interação ativa entre as vias *de novo* e de salvção, onde a AR, CR e/ou SPR utilizam intermediários da via *de novo* para gerar o intermediário chave da via de salvção, a sepiapterina. **Via de salvção:** a sepiapterina é transformada em dihidrobiopterina (BH2) e, em seguida, reduzida a BH4 pela dihidrofolato redutase (DHFR). **Via de reciclagem:** a pterina-4-alfa-carbinolamina desidratase (PCD) transforma o BH2 em dihidrobiopterina quinóide (qBH2), que é reduzido de volta a BH4 pela dihidropteridina redutase (DHPR). BH4 é um cofator obrigatório para a atividade das hidroxilases de aminoácidos aromáticos, fenilalanina hidroxilase (FAH), tirosina hidroxilase (TH) e triptofano hidroxilase (TPH), para todas as isoformas da óxido nítrico síntase (NOS) e para a mono-oxigenase de alquilglicerol (AGMO). Abreviações: IL-1β: interleucina-1 beta; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; INF-γ: interferon-gama; IL-6: interleucina-6; LPS: lipopolissacarídeo.

Fonte: (EICHWALD et al., 2023)

2.6.1 BH4 no contexto inflamatório e oxidante.

A via *de novo* é uma via que pode ser induzida por inflamação (Figura 6). As citocinas inflamatórias como INF-γ, TNF-α e IL-1β atuam nos receptores de células do sistema mononuclear fagocitário, como monócitos, macrófagos e células dendríticas e linfócitos T promovendo um aumento da expressão de *Gch1*, gene que regula a síntese da GTPCH, enzima limitante da via *de novo* (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011).

O aumento de BH4 é essencial para as células imunes produzirem NO, para eliminar patógenos ou *debris* de tecidos (ILES; FORMAN, 2002). A regulação positiva do *Gch1* em células imunes pode aumentar até 100 vezes, enquanto que as outras enzimas envolvidas na via *de novo*, são constitutivas (WERNER et al., 1990). Este fato provoca um acúmulo de intermediários metabólicos que ativam uma via alternativa do metabolismo da BH4 com geração de neopterinina (Figura 6). Assim, em condições inflamatórias as células imunes produzem altas quantidades de neopterinina, principalmente monócitos e macrófagos que são as células humanas com menor quantidade de PTPS (WERNER et al., 1990).

Recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que a administração de BH4 em linfócitos T CD4/CD8 aumenta a atividade mitocondrial dessas células, estimulando sua proliferação e capacidade de infiltrar em tecidos (CRONIN et al., 2018). Dessa forma, a regulação positiva na inflamação sob a via *de novo* da BH4 é um componente essencial tanto para os processos fagocíticos quanto para agressividade das células imunes ao tecido.

Levando em consideração que a obesidade tem como componente fisiopatológico a ativação de vias inflamatórias de forma crônica que levam a migração de células imunes ao tecido adiposo, é possível que a o metabolismo da BH4 possa estar regulado positivamente devido ao exacerbado infiltrado imune característico na obesidade.

A BH4 também tem sido descrita como molécula antioxidante, com capacidade de neutralização de ERO e ERN (PATEL et al., 2002). Dessa forma, em condições onde existe um aumento da produção dessas espécies, a BH4 pode ficar susceptível a oxidação e comprometendo sua atividade como cofator.

Na fisiologia cardiovascular, por exemplo, a facilidade de oxidação da BH4 pode comprometer a regulação do relaxamento vascular, que é regulado pela produção de NO gerado pela NOSe (GEWALTIG, 2002; SCHULZ et al., 2008). A BH4 tem um papel crucial na estabilização da enzima NOSe para a síntese de NO. Esta enzima é formada por dímeros com um centro de ferro catalítico onde ocorre a transformação de arginina em citrulina e consequente produção de NO. A organização estequiométrica entre os dímeros é essencial para que a reação ocorra, e foi observado que a presença do produto oxidado da BH4, a BH2, promove o desacople

na transferência de elétrons que ocorre na enzima, gerando a produção de ânion superóxido e peróxinitrito, o que poderia sustentar o desequilíbrio redox intracelular (LANDMESSER et al., 2003; MILSTIEN; KATUSIC, 1999; VÁSQUEZ-VIVAR et al., 2002). Diversos trabalhos já identificaram a utilização de antioxidantes para promover a restauração dos níveis de BH4 e recuperação (BAKER; MILSTIEN; KATUSIC, 2001; HUANG et al., 2000).

Dessa forma, sabendo que a BH4 poderia facilmente ser oxidada em ambientes pró-oxidantes, como encontrado na obesidade, é possível que suas concentrações estejam comprometidas em tecidos com elevado nível de estresse oxidativo, comprometendo não somente a síntese de NO, mas também a síntese de neurotransmissores e o metabolismo da fenilalanina no fígado.

3 HIPÓTESE

Considerando que o metabolismo da BH4 pode ser regulado positivamente em ambientes inflamatórios crônicos, e que a molécula apresenta propriedades antioxidantes, é possível levantar a hipótese de que a obesidade curse com níveis reduzidos de BH4 e aumentados de neopterina em fluidos biológicos, e que esses marcadores permitam estimar o grau inflamatório e de estresse oxidativo no TA.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Mensurar metabólitos da rota biossintética da BH4 em fluidos biológicos de indivíduos elegíveis a cirurgia bariátrica antes do momento da cirurgia e após 12 meses da intervenção cirúrgica

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a coorte afetada por obesidade desde os pontos de vista demográficos, clínicos, e bioquímico-clínicos que foram elegíveis para gastroplastia.

- Quantificar o metabolismo da BH4 mediante a determinação das concentrações de BH4 na urina e neopterinina no plasma, e pela mensuração do conteúdo da enzima sepiapterina redutase que participa na biossíntese de BH4, no TA de indivíduos afetados por obesidade e submetidos a gastroplastia.

- Quantificar os níveis de indicadores de estresse oxidativo, como glutatona e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, no plasma, e TA de indivíduos afetados por obesidade e submetidos a gastroplastia.

- Determinar a capacidade dos valores das concentrações de BH4 e neopterinina em fluidos biológicos de rastrear indivíduos com obesidade, e de estimar o grau inflamatório e de estresse oxidativo no TA.

- Identificar o efeito da gastroplastia 12 meses após a intervenção sobre os parâmetros bioquímicos analisados.

5 METODOLOGIA

5.1 INCLUSÃO DOS PACIENTES COM OBESIDADE PARA O ESTUDO

Foram incluídos no estudo pacientes elegíveis a cirurgia bariátrica, os quais seguiram os critérios estabelecidos pela Declaração de Consenso dos Institutos Nacionais e de Saúde pelo Ministério da Saúde do Brasil:

- Indivíduos com IMC maior ou igual a 50 kg/m²;
- Indivíduos com IMC maior ou igual a 40 kg/m², com ou sem comorbidades e que não obtiveram sucesso no tratamento clínico realizado por, no mínimo, dois anos;
- Indivíduos com IMC maior ou igual a 35 kg/m² com comorbidades causadas ou agravadas pela obesidade, sem sucesso no tratamento clínico realizado por, no mínimo, dois anos.

A não aceitação em participar do estudo, falta de dados em prontuários ou falta de acompanhamento ambulatorial adequado no período de 12 meses de pós operatório foram considerados critérios de exclusão. Também, a incidência de gravidez, câncer, diagnóstico de lipodistrofia ou hipotireoidismo também foram critérios de exclusão. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, os aspectos éticos e normas de pesquisa em seres humanos foram respeitados conforme resolução 466/12 do conselho nacional de saúde, respeitando os princípios da beneficência e não-maleficência, justiça e autonomia, onde a decisão de participar do estudo ocorreu por meio da leitura e assinatura do Termo de Consentimento e Livre Esclarecido. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a manter o sigilo e confidencialidade dos dados dos participantes e utiliza-los unicamente para as finalidades de pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética com Seres Humanos (ARPOVADO: CAAE 19792013.5.0000.0121)

A Figura 7 apresenta o delineamento experimental deste trabalho e as coletas de amostras biológicas. A Figura 8 apresenta um fluxograma com a descrição da inclusão e exclusão de participantes. O Quadro 5 e Quadro 6 apresenta características demográficas e antropométricas dos participantes no momento pré cirúrgico e pós 12 meses da intervenção, respectivamente.

Figura 7. Delineamento experimental

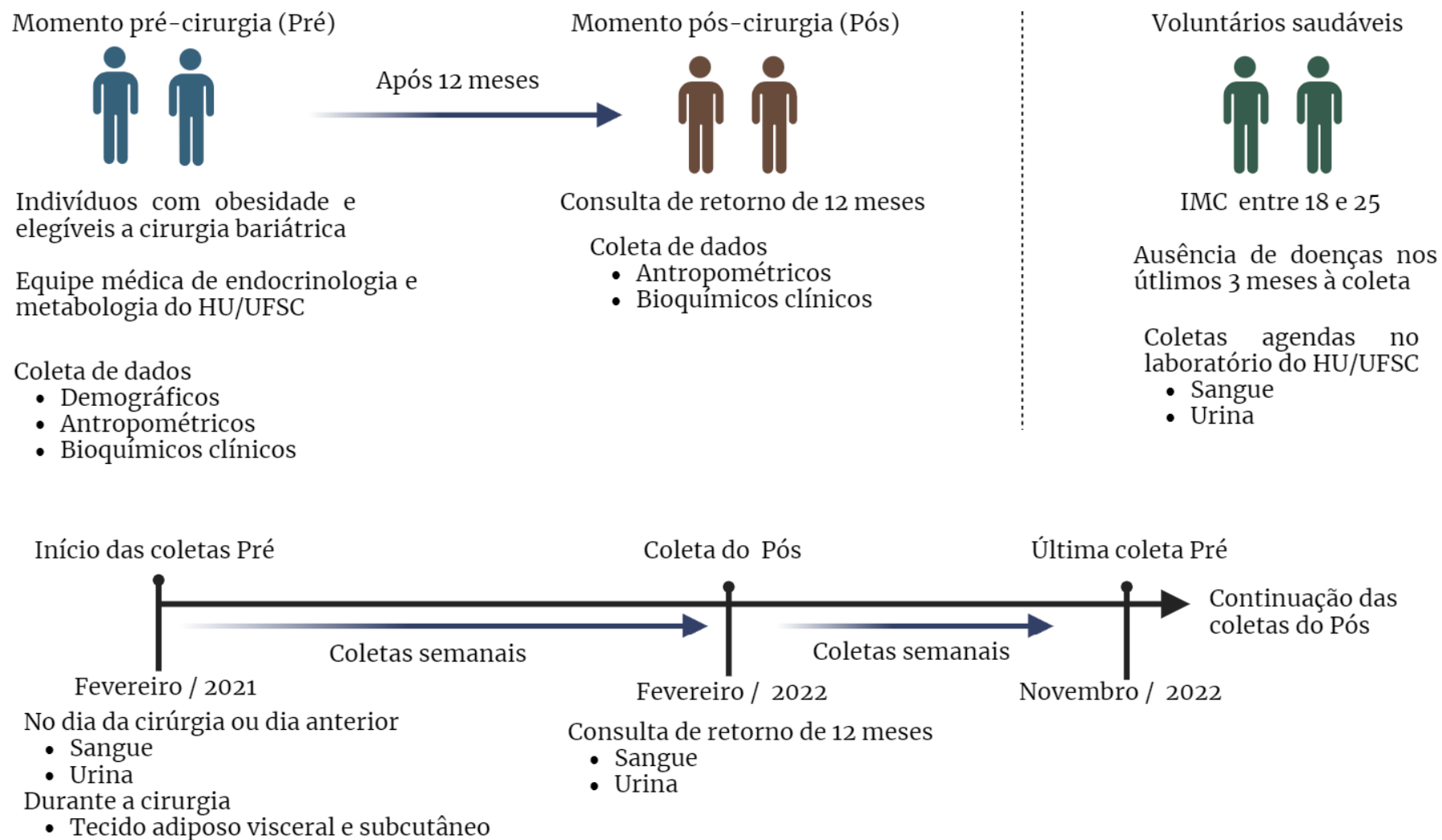
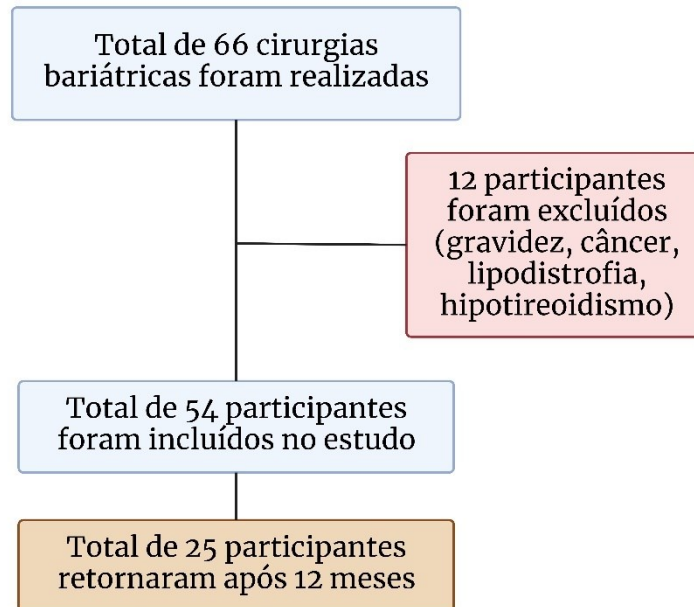


Figura 8. Fluxograma de inclusão e exclusão dos participantes



Quadro 5. Características demográficas e antropométricas dos participantes no momento Pré

Características dos participantes	Valor (média ± desvio padrão)
Total de participantes	54
Idade (anos)	46,2 ± 10
Sexo	
Feminino (%)	44 (78,7)
Masculino (%)	10 (21,3)
Tipo de cirurgia bariátrica	
Bypass (%)	44 (78,7)
Sleeve (%)	10 (21,3)
Categoria de IMC	
Obesidade grau 2 (%)	3 (6,4)
Obesidade grau 3 (%)	51 (93,6)

Quadro 6. Características demográficas e antropométricas dos participantes no momento Pós

Características dos participantes (Pós)	Valor (média ± desvio padrão)
<i>Total de participantes</i>	25
<i>Idade (anos)</i>	47 ± 8
Sexo	
<i>Feminino (%)</i>	19 (76)
<i>Masculino (%)</i>	6 (24)
Tipo de cirurgia bariátrica	
<i>Bypass (%)</i>	20 (80)
<i>Sleeve (%)</i>	5 (20)
Categoria de IMC	
<i>Sobrepeso (%)</i>	11 (44)
<i>Obesidade grau 1 (%)</i>	9 (36)
<i>Obesidade grau 2 (%)</i>	3 (12)
<i>Obesidade grau 3 (%)</i>	2 (8)

5.2 SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE

Voluntários saudáveis com idade similar ao do grupo do momento Pré deste estudo foram convidados a participar da pesquisa. Os resultados obtidos nos ensaios realizados nas amostras biológicas dos indivíduos controles foram pareados por sexo e idade (diferença máxima de 3 anos) com o grupo do momento Pré. Para serem elegíveis os voluntários também necessitavam não ter tomado nenhuma medicação para inflamação ou dor ou relatado qualquer sintoma de dor no momento ou três meses antes do recrutamento.

O grupo controle foi questionado sobre o hábito do tabagismo. Sua altura e peso foram aferidos para o cálculo do IMC seguindo a fórmula $\text{peso em kg} \div (\text{altura em m} \times \text{altura em m})$, e posterior classificação conforme orientação da Organização mundial da saúde (WHO, 2018). Foram coletados amostras de sangue periférico e de urina para as dosagens bioquímicas.

5.3 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue e urina dos pacientes foram coletadas por enfermeira ou técnicos do HU no dia anterior ou no mesmo dia da realização da cirurgia bariátrica (momento Pré). Na consulta médica após 12 meses da cirurgia bariátrica, foi realizada outra coleta também por técnicos do HU (momento pós). Após a coleta, o material foi transportado imediatamente para o Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (LABOX) para o processamento das amostras, ambas sob a proteção de luz e a amostra de urina em contato com gelo.

O TAV e TAS foram coletados durante a cirurgia bariátrica pelo cirurgião responsável do procedimento cirúrgico, sendo armazenado em tubo Falcon de 15 mL e congeladas em nitrogênio líquido imediatamente. A região anatômica do TAV coletada foi o Epiplon, enquanto a região anatômica do TAS coletada foi a subcutâneo abdominal.

É importante ressaltar que a BH4 é muito sensível a luz e pH, o que representa um desafio para que grupos de pesquisa realizem a determinação de suas concentrações em amostras biológicas, e por conta disso, todo o procedimento, desde a coleta até o processamento, ocorreu em um tempo delimitado de 20 minutos para evitar a oxidação da BH4.

5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.4.1 Amostras de Sangue

Amostras de sangue venosa foram coletadas pela punção da veia cubital mediana utilizando tubos *Vacutainer*® (Seattle, Estados Unidos) contendo o anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (solução 15 %). Os tubos contendo o sangue total foram transportados até o LABOX e homogeneizados por inversão por alguns segundos e a seguir foram centrifugados a temperatura ambiente a 500 x *g* durante 10 min. O plasma foi rapidamente separado em tubos eppendorfs em alíquotas de 0,2 a 1 mL, e mantidos em gelo até o congelamento em nitrogênio líquido após processamento completo das amostras.

5.4.2 Amostras de urina

As amostras de urinas foram coletadas em pote plástico estéril, mantidas em gelo e protegidas da luz durante o transporte até o LABOX. Previamente a alíquota das amostras, os tubos de urina foram homogeneizados por inversão e coletado alíquotas para análises posteriores. Algumas alíquotas foram tratadas com 0,5 mL de HCL 0.1 M para conservação da BH4, sendo então homogeneizadas e centrifugadas a 4 °C a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado, armazenado em eppendorfs e congelado com nitrogênio líquido imediatamente. As amostras foram condicionadas em freezer a – 80 °C até análise.

5.4.3 Amostras de tecido adiposo

Foram coletadas 4 amostras de TAV e 4 amostras de TAS, acondicionadas em tubos falcon e congeladas imediatamente no centro cirúrgico com nitrogênio líquido, sendo mantidas a – 80 °C até as análises.

No dia das análises dos tecidos, uma amostra de cada paciente foi selecionada e, com o tecido ainda congelado, foi realizado um corte com auxílio de bisturi e pesagem de aproximadamente 300 mg de tecido. As amostras foram coletadas em eppendorfs de 2 mL e maceradas com auxílio de pistilo adicionando 4 volumes de tampão RIPA sob o peso de TA coletado para as análises de estresse oxidativo e 3 volumes para análise por *western blot*. O tampão RIPA possui a seguinte composição: Cloreto de sódio 140 mM, TRIS-HCL pH 8 10 mM, Deoxícolato de sódio 0.1 %, EDTA 1 mM, Triton 1 % e SDS 0,1 % em água Milliq®. Para o tampão RIPA utilizado para o preparo de amostras para *western blot*, foi adicionado os seguintes inibidores de proteases e fosfatases: Ortovanadato de sódio, Fluoreto de fenilmetanosulfonil e coquetel inibidor de proteases. As amostras receberam 30 segundos de vórtex durante a homogeneização, onde foram então centrifugadas a 4 °C a 15,000 x g por 30 min.

Na Figura 9, pode-se observar a formação de uma porção sólida lipídica após a centrifugação, e alíquotas da parte inferior a esta porção foram coletadas e armazenadas em - 80 °C até a análise.

Figura 9. Homogenato de tecido adiposo após homogeneização e centrifugação



5.5 EXAMES LABORATORIAIS

Exames de bioquímica clínica foram realizados no laboratório central de análises clínicas do HU/UFSC. Estas mensurações incluíram todos os exames presentes no Quadro 8. Todos os marcadores biológicos foram analisados em aparelhos automatizados e os resultados liberados por farmacêutico ou biomédico responsável.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DE BH4 E NEOPTERINA EM AMOSTRAS DE PLASMA E URINA

5.6.1 Quantificação da BH4 na urina por HPLC

Alíquotas de urina tratadas previamente ao congelamento com HCL 0.1 M foram diluídas a uma proporção final de 1:10 urina/fase móvel. As alíquotas foram transferidas para frascos de HPLC injetado 20 uL de amostra para a análise.

As concentrações de BH4 na urina foram realizadas em um equipamento de HPLC (Alliance e2695, Waters, Milford, Estados Unidos) utilizando uma coluna de fase reversa Waters Atlantis dC-18 (4,6 × 150 mm; partícula 5 µm), com fluxo de eluição isocrática ajustado para 0,7 mL/min, e fase móvel Fosfato de sódio monobásico, 6,5 mM, ácido cítrico 6 mM, sulfato de octila 3,5 mM, ácido dietilenotriaminopentacético 2,5 mM, DTE 160 mM e ACN 10 %, pH 3,0. A temperatura do compartimento da coluna foi ajustada a 35 °C. A identificação e quantificação da BH4 foi realizada por um detector eletroquímico (módulo 2465, Waters, Milford, EUA) com tensão de + 450 mV. Os resultados obtidos foram expressos em µmol de BH4 por mmol de creatinina (µmol/mmol de creatinina)

5.6.2 Quantificação de Neopterin por ELISA

A mensuração de neopterin nas amostras de plasma foram realizadas seguindo as instruções de kit comercial (My Biosource, Número de catálogo: MBS166286).

5.6.3 Determinação das concentrações de Creatinina

As concentrações de creatinina presentes na urina foram determinadas usando um kit comercial (Pointe Scientific Inc., Canton, Michigan, Estados Unidos) e seguido as recomendações técnicas do fabricante para realização do procedimento.

5.7 MENSURAÇÕES DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.7.1 Determinação dos níveis de GSH no plasma e tecido adiposo.

O princípio do ensaio se baseia na ligação covalente da sonda fluorescente O-oftalaldeído (OPT) com uma molécula de GSH presente na amostra, que pode ser quantificada por meio da mensuração da intensidade de fluorescência quando excitada a 350 nm e lida em emissão 420 nm. (HISSIN; HILF, 1976)

Brevemente, amostras de plasma ou TA foram descongeladas em gelo e mantidas em gelo durante todo o experimento. Alíquotas de 20 uL de plasma ou homogenato de tecido adiposo foram diluídas 10x em tampão de fosfato de sódio 100 mM pH 8.1 contendo EDTA dissódico 5 mM em água Milliq. Em duplicata, alíquotas de 20 uL da amostra diluída foi adicionada em placa para leitura de fluorescência contendo 96 poços. Foi adicionado aos poços 180uL do mix de reagentes, contendo 170 uL de tampão fosfato de sódio e 10 uL de OPT 1 mg/mL e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos, sendo mantida sob proteção de luz direta até o momento da leitura.

Os valores para plasma foram calculados a partir de curva padrão de GSH e expressos em umol/L e para tecidos foram expressos em nmol/mg de proteína

5.7.2 Determinação dos níveis de GSSG no tecido adiposo

O princípio do ensaio se baseia na adição do agente oxidante NEM na amostra, promovendo a remoção das moléculas de GSH livres presente na amostra. Após este tratamento, as amostras são colocadas em pH 12 numa solução de hidróxido de sódio 0.1 M para promover a hidrólise da GSSG presente nas amostras, permitindo que ocorra a interação com a sonda fluorescente OPT e intensidade de fluorescência mensurável (HISSIN; HILF, 1976).

Brevemente, alíquotas de TA foram descongeladas no gelo e 20 uL da amostra foi diluída 10x em tampão fosfato de sódio. As alíquotas diluídas foram tratadas então com 10 uL de NEM 0.1 M e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, 20 uL de cada amostra foi adicionado em duplicata a placa de fluorescência de 96 poços e adicionado 180 uL do mix de reagentes, contendo 170 uL de NaOH 0.1M e 10 uL de OPT 1 mg/mL. As amostras foram incubadas por 30 minutos sob proteção de luz direta até o momento da leitura.

5.7.3 Determinação dos níveis de TBA-RS no plasma e tecido adiposo

As amostras de plasma e TA foram descongeladas em gelo previamente ao experimento.

As amostras de plasma e TA foram tratadas com TCA 5% 1:1 e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. Após a centrifugação, 120 uL do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro, onde foi adicionado 120 uL de ácido tiobarbitúrico a 0,67 %. As amostras foram então homogeneizadas e levadas a banho maria a 95 °C por 1 horas. Após esta etapa, e resfriamento em banho de gelo por 5 min, foi adicionado 400 uL de butanol nas amostras, para então ser realizado a mistura por vórtex por 20 s. As amostras foram então centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos e 200 uL da fase orgânica superior foram adicionados aos poços de uma placa de leitura preta e levada para leitura com excitação de 515 nm e emissão de 553 nm (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Uma curva padrão foi realizada a partir de tetra-epóxiopropano para a determinação das concentrações de TBA-RS obtidas na amostra.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE SEPIAPTERINA REDUTASE NO TA

Os homegenatos de tecido adiposo foram descongelados no dia anterior ao experimento e determinado a concentração de proteínas. As concentrações de proteínas das amostras foram normalizadas para a concentração de 2,5 ug/uL, utilizando o tampão Laemmli para promover desnaturação das proteínas. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 12 % e transferidas para membranas de nitrocelulose e detectadas utilizando o anticorpo primário anti-SPR (27 kDa, 1:1500, Mybiosource) e exposto ao seu anticorpo secundário específico. A β -actina (42 kDa, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) foi usada como controle. As bandas foram analisadas usando o software Image LabTM (Bio-Rad). A razão da respectiva banda de proteína com a banda controle foi usada para a avaliação semiquantitativa.

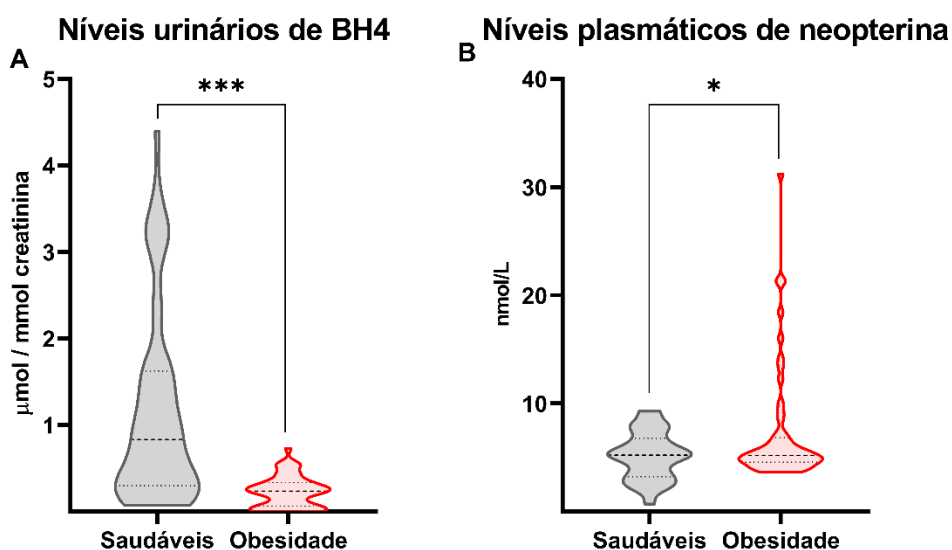
5.8.1 Análises estatísticas

A distribuição das amostras foi avaliada de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov, e o teste de Levene será utilizado para verificar a hipótese de variâncias iguais. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi usado caso ocorra comparações não paramétricas entre mais de dois grupos. O teste T de Student pareado e não pareado uni e bicaudal foi usado para as comparações paramétricas de uma única média entre dois grupos. Uma curva ROC foi gerada para determinar a sensibilidade e especificidade de BH4 para ser usado como um biomarcador para rastrear indivíduos com obesidade, calculando a área sob a curva ROC (AUC). O valor de corte também foi calculado. Os valores da AUC foram relatados com um intervalo de confiança (IC) de 95 %. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a presença de correlação entre variáveis contínuas. Análises de correlação univariada de Spearman foram utilizadas para investigar a correlação entre as variáveis antropométricas, bioquímicas, do metabolismo da BH4 e estresse oxidativo. Análises de regressão multivariada foram realizadas para investigar fatores associados ao aumento ou diminuição dos níveis de BH4 na urina e neopterin no plasma. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os testes utilizados foram executados pelo programa estatístico SPSS ou GraphPadPrism 9 (San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

A Figura 10 mostra os níveis urinários de BH4 e plasmáticos de neopterin em indivíduos acometidos por obesidade. A Figura 10A mostra que os níveis de BH4 na urina de indivíduos com obesidade se encontraram significativamente reduzidos quando comparados com os valores urinários de indivíduos saudáveis [$t_{(107)} = 6,00$; $P < 0,001$]. Em contrapartida, a Figura 10B mostra que os níveis de neopterin se encontraram significativamente aumentados no plasma de indivíduos com obesidade quando comparados com os controles [$t_{(77)} = 2,45$; $P < 0,05$].

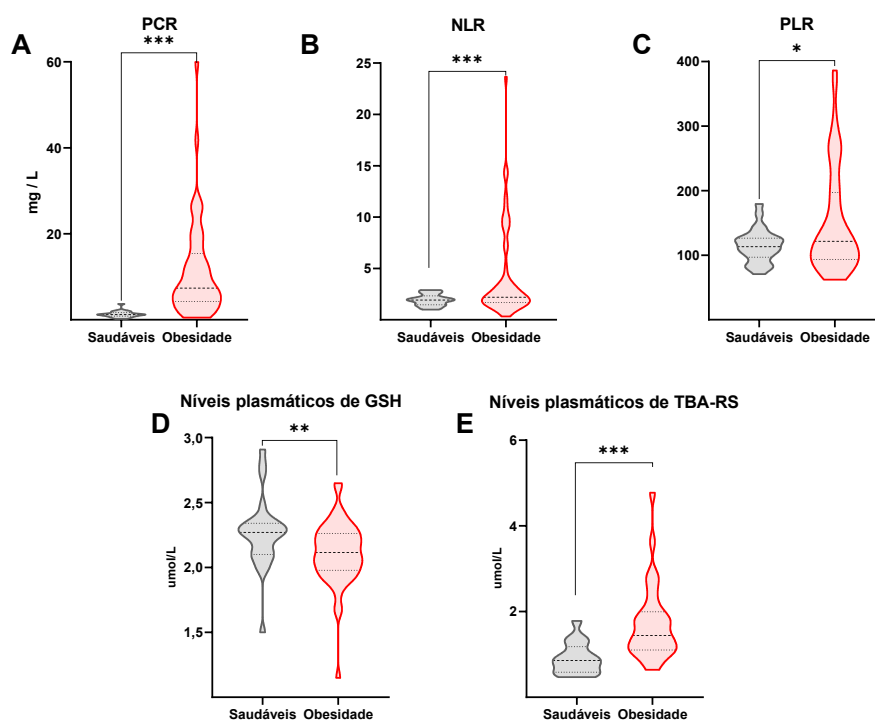
Figura 10. Níveis de metabólitos do metabolismo da tetraidrobiopterina (BH4) em fluidos biológicos de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.



(A) Concentrações de BH4 na urina ($n = 54$) e de (B) neopterin no plasma ($n = 53$) de indivíduos com obesidade grau 3 ou grau 2 com comorbidades associadas à obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica, e aqui definidos como grupo Obesidade. Os valores foram comparados com os determinados em fluidos biológicos de voluntários sadios pareados por sexo e idade que foram considerados como controles e aqui definidos como grupo Saudáveis ($n = 53$ para BH4 na urina, e $n = 29$ para neopterin no plasma). Os metabólitos foram quantificados por cromatografia líquida de alta resolução com detecção eletroquímica para BH4 e por ELISA para neopterin (para detalhes ver M&M). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, Saudáveis vs. Obesidade; teste t de Student bicaudal para amostras independentes.

A Figura 11 mostra os valores dos marcadores de inflamação PCR, da razão entre neutrófilos por linfócitos (NLR), e da razão entre plaquetas por linfócitos (PLR), dos níveis do antioxidante GSH, e do biomarcador de peroxidação lipídica TBA-RS no plasma de participantes com obesidade comparados. A Figura 11A mostra uma elevação significativa nos níveis plasmáticos de PCR nos indivíduos com obesidade quando comparado com os indivíduos saudáveis [$t_{(70)} = 4,18$; $P < 0,001$]. As Figuras 11B e 11C também mostram que os valores de NLR e PLR se encontraram significativamente aumentados nos indivíduos com obesidade (NLR: [$t_{(75)} = 3,68$; $P < 0,001$]; PLR: [$t_{(72)} = 2,18$; $P < 0,05$]). A Figura 11D mostra que os níveis plasmáticos de GSH encontraram-se significativamente reduzidos [$t_{(79)} = 2,65$; $P < 0,01$], e que os de TBA-RS se apresentaram significativamente aumentados no plasma dos indivíduos com obesidade [$t_{(46)} = 3,55$; $P < 0,001$] (Figura 11E). Estes dados sugerem que os indivíduos com obesidade se encontram em um estado inflamatório ativo e apresentaram estresse oxidativo.

Figura 11 . Níveis de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no sangue de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.



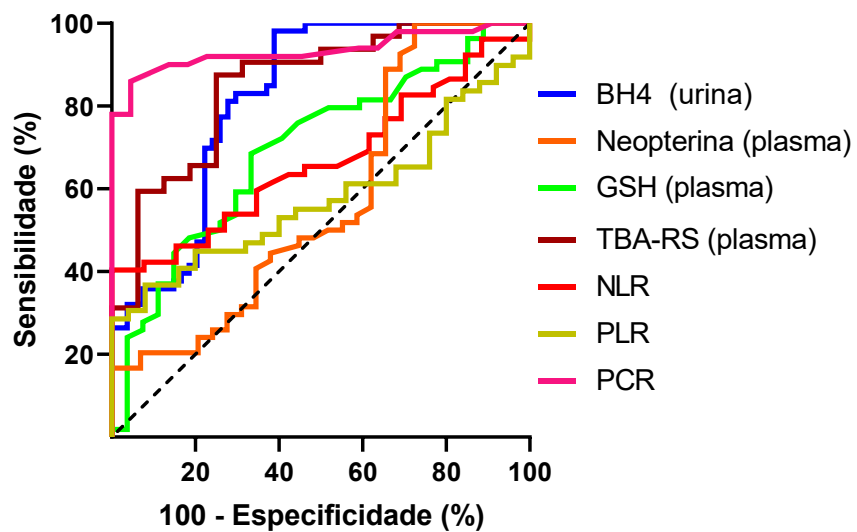
(A) Concentrações plasmáticas de proteína C reativa (PCR; n= 50), (B) Valores sanguíneos da razão entre neutrófilos e linfócitos (NLR; n= 51), (C) entre plaquetas e linfócitos (PLR; n= 49), e plasmáticos dos (D) níveis de glutathiona (GSH; n= 54), e de (E) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em indivíduos com obesidade grau 3 ou grau 2 com comorbidades associadas à obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica, e aqui definidos como grupo Obesidade. Os valores foram comparados com os determinados em voluntários saudáveis pareados por sexo e idade que foram considerados como controles e aqui definidos como grupo Saudáveis (n= 26 para NLR; n= 25 para PLR; n= 22 para PCR; n= 27 para GSH; n= 16 para TBA-RS). A razão NLR e a PLR foram calculados pela divisão do valor total de células/uL de neutrófilos para NLR e plaquetas para PLR pelo valor total de células/uL de linfócitos no sangue e determinadas por citometria de fluxo e impedância. Os níveis de PCR foram quantificados por turbidimetria. Os níveis de GSH e TBA-RS foram mensurados fluorometricamente (para detalhes ver M&M). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, Saudáveis vs. Obesidade; teste *t* de *Student* bicaudal para amostras independentes.

A seguir foi analisado se os valores urinários de BH4, e plasmáticos de neoptertina, GSH, TBA-RS, NLR e PCR poderiam discriminar os indivíduos afetados por obesidade. Para tal foi utilizada uma representação gráfica, a curva ROC, que ilustra o desempenho de um sistema classificador binário (controles versus indivíduos com a doença) à medida que o seu limiar de discriminação varia (diferentes níveis dos biomarcadores). A Figura 12 mostra que a sensibilidade dos níveis urinários de BH4

para classificar indivíduos com obesidade baseados na curva ROC foi de 82 %, com uma especificidade de 68,5 %, e com um valor de corte de 0,37 umol/mmol creatinina [AUC= 0,82; IC 95 %: 0,73 - 0,90]. No caso dos marcadores plasmáticos, a curva ROC para neopterinina mostrou uma sensibilidade e especificidade de 54,9 % e 37,9 %, respectivamente, com valor de corte de 4,94 nmol/L [AUC= 0,57; IC 95 %: 0,43 - 0,70]. A curva ROC gerada para a molécula antioxidante GSH apresentou uma sensibilidade de 70,6 %, enquanto que a especificidade foi de 66,7 %, com valor de corte de 2,22 umol/L [AUC= 0,71; IC 95 %: 0,59 - 0,83]. A seguir a análise dos níveis de TBA-RS mostraram uma sensibilidade de 84,5 % e uma especificidade de 75%, com valor de corte de 1,03 umol/L [AUC= 0,86; IC 95 %: 0,75 - 0,98]. A análise da curva ROC gerada pelos valores de NLR apresentaram sensibilidade de 65,3 % e especificidade de 46,2 %, com valor de corte de 1,9 [AUC= 0,67; IC 95 %: 0,55 - 0,79]. Os valores de sensibilidade e especificidade para PLR foram de 56,5 % e 46,2 % respectivamente, com valor de corte de 111,7 [AUC= 0,56; IC 95 %: 0,43 - 0,69]. Por último, os valores plasmáticos de PCR pela análise de ROC apresentaram um valor de sensibilidade de 93,2 % e especificidade de 99 %, com valor de corte de 2,1 mg/L [AUC= 0,93; IC 95 %: 0,87 - 0,99]. Um resumo com os valores estatísticos gerados na análise ROC de biomarcadores para identificação de indivíduos com obesidade está apresentado no Quadro 7. Pode assim ser observado que a melhor sensibilidade para discriminar indivíduos com obesidade foram os valores plasmáticos de PCR e de TBA-RS. Na sequência os valores urinários de BH4 se apresentaram com sensibilidade similar e superior a neopterinina plasmática ou às razões sanguíneas de NLR e PLR.

Figura 12. Curva característica de operação do receptor (ROC) para níveis urinários de tetrahydrobiopterina (BH4), de níveis plasmáticos de neopterin, glutathione (GSH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e de proteína C reativa (PCR), e de valores sanguíneos da razão de neutrófilos por linfócitos (NLR), e da razão de plaquetas por linfócitos (PLR) em indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.

Curvas ROC para biomarcadores de identificação de indivíduos com obesidade elegíveis a cirurgia bariátrica



Os níveis de BH4 foram quantificados usando cromatografia líquida de alta resolução com detecção eletroquímica, e os de neopterin por ELISA. Os valores de GSH e TBA-RS foram quantificados por fluorometria (para detalhes ver M&M). A razão NLR e a PLR foram calculados pela divisão do valor total de células/uL de neutrófilos para NLR e plaquetas para PLR pelo valor total de células/uL de linfócitos no sangue e determinadas por citometria de fluxo e impedância. Os níveis de PCR foram quantificados por turbidimetria. A curva ROC para os níveis de BH4 na urina é mostrada em azul, para os níveis de neopterin no plasma em laranja, para os níveis de GSH em verde, para os níveis de TBA-RS em vermelho escuro, para NLR em vermelho, para PLR em amarelo e PCR em rosa. A linha pontilhada em preto é a referência e exibe a capacidade discriminatória não melhor que o acaso.

Quadro 7. Valores da área baixo da curva (AUC) gerada pela análise da curva característica de operação do receptor (ROC) de biomarcadores para identificação de indivíduos com obesidade.

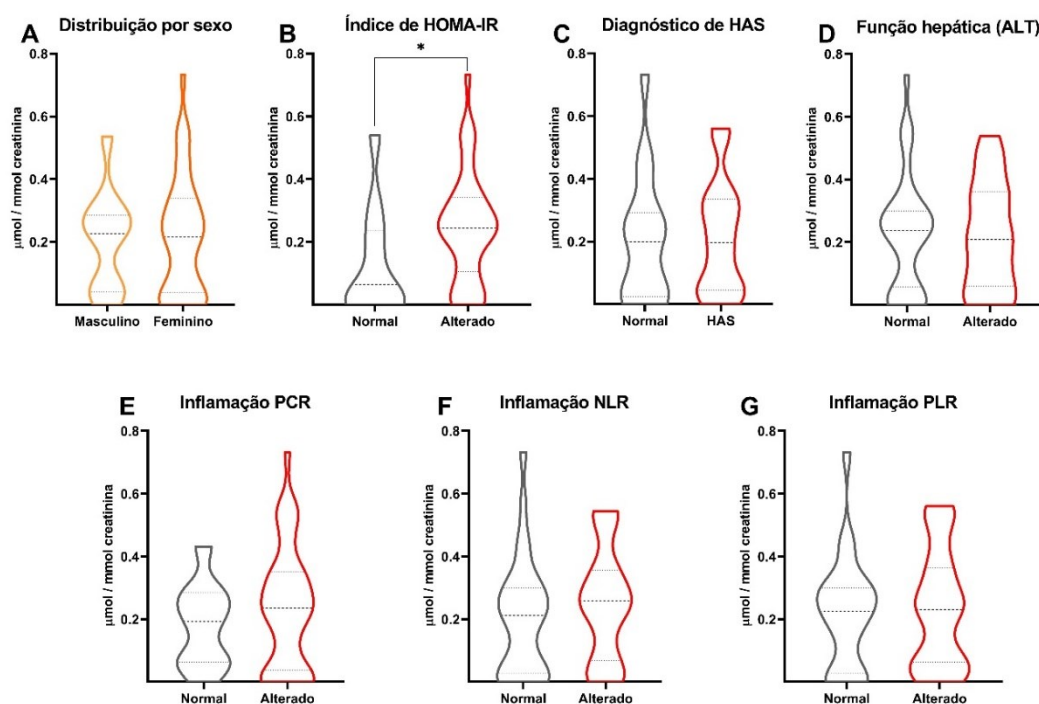
Biomarcadores	AUC	Valor de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	IC 95 % inferior - superior	Valor de P
BH4 (urina)	0,82	0,37 umol/mmol creatinina	82	68,5	0,73 - 0,90	**
Neopterin (plasma)	0,57	4,94 nmol/L	54,9	37,9	0,43 - 0,70	ns
GSH (plasma)	0,71	2,22 umol/L	70,6	66,7	0,59 - 0,83	**
TBA-RS (plasma)	0,86	1,08 umol/L	84,5	75	0,75 - 0,98	**
NLR	0,67	1,9	65,3	46,2	0,55 - 0,79	**
PLR	0,56	111,7	56,5	46,2	0,43 - 0,69	ns
PCR	0,93	2,1 mg/L	93,2	99	0,87 - 0,99	*

IC= Intervalo de confiança; BH4= Tetraidrobiopterina; GSH= Glutaciona; TBA-RS= Espécies reativas ao ácido tiobarbiturico, NLR= Razão entre neutrófilos por linfócitos; PLR= Razão entre plaquetas por linfócitos; PCR= Proteína C reativa; ns= não significativo; *P < 0,05; **P < 0,01. Obesidade vs Saudáveis; teste de ROC.

Considerando que os níveis urinários de BH4 classificaram melhor os indivíduos com obesidade de voluntários sadios do que as concentrações de neopterin plasmáticas, a seguir as concentrações de BH4 do grupo com obesidade foram agrupadas de acordo com diferentes variáveis como mostrado na Figura 13. A Figura 12B mostra que os níveis urinários de BH4 se encontraram significativamente aumentados nos indivíduos com índice HOMA-IR elevado (normal até 2,5) [$U_{(49)}=120,5$; $P < 0,05$]. No entanto, as Figuras 13A, e 13C-13G mostram que os níveis de BH4 não foram diferentes na urina de indivíduos com obesidade classificados de acordo com o sexo, diagnóstico de HAS, função hepática, ou marcadores de inflamação como níveis de PCR, valores de NLR e PLR.

Figura 13. Distribuição dos níveis urinários de BH4 em indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica de acordo com o sexo, índice de HOMA-IR, diagnóstico de HAS, função hepática e marcadores sanguíneos de inflamação.

Valores urinários de BH4 de indivíduos com obesidade distribuídos em diferentes categorias

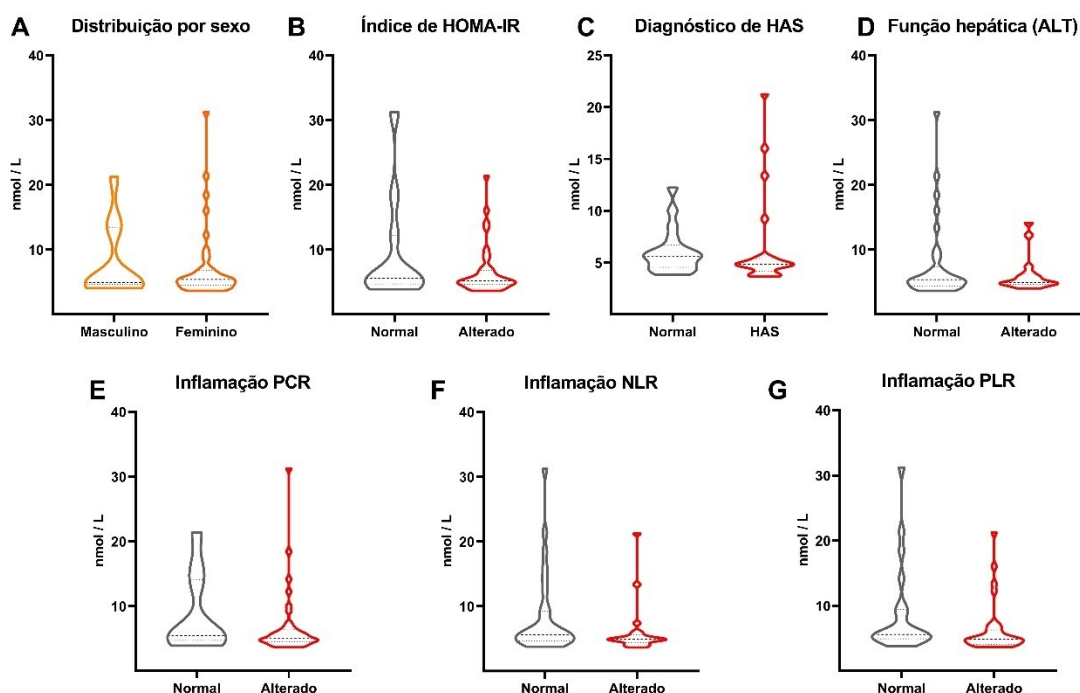


Os valores urinários de BH4 de indivíduos com obesidade ($n= 53$) foram mensurados por cromatografia líquida com detector eletroquímico e agrupados de acordo com (A) sexo, (B) índice de HOMA-IR (do inglês *Homeostatic model assesment for insulin resistance*; valor normal, até 2,5), (C) diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica (HAS; valor normal, sem diagnóstico de HAS), (D) disfunção hepática avaliada pela atividade plasmática da enzima alanina aminotransferase (ALT; valor normal, até 45 U/L), (E) inflamação avaliada pelos níveis plasmáticos de proteína C reativa (PCR; valor normal, até 3), (F) valores da razão de neutrófilos por linfócitos (NLR; valor normal, até 3), e (G) valores da razão de plaquetas por linfócitos (PLR; valor normal, até 114). * $P < 0,05$, Normal vs. Alterado, teste U de Mann-Whitney bicaudal para amostras não paramétricas e independentes.

A seguir, na Figura 14, foi avaliado se os valores plasmáticos de neopterin poderiam apresentar diferenças entre os indivíduos com obesidade de acordo com as mesmas categorias aplicadas anteriormente. Pode ser observado, entre as Figuras 14A-14G que os níveis plasmáticos de neopterin não diferiram estatisticamente entre as variáveis analisadas, como sexo, índice de HOMA-IR, diagnóstico de Hipertensão arterial sistêmica (HAS), função hepática, ou marcadores de inflamação como níveis de PCR, valores de VSH e de NLR.

Figura 14. Distribuição dos níveis plasmáticos de neopterina em indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica de acordo com o sexo, índice de HOMA-IR, diagnóstico de HAS, função hepática e marcadores sanguíneos de inflamação.

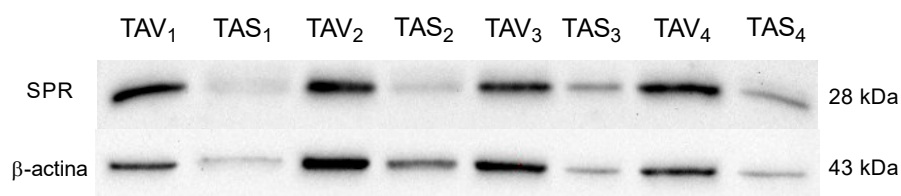
Valores plasmáticos de neopterina de indivíduos com obesidade distribuídos em diferentes categorias



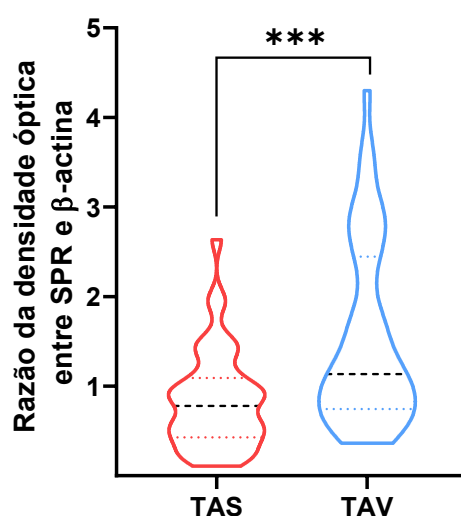
Os valores plasmáticos de neopterina de indivíduos com obesidade ($n= 54$) foram mensurados por ELISA e agrupados de acordo com (A) sexo, (B) índice de HOMA-IR (do inglês *Homeostatic model assesstment for insulin resistance*; valor normal, até 2,5), (C) diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica (HAS; valor normal, sem diagnóstico de HAS), (D) disfunção hepática avaliada pela atividade plasmática da enzima alanina aminotransferase (ALT; valor normal, até 45 U/L), (E) inflamação avaliada pelos níveis plasmáticos de proteína C reativa (PCR; valor normal, até 3), (F) valores da razão de neutrófilos por linfócitos (NLR; valor normal, até 3), e (G) valores da razão de plaquetas por linfócitos (PLR; valor normal, até 114).

Como mostrado na figura 7, TAS e TAV foram coletados dos participantes com obesidade no momento da gastroplastia. A Figura 15 mostra que o metabolismo da BH4, estimado pela determinação do conteúdo de uma das enzimas da via da salvação, a SPR, se encontrou significativamente aumentado no TAV quando comparado com o TAS [$t_{(85)}= 3,97$; $P < 0,001$].

Figura 15. Conteúdo proteico de sepiapterina redutase (SPR) no tecido adiposo subcutâneo (TAS) e visceral (TAV) de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.



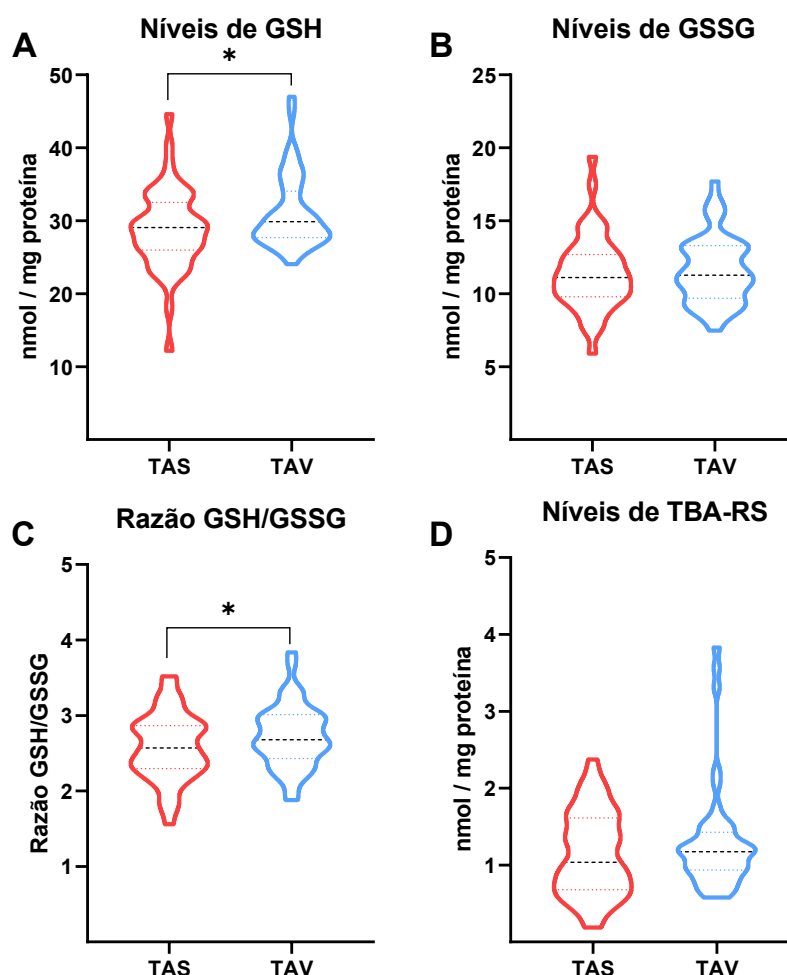
Conteúdo proteico de SPR no TA



Amostras de TAS ($n=47$) e TAV ($n=47$) foram coletadas no dia da intervenção cirúrgica. O conteúdo proteico de SPR foi determinado *Western blot* (para detalhes ver M&M). $***P < 0,001$, TAS vs. TAV; teste *t* de *Student* bicaudal para amostras paramétricas e independentes.

A seguir foram também mensurados marcadores de estresse oxidativo no TA de indivíduos com obesidade. A Figura 16 apresenta os níveis de GSH, GSSG e a razão dentre eles, no TAS e no TAV dos indivíduos com obesidade submetidos a gastroplastia. Pode ser observado nas Figuras 16A e 16C que os níveis de GSH e a razão entre GSH/GSSG no TAV foram significativamente maiores que no TAS (Figura 16A: [$t_{(92)}= 2,1$; $P < 0,05$]; Figura 16C: [$t_{(90)}= 1,67$; $P < 0,05$]). Em contrapartida, os resultados apresentados nas Figuras 16B e 16D mostram que os níveis de GSSG e o TBA-RS foram similares quando comparado o TAS com o TAV. Deve ser ressaltado que os valores aqui obtidos não foram comparados com um grupo controle devido a invasividade do procedimento de coleta.

Figura 16. Concentrações de glutatona (GSH), glutatona oxidada (GSSG), e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) no tecido adiposo subcutâneo (TAS) e visceral (TAV) de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.



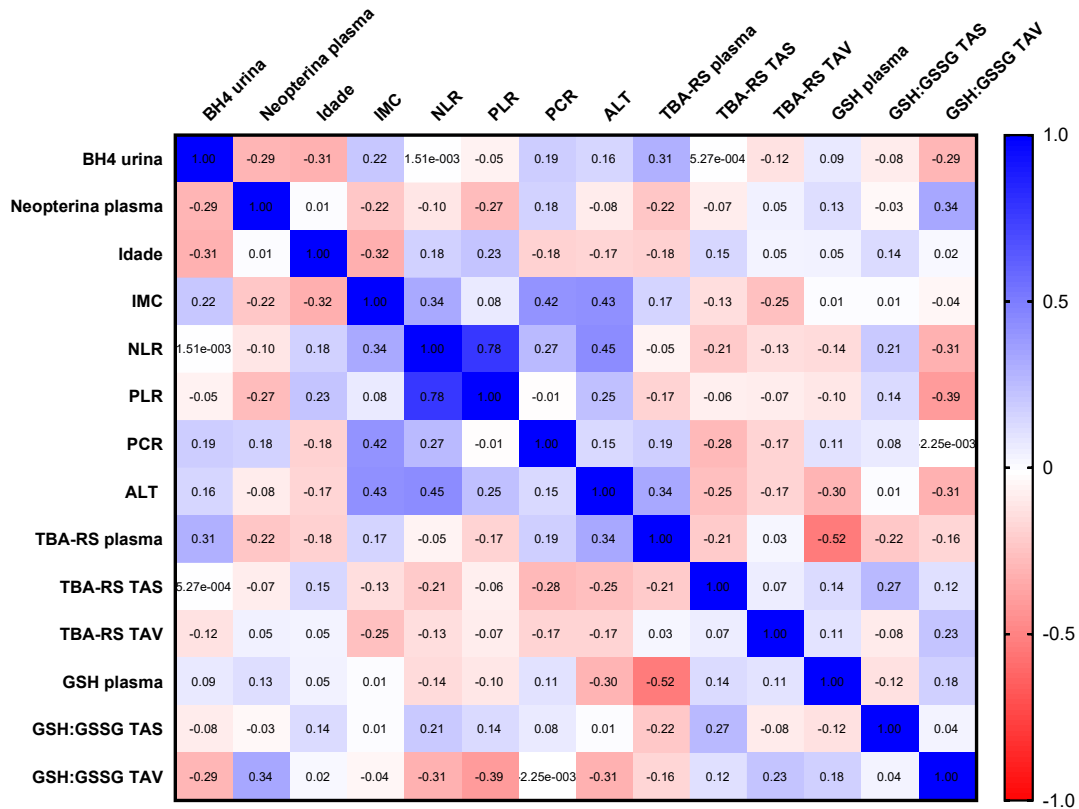
Amostras de TAS (n= 47) e TAV (n= 47) foram coletadas no dia da intervenção cirúrgica. Os níveis de GSH e de TBA-RS foram mensurados fluorometricamente (para detalhes ver M&M). * $P < 0,05$, TAS vs. TAV; teste *t* de *Student* unicaudal para amostras paramétricas e independentes.

Para uma análise mais compreensiva sobre uma eventual associação do metabolismo da BH4 nos fluidos biológicos e os biomarcadores de estresse oxidativo medidos no plasma e TA com marcadores antropométricos, inflamatórios, e do metabolismo glicêmico e lipídico, foram realizados os mapas de calor apresentados nas Figura 17 e Figura 18. A Figura 17 apresenta as correlações entre os valores de BH4 e neopterin em fluidos biológicos, com os valores dos biomarcadores de

estresse oxidativo plasmáticos e no TA, com a idade, o biomarcador antropométrico IMC, e marcadores de inflamação como NLR, PLR, e PCR, e o biomarcador de lesão hepática ALT. Pode ser observado na Figura 17 que tanto para a BH4 na urina e neopterinina no plasma, não houve correlações fortes entre os marcadores apresentados, apesar de algumas correlações obterem poder estatístico significativo. O mesmo pode ser observado entre os biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos no TA (Figura 17).

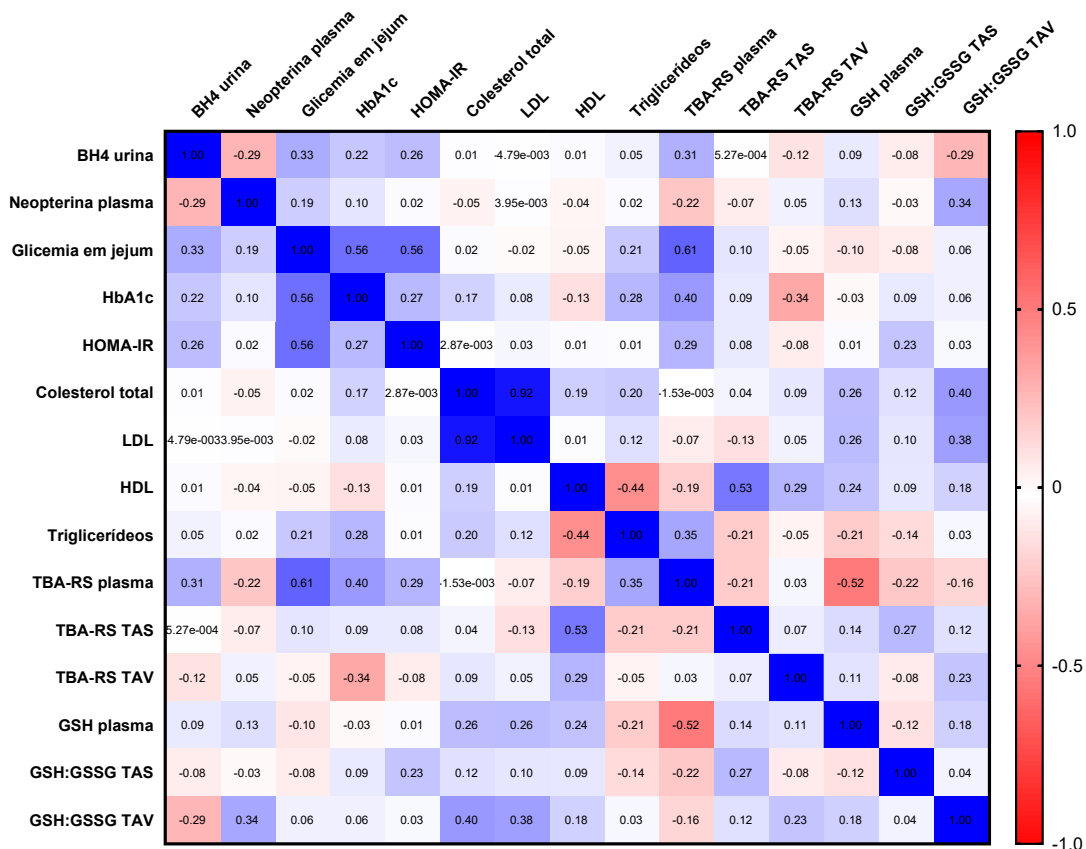
Na Figura 18 estão apresentadas as correlações entre os valores de BH4 e neopterinina em fluidos biológicos, os valores dos biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos e no TA, com o perfil glicêmico e lipídico. Podemos observar na Figura 18 que os níveis de BH4 urinários e neopterinina plasmáticos não apresentaram correlações fortes com os marcadores de perfil glicêmico e lipídico. Porém, o biomarcador de estresse oxidativo plasmático TBA-RS correlacionou positivamente de com os valores de glicemia em jejum [$r= 0,61$; $P < 0,001$], Outras correlações não se apresentaram fortes ou com diferenças estatísticas.

Figura 17. Mapa de calor relacionando os níveis de tetraidrobiopterina (BH4) urinária e de neopterina plasmática com variáveis antropométricas, inflamatórias e de estresse oxidativo obtidas de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.



A correlação entre as diferentes variáveis estudadas foi analisada pelo teste de *Spearman* e o valor do estatístico *r* é mostrado em cada célula do mapa de calor. A intensidade da cor das células é proporcional à força das associações, variando de azul (correlações positivas) a vermelho (correlações inversas). A força da correlação é indicada na escala de cores (à direita do painel). Abreviações: IMC= índice de massa corporal; NLR= razão neutrófilo por linfócito; VHS= volume de hemossedimentação; PCR= proteína C reativa; ALT= alanina aminotransferase; TBA-RS= espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH= glutatona; GSSG= glutatona oxidada; TAS= tecido adiposo subcutâneo; TAV= tecido adiposo visceral.

Figura 18. Mapa de calor relacionando os níveis de tetraidrobiopterina (BH4), neoptերina e biomarcadores de estresse oxidativo no plasma e TA com variáveis do perfil glicêmico e lipídico obtidas de indivíduos com obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica.



A correlação entre as diferentes variáveis estudadas foi analisada pelo teste de *Spearman* e o valor do estatístico r é mostrado em cada célula do mapa de calor. A intensidade da cor das células é proporcional à força das associações, variando de azul (correlações positivas) a vermelho (correlações inversas). A força da correlação é indicada na escala de cores (à direita do painel) Abreviações: BH4; tetraidrobiopterina HOMA-IR= do inglês *Homeostatic model assesstment for insulin resistance*; LDL= lipoproteína de baixa densidade; HDL= lipoproteína de alta densidade; TBA-RS= espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH= glutatona; GSSG= glutatona oxidada; TAS= tecido adiposo subcutâneo; TAV= tecido adiposo visceral

O Quadro 8 mostra o efeito da cirurgia bariátrica sobre variáveis antropométricas e bioquímicas utilizadas no seguimento clínico dos participantes do estudo de acordo como mostrado na Figura 7. O quadro mostra que após 12 meses da intervenção houve uma redução significativa da massa corporal, melhora de marcadores de resistência à insulina, evidenciado pela redução do percentual de HbA1c e dos valores do índice HOMA-IR, melhora do perfil lipídico, caracterizado por

uma significativa redução dos níveis de TGC, e por aumento dos níveis de HDL. A tabela também mostra que houve uma redução significativa nos níveis de GGT e ALT, biomarcadores da saúde hepática, e nos níveis de NLR, PL e PCR, biomarcadores de inflamação.

Quadro 8. Comparação das variáveis antropométricas e bioquímicas no momento da intervenção cirúrgica (Pré) e após 12 meses (Pós) nos participantes afetados por obesidade e submetidos a cirurgia bariátrica.

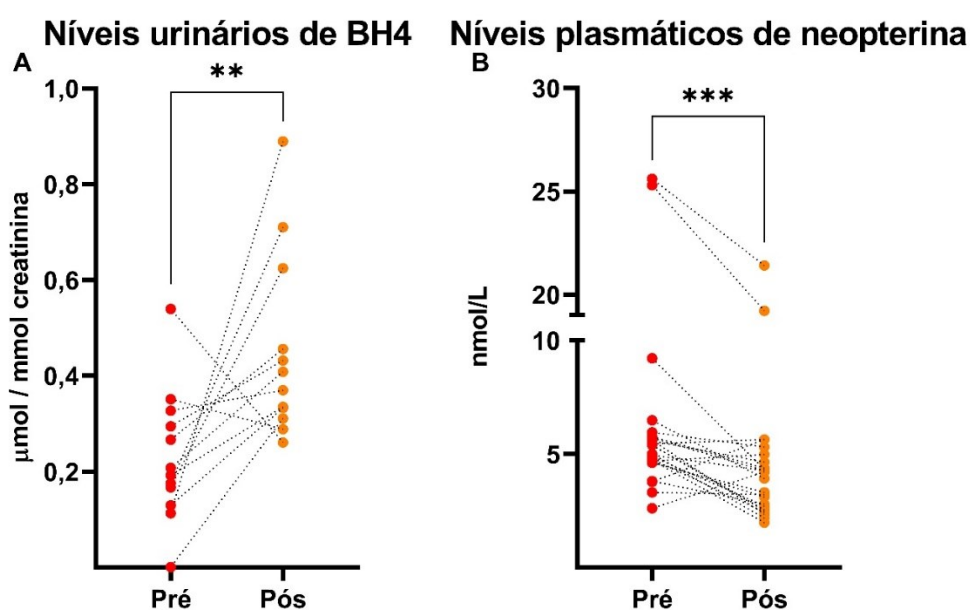
Variáveis antropométricas e bioquímicas	Participantes submetidos a cirurgia bariátrica (Média ± DV, ou IIQ)		Estatística (Pré vs. Pós)	
	Pré	Pós (12 meses)	Valor de P	Valor de t ou w
Peso (kg)	124,5 ± 26	84,5 ± 19,1	***	t ₍₂₀₎ = 20,1
IMC	47,5 ± 7	32,1 ± 5,4	***	t ₍₂₀₎ = 21,1
Percentual de massa corporal perdida (%)	-	31,7 ± 7,4	-	
NLR	4,3 ± 4,6	1,5 ± 0,4	**	t ₍₁₈₎ = 3,61
PLR	149 ± 83,4	100,9 ± 42,2	*	t ₍₁₈₎ = 2,22
VHS (mm/h)	26,7 ± 21,4	17,0 ± 12,4	ns	
PCR (mg/L)	8 [IIQ:3,5 - 14,6]	1,15 [IIQ:0,5 - 1,9]	***	W ₍₂₀₎ = -167
Glicemia jejum (mg/dL)	105 [IIQ:91 - 135,5]	87 [IIQ:85 - 91]	***	W ₍₂₀₎ = -189
HbA1c (%)	6 ± 1,0	5,2 ± 0,4	***	t ₍₂₀₎ = 4,21
Insulina (µU/mL)	18 ± 9	5,71 ± 1,9	***	t ₍₂₀₎ = 7,10
HOMA-IR	6,5 ± 5,6	1,2 ± 0,6	***	t ₍₂₀₎ = 5,43
CT (mg/dL)	178 ± 35,6	162,5 ± 35,7	ns	
HDL (mg/dL)	45,7 ± 11,2	57,3 ± 13,7	***	t ₍₂₀₎ = 4,96
LDL (mg/dL)	108,3 ± 32,4	89,9 ± 27,3	*	t ₍₂₀₎ = 2,53
TGC (mg/dL)	132 ± 68,7	68,6 ± 25,38	***	t ₍₂₀₎ = 4,84
GGT (U/L)	40 [IIQ:30,2 - 53,5]	23,5 [IIQ:19 - 33]	***	W ₍₁₉₎ = -190
Fosfatase alcalina (U/L)	75,71 ± 16,1	92,6 ± 26,6	*	t ₍₂₀₎ = 2,55
Ácido úrico (mg/dL)	5 [IIQ:4,3 - 5,95]	3,8 [IIQ:3,4 - 4,1]	***	W ₍₁₉₎ = -208
AST (U/L)	27,4 ± 22,5	23,1 ± 14,7	ns	
ALT (U/L)	46,1 ± 54,9	26,2 ± 9,1	*	t ₍₁₉₎ = 2,21
Uréia (mg/dL)	33,2 ± 11,1	32,7 ± 8,0	ns	
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	***	t ₍₁₉₎ = 5,60
Vitamina D (ng/mL)	26,8 ± 7,65	35,3 ± 7,1	**	t ₍₁₉₎ = 3,42
Ferritina (ng/mL)	115,2 [IIQ:60,1 - 336,1]	95,1 [IIQ:43,1 - 184,8]	**	W ₍₂₀₎ = -147

Abreviações: DV= desvio padrão; IIQ= intervalo interquartil; IMC= índice de massa corporal; NLR= razão neutrófilo por linfócito; PLR= razão plaquetas por linfócitos; VHS= velocidade de hemossedimentação; PCR= proteína C reativa; HbA1c= hemoglobina glicada; HOMA-IR= do inglês *homeostasis model assessment for insulin resistance*; CT= colesterol total; HDL= lipoproteína de alta densidade; LDL= lipoproteína de baixa densidade; TGC= triglicérides; GGT= Gama glutamyl transferase; ns= não significativo. Dados considerados normais por testes de normalidade foram apresentados media ± desvio padrão. Dados considerados não normais por testes de normalidade estão apresentados na forma Mediana [IIQ:25 % - 75 %]. Variáveis em que apenas o grupo pós foi considerado normal estão apresentados como média ± DV. *P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001; Pré vs Pós; t= teste t de student bicaudal para dados pareados e paramétricos; W= teste t de wilcoxon bicaudal para dados pareados e não paramétricos.

As Figuras 19A e 19B mostram os níveis de BH4 na urina e de neopterin no plasma, respectivamente, de indivíduos com obesidade no momento da intervenção

cirúrgica (Pré) e após 12 meses da realização do procedimento (Pós). A Figura 19A mostra que a redução de peso (ver Quadro 7) promoveu um aumento significativo dos níveis de BH4 na urina [$t_{(11)} = 2,76$; $P < 0,01$], e uma redução também significativa dos níveis de neopterina no plasma [$t_{(23)} = 4,53$; $P < 0,001$].

Figura 19. Efeito da redução de peso provocado pela cirurgia bariátrica sobre os níveis de tetraidrobiopterina (BH4) e neopterina em fluidos biológicos de indivíduos acometidos por obesidade e submetidos a gastroplastia.

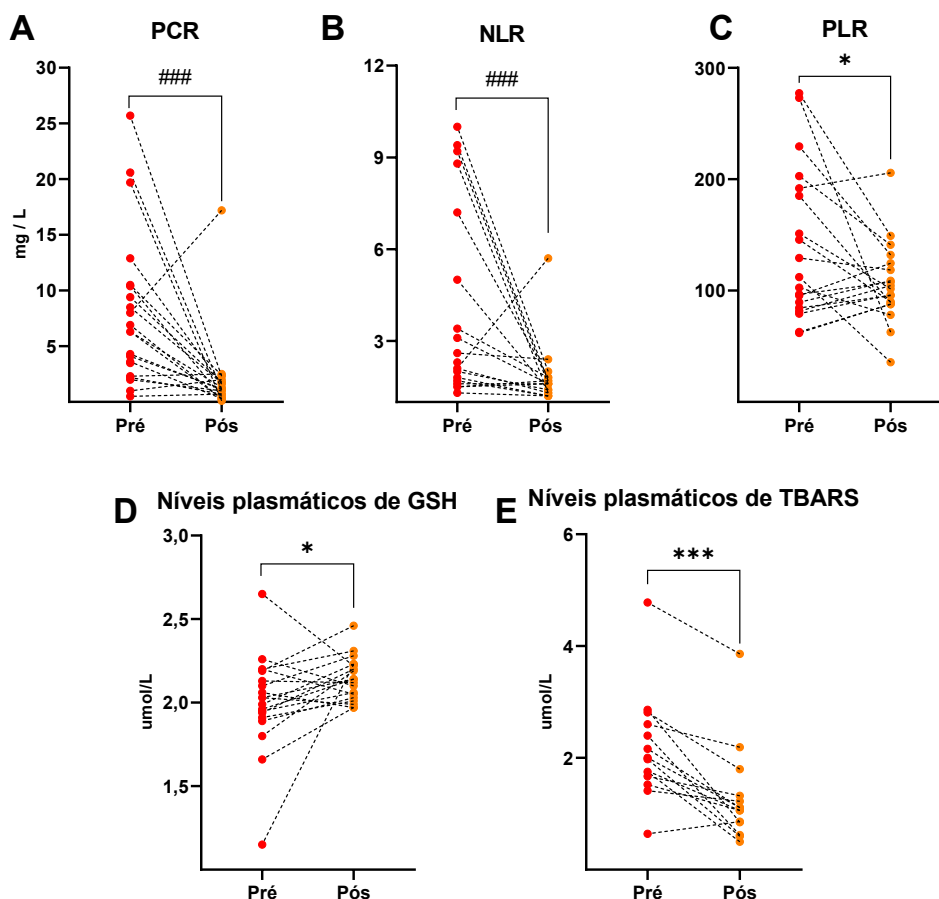


(A) Concentrações de BH4 na urina e (B) de neopterina no plasma de indivíduos com obesidade grau 3 ou grau 2 com comorbidades associadas à obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica ($n = 12$) no momento da gastroplastia (Pré), e após 12 meses da intervenção cirúrgica (Pós). Os metabólitos foram quantificados por cromatografia líquida de alta resolução com detecção eletroquímica para BH4 e por ELISA para neopterina (para detalhes ver M&M). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, Pré vs. Pós; teste t de *Student* unicaudal para amostras pareadas.

De acordo com as mudanças ocasionadas pela redução do acúmulo do TA nos níveis de BH4 na urina (que pode ser interpretada com um marcador de capacidade antioxidante) e de neopterina no plasma (marcador de ativação da resposta inflamatória) (Figura 19), a Figura 20 apresenta os efeitos benéficos observados da gastroplastia sobre os valores de PCR, NLR, PLR, GSH e TBA-RS plasmáticos, marcadores biológicos utilizados para inferir sobre a presença de inflamação e estresse oxidativo, respectivamente. A Figura 20A mostra que o biomarcador clássico

de inflamação PCR, esteve significativamente reduzido no momento pós, quando comparado com o momento Pré gastroplastia [$W_{(20)}=-167$; $P < 0,001$]. As Figura 20B e 20C mostram que os níveis dos marcadores inflamatórios calculados pelo conteúdo sanguíneo de células imunes e plaquetas obtiveram uma redução significativa como efeito da redução de peso obtida pela cirurgia bariátrica (Figura 20B: [$W_{(20)}=-153$; $P < 0,001$]; Figura 20C: [$t_{(18)}= 2,22$; $P < 0,05$]). Além disso, os benefícios metabólicos promovidos pela cirurgia bariátrica também melhoraram os marcadores do estado oxidativo nestes indivíduos. A Figura 20D apresenta os valores plasmáticos de GSH, indicando um aumento significativo das concentrações deste antioxidante [$t_{(18)}= 1,98$; $P < 0,05$]. De acordo com este resultado, a Figura 20E mostra uma redução significativa dos valores do biomarcador de peroxidação lipídica TBA-RS [$t_{(13)}= 5,30$; $P < 0,001$].

Figura 20. Efeito da redução de peso provocado pela cirurgia bariátrica sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em fluidos biológicos de indivíduos acometidos por obesidade e submetidos a gastroplastia.



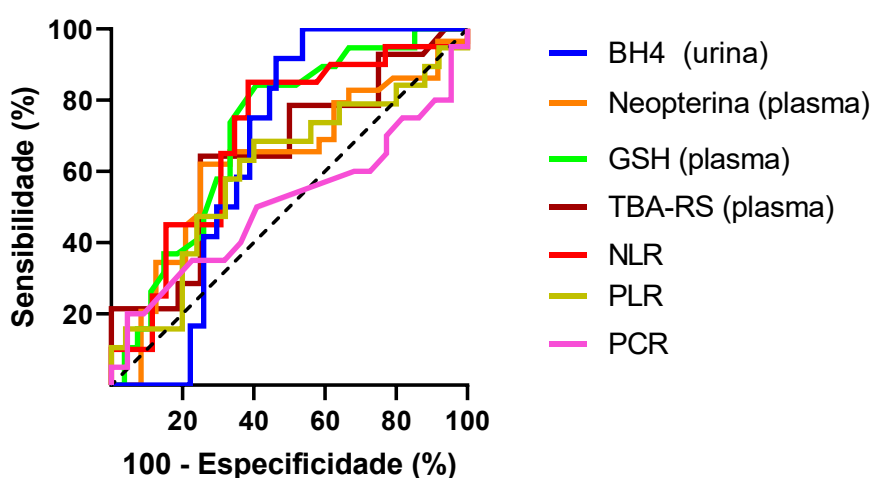
(A) Valores da razão neutrófilos por linfócitos (NLR; $n = 20$), (B) valores da razão entre plaquetas e linfócitos (PLR; $n = 19$), (C) concentrações de proteína C reativa (PCR; $n = 20$), (D) níveis de glutathiona (GSH; $n = 19$) no plasma, (E) espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS; $n = 14$) em indivíduos com obesidade grau 3 ou grau 2 com comorbidades associadas à obesidade que foram elegíveis para intervenção com cirurgia bariátrica. Os valores foram coletados no momento da gastroplastia (Pré), e após 12 meses da intervenção cirúrgica (Pós). A razão NLR e a PLR foram calculados pela divisão do valor total de células/uL de neutrófilos para NLR e plaquetas para PLR pelo valor total de células/uL de linfócitos no sangue e determinadas por citometria de fluxo e impedância. Os níveis de PCR foram quantificados por turbidimetria. Os níveis de GSH e TBA-RS foram mensurados fluorometricamente (para detalhes ver M&M). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, Pré vs. Pós; teste t de *Student* unicaudal para amostras pareadas e paramétricas; ### $P < 0,001$, teste t de *W* de Wilcoxon unicaudal para amostras pareadas e não paramétricas

A seguir, foi aplicado novamente a análise da curva ROC, conforme o gráfico apresentado na Figura 21. Neste caso, as amostras coletadas após 12 meses da intervenção cirúrgica foram comparadas com os voluntários saudáveis para identificar

se os biomarcadores ainda mantinham a capacidade discriminatória de indivíduos afetados por obesidade de um grupo de voluntários saudáveis. Pode ser observado na Figura 21 que a *AUC* para os valores urinários de BH4 foi reduzida em 28,7 % quando comparada com o momento prévio à gastroplastia [*AUC*= 0,58; IC 95 %: 0,44 - 0,73]. Apesar dos valores plasmáticos de neopterinina não terem obtido valores significativos como biomarcador no momento pré-cirúrgico, a análise de ROC para o momento pós apresentou uma redução de 33,9 % da *AUC* [*AUC*= 0,37; IC 95 %: 0,22 - 0,53]. No caso dos valores plasmáticos de GSH mantiveram a capacidade discriminativa semelhante, mantendo o mesmo valor para a *AUC* que o momento pré-cirúrgico [*AUC*= 0,71; IC 95 %: 0,56 - 0,86], possivelmente mostrando que ainda persiste um estado de estresse oxidativo. De acordo com o resultado apresentado na Figura 20E, que mostra uma redução significativa de peroxidação lipídica no plasma 12 meses após a cirurgia bariátrica, a análise de ROC para o biomarcador TBA-RS apresentou uma redução de 24,3 % da *AUC* [*AUC*= 0,65; IC 95 %: 0,45 - 0,85]. Em relação aos biomarcadores de inflamação, todos obtiveram uma redução na sua força discriminatória. A NLR obteve a maior redução da *AUC*, com 54,7 % [*AUC*= 0,65; IC 95 %: 0,45 - 0,85], seguido pelo PCR, com 46,9 % de redução da *AUC* [*AUC*= 0,49; IC 95 %: 0,31 - 0,68] e por último a PLR com uma redução de 29,2 % [*AUC*= 0,40; IC 95 %: 0,22 - 0,57]. Um resumo com todos os valores de *AUC*, porcentagem de redução da *AUC*, valores de corte, de sensibilidade e especificidade e intervalos de confiança estão dispostos na quadro 9.

Figura 21. Curva característica de operação do receptor (ROC) para níveis urinários de tetrahydrobiopterina (BH4), de níveis plasmáticos de neopterina, glutatona (GSH), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), e de proteína C reativa (PCR), e de valores sanguíneos da razão de neutrófilos por linfócitos (NLR), e da razão de plaquetas por linfócitos (PLR) em indivíduos com obesidade 12 meses após da intervenção com cirurgia bariátrica.

Curvas ROC para biomarcadores de identificação de indivíduos 12 meses após gastroplastia



Os níveis de BH4 foram quantificados usando cromatografia líquida de alta resolução com detecção eletroquímica, e os de neopterina por ELISA. Os valores de GSH e TBA-RS foram quantificados por fluorimetria (para detalhes ver M&M). A razão NLR e a PLR foram calculados pela divisão do valor total de células/uL de neutrófilos para NLR e plaquetas para PLR pelo valor total de células/uL de linfócitos no sangue e determinadas por citometria de fluxo e impedância. Os níveis de PCR foram quantificados por turbidimetria.. A curva ROC para os níveis de BH4 na urina é mostrada em azul, para os níveis de neopterina no plasma em laranja, para os níveis de GSH em verde, para os níveis de TBA-RS em vermelho escuro, para NLR em vermelho, para PLR em amarelo e PCR em rosa. A linha pontilhada em preto é a referência e exibe a capacidade discriminatória não melhor que o acaso.

Quadro 9. Valores da área baixo da curva (AUC) gerada pela análise da curva característica de operação do receptor (ROC) de biomarcadores para identificação de indivíduos com obesidade 12 meses após a gastroplastia.

Biomarcadores	AUC	Redução da AUC vs momento Pré (%)	Valor de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	IC 95 % inferior - superior	Valor de P
BH4 (urina)	0,58	28,7	0,41 umol/mmol creatinina	58	58	0,44 - 0,73	ns
Neopterina (plasma)	0,37	33,9	4,56 nmol/L	37,5	34,5	0,22 - 0,53	ns
GSH (plasma)	0,71	0,0	2,22 umol/L	68,4	66,7	0,56 - 0,86	**
TBA-RS (plasma)	0,65	24,3	0,88 umol/L	64,3	50	0,45 - 0,85	ns
NLR	0,30	54,7	1,68	35	35	0,14 - 0,46	*
PLR	0,40	29,2	107,9	36,8	36	0,22 - 0,57	ns
PCR	0,49	46,9	1,15 mg/L	50	40,9	0,31 - 0,68	ns

IC= Intervalo de confiança; BH4= Tetrahydrobiopterina; GSH= Glutatona; TBA-RS= Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; NLR= Razão entre neutrófilos por linfócitos; PLR= Razão entre plaquetas por linfócitos; PCR= Proteína C reativa; ns= não significativo; *P < 0,05; **P < 0,01. Pós bariátrica vs Saudáveis; teste de ROC.

Finalmente, foi aplicada ao conjunto de dados gerado a análise a regressão multivariada para identificar se existe um componente fisiopatológico dos níveis urinários e/ou plasmáticos de BH4 com a perda do excesso de peso e com a normalização dos marcadores de inflamação e de estresse oxidativo. No entanto, não foram encontrados resultados significativos.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho, identificamos que os indivíduos com obesidade e elegíveis a cirurgia bariátrica apresentaram alterações no metabolismo da BH4, com aumento das concentrações plasmáticas de neopterinina e redução das concentrações urinárias de BH4. Além disso, a redução de peso e normalização de parâmetros metabólicos obtido após 12 meses da cirurgia bariátrica nestes indivíduos promoveu a normalização das concentrações destes biomarcadores do metabolismo da BH4.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que os níveis de BH4 se encontraram diminuídos no líquido cefalorraquidiano (CSF) de animais submetidos a um modelo crônico de hiperglicemia com acúmulo tecidual e plasmático de marcadores de inflamação e de estresse oxidativo (REMOR et al., 2019). Embora nesse modelo experimental não foi induzida a obesidade, foram reproduzidos alguns marcadores de disfunção metabólica como o aumento da hiperglicemia e de estresse oxidativo, pela mensuração de TBA-RS e redução de tióis não proteicos, que incluem a GSH, biomarcadores que também se encontraram alterados no grupo de indivíduos com obesidade aqui analisados. Esse estudo pré-clínico demonstrou que a sinalização no sistema nervoso central se encontrou alterada, comprometendo vias clássicas de neuroproteção e de proliferação celular. Assim, a queda dos níveis de BH4 no CSF pode sugerir uma falha na regulação dos neurônios que regulam o apetite. Neste contexto, foi também demonstrado que a BH4 é necessária nos neurônios que produzem o neuropeptídeo F (NPF), um mediador que regula a ingestão de alimentos em *Drosóphila melanogaster* (KIM et al., 2017). Os autores mostraram que a perda das proteínas envolvidas na produção de BH4, incluindo a SPR no corpo gorduroso, ou a queda dos níveis de BH4 nos neurônios, levou ao aumento da liberação de NPF e aumento do consumo alimentar. Por outro lado, a normalização das concentrações de BH4 neuronais reduziu a liberação de NPF e diminuiu o consumo de alimentos. Assim, parece existir uma íntima relação entre produção de BH4 e desenvolvimento de obesidade.

Outros estudos experimentais têm também demonstrado que a deficiência na síntese de BH4 no TAM está associada ao desenvolvimento de obesidade em roedores (OGURI et al., 2017). Os animais com deficiência em BH4 no TAM,

camundongos Hph-1, exibiram obesidade, adiposidade, intolerância à glicose, resistência à insulina, e função do TAM prejudicada. A recuperação dos níveis intracelulares de BH4 resultou em melhora nos parâmetros metabólicos sistêmicos sugerindo que os níveis de BH4 têm um papel crítico na regulação do metabolismo sistêmico. Estes grupos de resultados pré-clínicos sugerem que os valores reduzidos de BH4 encontrados neste estudo podem não ser exclusivamente um marcador da presença de obesidade, mas também estar envolvida no aumento do apetite, ou na regulação do metabolismo. Esta hipótese encontra suporte também nos valores aumentados do conteúdo da enzima SPR (SPR produz novas moléculas de BH4 de forma econômica através da via da salvação) no TAV quando comparado com o TAS, provavelmente como um mecanismo compensatório à baixa biodisponibilidade de BH4. Além dos níveis reduzidos de BH4 encontrados neste estudo, também observamos um aumento significativo nos níveis da razão entre GSH e GSSG, uma relação que indica o equilíbrio entre a forma reduzida e oxidada deste antioxidante, no TAV em comparação com o TAS. Essa diferença pode estar relacionada à maior carga inflamatória e estresse oxidativo presentes no tecido adiposo visceral. O aumento de GSH pode ser uma resposta adaptativa para neutralizar os radicais livres e proteger o tecido adiposo visceral contra danos oxidativos.

A BH4 tem sido demonstrada ser uma molécula com propriedades antioxidantes por ser um composto com características redutoras (KIRSCH et al., 2003). Seu papel como cofator enzimático se baseia na redução de metais catalíticos como o ferro mediante a entrega de elétrons (HIGGINS; GROSS, 2010). Além disso, estudos experimentais evidenciaram a capacidade da BH4 em neutralizar ERN e ERO, como ânion superóxido, radical hidroxila, e peroxinitrito (MILSTIEN; KATUSIC, 1999; PATEL et al., 2002). A avaliação desta capacidade redutora foi realizada em um sistema experimental que empregou reações químicas controladas, onde diferentes oxidantes foram adicionados em concentrações crescentes a uma solução de BH4. Por ter características redutoras a BH4 também se torna susceptível de oxidação por ERO, afetando sua disponibilidade intracelular como cofator enzimático. Neste contexto, é sabido que o produto da oxidação da BH4, a BH2, compromete a síntese de NO por promover um desacople da transferência de elétrons entre os dímeros da

enzima biosintética óxido nítrico sintase induzível (NOSi), o que pode sustentar o desequilíbrio redox intracelular (LANDMESSER et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa e outros têm demonstrado que a queda nas concentrações de BH4 facilitam o desenvolvimento de estresse oxidativo, principalmente por aumentar a produção de ERO (CRONIN et al., 2018; OGURI et al., 2017; REMOR et al., 2019), e que a molécula é necessária para o funcionamento do metabolismo energético mitocondrial, e para a correta formação de NO em diversos sistemas experimentais (CRONIN et al., 2018; LATINI et al., 2018).

Sabe-se também que a deficiência em BH4 compromete a atividade vascular e como consequência o tônus da aorta em roedores, facilitando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma comorbidade associada à obesidade (BAKER; MILSTIEN; KATUSIC, 2001; HUANG et al., 2000; MILSTIEN; KATUSIC, 1999). Esses efeitos foram restaurados quando foram introduzidos no sistema experimental antioxidantes, sugerindo que o efeito comprometido pela perda das concentrações de BH4 pode estar relacionado com a regulação do sistema de defesas intracelulares. Neste cenário, onde a disponibilidade de BH4 está comprometida, pode ser esperado que os valores de marcadores de estresse oxidativo se encontrem também modificados. Essa hipótese está de acordo com a redução nos níveis do antioxidante GSH e o aumento dos níveis de peroxidação lipídica, ambos numa direção mais pró-oxidante, observados neste trabalho no plasma de indivíduos com obesidade.

Deve ser salientado que deficiências para atingir os corretos níveis intracelulares de BH4 têm sido relacionadas com a indução de ferroptose, um tipo de morte celular regulada por ferro, peroxidação lipídica, e GSH (DIXON et al., 2012). Tem sido descrito que este mecanismo de morte pode ser inibido em células com ativa produção de BH4, o que preveniu a oxidação lipídica e o consumo de GSH em fibroblastos murinos e humanos (KRAFT et al., 2020). Em concordância, no presente trabalho foi evidenciado que a presença de obesidade se caracterizou por um aumento significativo de estresse oxidativo, com níveis de GSH reduzidos e com um aumento do biomarcador de peroxidação lipídica, o TBA-RS, no plasma dos indivíduos com obesidade. Embora a quantificação destes dois biomarcadores não seja suficiente para determinar a magnitude do estresse oxidativo nos indivíduos com obesidade, esses achados corroboram com a presença do estado pró-oxidativo que

poderia contribuir também para a redução dos níveis circulantes de BH4 e, conseqüentemente, para a excreção reduzida desse biomarcador na urina.

Os resultados obtidos neste trabalho que demonstram a ativação da via *de novo* da BH4 com acúmulo e secreção de neopterinina estão de acordo com numerosos trabalhos na literatura que tem mostrado o aumento de neopterinina no plasma de indivíduos com IMC elevado, incluindo indivíduos com obesidade grau 2 e 3 como os participantes incluídos neste estudo (AVCI; AVCI, 2018; LENOIR DA SILVA et al., 2017).

Nosso grupo também demonstrou previamente o aumento das concentrações deste metabólito no plasma de indivíduos com obesidade grau 3 quando comparados com indivíduos com sobrepeso (LENOIR DA SILVA et al., 2017). Esse trabalho prévio mostrou valores de neopterinina plasmática maiores que os apresentados neste estudo. Isso possivelmente está relacionado com dois fatores principais, (1) o grupo experimental deste estudo estar conformado por indivíduos com obesidade grau 3 e grau 2 e com um IMC menor (o estudo prévio mostrou valores de IMC de 50 ± 8), e (2) os participantes que foram submetidos a gastroplastia passaram por um período de dieta pré-cirúrgica, que pode ter reduzido o estado inflamatório, e, portanto, os níveis de neopterinina no plasma. Por outro lado, indivíduos com obesidade que seria categorizada como de grau 1 (IMC= 35 ± 5) apresentaram níveis aumentados de neopterinina plasmática quando comparados com um grupo controle, mas em torno de 65 % menores que os valores apresentados pelos participantes do presente estudo [(AVCI; AVCI, 2018) mostrou valores do metabólito entre 5,41 - 11,64 nmol/L]. Estes dados sugerem que a neopterinina plasmática poderia ser um classificador das diferentes categorias da obesidade. Alguns estudos que obtiveram correlação significativa entre a neopterinina e IMC ou percentual de gordura, mostraram que as correlações foram fracas, e todas com $r < 0,5$ (BOZDEMIR et al., 2006; LEDOCHOWSKI et al., 1999). A análise detalhada desses estudos mostrou que as coortes estiveram sempre compostas por participantes com ICM normal ou levemente elevado (BOZDEMIR et al., 2006; LEDOCHOWSKI et al., 1999; THEOFYLAKTOPOULOU et al., 2013a). Isso pode ter sido também um fator que comprometeu o poder discriminador das concentrações de neopterinina.

Os níveis desta molécula têm sido também usados para identificar outras doenças com inflamação crônica, incluindo as doenças cardiovasculares, a resistência à insulina, e o diabetes mellitus tipo 2, associados ou não a obesidade (NEDEVA et al., 2021). Por exemplo, foi demonstrado que os níveis de neopterin no sangue correlacionam fortemente com os de dimetilarginina (correlação de $r = 0.95$), um biomarcador de disfunção endotelial (AVCI et al., 2020). Também foi demonstrado que valores maiores que 7 nmol/L de neopterin aumentam em 3 vezes as chances de desenvolver um evento agudo isquêmico (AVANZAS et al., 2005). No entanto, as cortes de estes dois estudos apresentaram valores normais de ICM, ou levemente aumentado e não mostraram correlação com os valores desse índice. Assim, estes dados dão maior suporte a que neopterin plasmática *per se* possa identificar melhor os diferentes graus inflamatórios relacionados com a obesidade do que o IMC.

Como concluído num trabalho de meta-análise recentemente publicado (VISARIA; SETOGUCHI, 2023), o risco de mortalidade por todas as causas se mostrou elevado em 21 a 108 % entre os participantes do estudo que apresentaram $IMC \geq 30$. No entanto, os pesquisadores acompanharam a sobrevivência de um grupo etnicamente diverso de cerca de 500.000 adultos americanos por até 20 anos e descobriram que ter um IMC entre 25 e 29,9, classificado pela OMS como sobrepeso, está associado a um risco de morte 5 a 7 % menor do que ter um na faixa considerada saudável. Esses dados sugerem que o limite no qual o peso mais alto pode ser um risco à saúde não é preciso, e provavelmente a distribuição de gordura corporal seja um parâmetro mais assertivo. Dando suporte a essas afirmações, tem sido demonstrado que os níveis de leptina sanguínea, uma citocina liberada pelo tecido adiposo em resposta a sua expansão, correlacionaram positivamente com as concentrações de neopterin, associando o acúmulo de tecido adiposo com a metainflamação (ARSLAN et al., 2013).

Embora a participação da BH4 no desenvolvimento de obesidade não tenha sido comprovada neste estudo, os resultados da análise da curva ROC mostraram que os níveis urinários de BH4 apresentaram características de sensibilidade e especificidade similares aos biomarcadores clássicos do estado inflamatório sistêmico na obesidade, permitindo a identificação de um grupo afetado por obesidade de um grupo de voluntários saudáveis.

A curva ROC é uma ferramenta estatística amplamente utilizada para avaliar a eficácia de um biomarcador na discriminação de dois grupos, geralmente um grupo de indivíduos com uma determinada condição e outro grupo de indivíduos saudáveis. Essa análise permite determinar a sensibilidade e especificidade de um biomarcador em diferentes pontos de corte, além de calcular a *AUC*, que é um indicador da capacidade ou sensibilidade do biomarcador em distinguir corretamente entre os grupos (MICHAEL; TIAN; GHEBREMICHAEL, 2019).

Este estudo mostra pela primeira vez o poder de discriminação de dois metabólitos do metabolismo de BH4, a BH4 e a neopterina, entre indivíduos saudáveis e afetados por obesidade. A análise das curvas ROC revelaram que os níveis urinários de BH4 demonstraram características de sensibilidade e especificidade semelhantes aos biomarcadores clássicos do estado inflamatório sistêmico na obesidade. Isso indica que a mensuração dos níveis urinários de BH4 pode ser útil na identificação de indivíduos afetados pela obesidade em comparação a um grupo de indivíduos saudáveis.

Até o momento, apenas um único estudo investigou a capacidade preditiva da BH4 em identificar condições patológicas, mais especificamente na nefropatia diabética (DENG et al., 2022). Neste estudo, foram avaliados 142 participantes diagnosticados com essa doença, e os resultados mostraram uma *AUC* 0,76, com sensibilidade de 69,1 % e especificidade de 73 % para identificar indivíduos com relação albumina/creatinina acima de 30, indicando a ocorrência de complicações renais. Vale ressaltar que a capacidade preditiva da BH4 urinária em identificar indivíduos com obesidade encontrada neste estudo foi superior àquela encontrada no estudo mencionado, porém, deve-se considerar que as medições de BH4 nos indivíduos com nefropatia foi realizada no plasma. Outro aspecto semelhante entre os estudos é que os valores de BH4 nos fluidos biológicos se apresentaram reduzidos nos grupos com a doença, reforçando a associação de uma baixa disponibilidade da BH4 em doenças metabólicas.

Embora os valores plasmáticos de neopterina neste estudo não tenham discriminado indivíduos com obesidade de indivíduos saudáveis com alta sensibilidade, outros marcadores inflamatórios, como o PCR e as razões entre NLR e PLR, se mostraram elevados e estão de acordo com o estado de metainflamação já

descrita para indivíduos afetados por obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006). A razão entre NLR e PLR são conhecidos indicadores da ativação do sistema imunológico. Em adolescentes com obesidade, os níveis de NLR se encontraram significativamente aumentados quando comparados com indivíduos saudáveis (AYDIN, 2015). Em contrapartida, um estudo recente mostrou que o valor da NLR se correlacionou positivamente com a presença e severidade de síndrome metabólica em adultos, porém, não em crianças e adolescentes (MARRA et al., 2023). Já os dados da literatura sobre valores da PLR em indivíduos com obesidade mostram que este marcador inflamatório também está aumentado em indivíduos com obesidade grave (ERDAL; İNANIR, 2019). Além disso, a obesidade foi correlacionada com um aumento da contagem total de plaquetas e aumento do risco de eventos de tromboembolismo venoso (PURDY; SHATZEL, 2021).

Neste trabalho foi demonstrado que os níveis de BH4 urinários classificaram indivíduos com obesidade de forma mais eficiente que os valores de marcadores inflamatórios NLR e PLR, e de forma similar ao de PCR, e considerando a estreita relação de BH4 com peroxidação lipídica, os valores de TBA-RS mostraram uma *AUC* superior ao de BH4. É importante ressaltar que embora a curva ROC do TBA-RS tenha apresentado uma sensibilidade discriminatória maior do que a da BH4, existem considerações práticas a serem feitas na aplicação clínica potencial desse marcador. A análise de TBA-RS é trabalhosa e requer técnicas laboratoriais específicas, o que pode limitar sua aplicabilidade em larga escala. Por outro lado, a mensuração urinária de BH4 pode ser realizada de maneira mais prática com o recente desenvolvimento de kits comerciais. Além disso, a coleta de urina é um procedimento menos invasivo em comparação a coleta de sangue, facilitando a aplicabilidade deste teste em clínicas.

A intervenção cirúrgica realizada nos participantes deste estudo provocou a perda de peso em $39,7 \pm 9,7$ kg, correspondendo a $72,7 \pm 14,8$ % do excesso de peso. Com relação ao IMC 12 meses após a gastroplastia, se observou que aproximadamente 50 % dos participantes alterou o IMC para a categoria de sobrepeso, e alguns foram classificados como obesidade grau 1 e 2. No entanto, nenhum participante atingiu valores inferiores a 25 kg/m^2 .

Sabe-se que a cirurgia bariátrica é o método mais efetivo de perda de peso em indivíduos com obesidade grave. A gastroplastia provoca redução de mortalidade, de risco cardiovascular, de incidência de câncer, e melhora as comorbidades associadas ao peso (COURCOULAS, 2013), com redução de marcadores pró-inflamatórios no decorrer do acompanhamento pós-operatório [para uma revisão, ver: (FRIKKE-SCHMIDT et al., 2016)].

Este estudo mostrou que o efeito da gastroplastia sobre a redução do peso atenuou o nível dos marcadores metabólicos, de estresse oxidativo, e de inflamação mensurados no sangue dos participantes. Esses dados estiveram de acordo com a normalização dos valores de BH4 e de neopterinina, sugerindo que a intervenção cirúrgica pode ser monitorada mediante a determinação dos níveis destas pterinas em fluidos biológicos, incluindo a urina que é um material de fácil acesso com mínima invasividade. De fato, a capacidade dos níveis de BH4 de rastrear indivíduos com obesidade grave foi também perdida quando mensurada 12 meses após a gastroplastia.

No caso dos níveis plasmáticos de neopterinina, foi observada uma correlação significativa com a variação de IMC e com a variação da massa corporal. Embora essas correlações não foram muito fortes ($r= 0,45$), os parâmetros clássicos usados para avaliar inflamação na obesidade não apresentarão correlação significativa. Isso sugere que possivelmente o aumento do tamanho amostral (Pré versus Pós) permitirá identificar o efeito da gastroplastia sobre o componente inflamatório da doença de forma mais sensível do que os níveis de PCR, ou os valores de NLR ou PLR. No entanto, neste trabalho foi observada uma melhora no estado inflamatório geral nos participantes, como tem sido extensamente descrito na literatura (ILLÁN-GÓMEZ et al., 2012; PARDINA et al., 2012).

A redução das concentrações plasmáticas de neopterinina induzida pela gastroplastia não corresponde a um achado frequente na literatura, e ainda os disponíveis são contraditórios. Em estudos onde a gastroplastia provocou a redução dos valores de IMC de forma similar à demonstrada neste trabalho, não foram evidenciadas mudanças significativas nos níveis de neopterinina no plasma (AASBRENN; FARUP; VIDEM, 2019; BRANDACHER et al., 2006; CHRISTENSEN et al., 2018). Esses estudos mostraram que mediadores inflamatórios que regulam a

produção de neopterinina, como TNF- α e INF- γ , não foram modulados negativamente após a perda de massa corporal, e seriam a causa para a falta de efeito sobre os níveis desta pterina. Embora nosso trabalho não mensurou citocinas pró-inflamatórias, discorda com todos os trabalhos disponíveis na comunidade científica sobre a produção e secreção de neopterinina após a gastroplastia. As razões para tais discordâncias são desconhecidas, mas podem estar relacionadas a diferenças nas populações estudadas, as intervenções, tipo de dieta, níveis de estrogênios circulantes, entre outros.

Condizente com a melhora nos parâmetros marcadores de inflamação, o presente trabalho também evidenciou melhora no estado oxidativo sistêmico. Esses dados estão de acordo com um trabalho realizado num grupo de indivíduos do sexo feminino com características antropométricas similares ao grupo com obesidade aqui estudado, onde também foi demonstrado aumento de tióis livres, dentre eles a GSH, e redução dos níveis de TBA-RS (HORN et al., 2017). Como comentado previamente neste trabalho, essa normalização do estresse oxidativo pode ter contribuído para recuperar os valores urinários de BH4 que foram apresentados pelo grupo de voluntários sadios. A pouca biodisponibilidade de BH4 nesse cenário de metainflamação, pode também explicar valores aumentados de fenilalanina no sangue de indivíduos afetados por obesidade descritos na literatura (SWIERCZYNSKI et al., 2009). A fenilalanina é um aminoácido metabolizado principalmente no fígado pela fenilalanina hidroxilase, uma enzima que depende exclusivamente de BH4 intracelular como cofator obrigatório (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011).

Finalmente, este é o primeiro trabalho que identificou os níveis de BH4 urinários como um biomarcador que permite classificar indivíduos com obesidade, bem como os efeitos positivos promovidos pela cirurgia bariátrica sobre parâmetros metabólicos, inflamatórios, e de estresse oxidativo. Este trabalho demonstrou que para cada kg de peso perdido houve um aumento de 4,5 nmol de BH4 por mmol de creatinina (mediana= 4,5; IIQ= 1,5 – 8,1).

8 CONCLUSÃO

- Os resultados deste trabalho indicam que o metabolismo da BH4 se encontra alterado em indivíduos com obesidade, havendo um aumento das concentrações plasmáticas de neopterinina e redução dos níveis urinários de BH4
- A mensuração dos valores urinários de BH4 se mostrou eficiente na identificação dos indivíduos com obesidade e elegíveis à gastroplastia.
- Neste trabalho, foi evidenciado o efeito benéfico da cirurgia bariátrica na redução do estado pró-inflamatório e pró-oxidativo em indivíduos com obesidade grave
- A melhora dos parâmetros antropométricos, bioquímicos-clínicos, inflamatórios e de estresse oxidativo refletiu-se na redução dos níveis plasmáticos de neopterinina e aumento dos níveis urinários de BH4

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- O estudo carece de informações sobre a distribuição de gordura corporal e a circunferência abdominal dos indivíduos, o que poderiam dar informações mais sensíveis sobre a relação dos níveis das pterinas BH4 e neopterinina com a perda de TA promovido pela gastroplastia.
- Os participantes deste estudo foram submetidos a uma redução de peso prévia à cirurgia bariátrica como parte do protocolo clínico. Essa redução de peso é necessária devido aos riscos associados ao procedimento cirúrgico. No entanto, não pode ser afirmado se essa redução de peso prévia poderia ter influenciado o metabolismo da BH4 ou os parâmetros de estresse oxidativo analisados.
- A coleta de amostras de TA é um procedimento invasivo, o que impossibilitou a realização de análises de TAS e TAV em indivíduos saudáveis, bem como, nos indivíduos após um ano da intervenção cirúrgica. Essas análises poderiam fornecer uma comparação mais abrangente entre os diferentes grupos de estudo.
- Outro fator limitante está relacionado à falta de informações específicas sobre o comportamento dos indivíduos após a cirurgia bariátrica, como a prática regular de atividade física. A inclusão dessas informações poderia fornecer uma visão mais abrangente sobre os fatores que podem influenciar o metabolismo da BH4 e os marcadores inflamatórios.
- Este estudo foi desenvolvido durante a pandemia global da COVID-19, fato que comprometeu a realização das cirurgias no HU/UFSC, bem como a liberação de recursos para aquisição de material especializado, como kits comerciais para a determinação das concentrações de citocinas inflamatórias. No entanto, o material foi coletado e será analisado num futuro próximo.

Apesar dessas limitações, os resultados deste estudo fornecem dados inéditos para uma base sólida para a ampliação da pesquisa e do conhecimento sobre o metabolismo da BH4 na obesidade e suas complicações. Essas descobertas podem abrir caminho para a investigação de novas estratégias terapêuticas direcionadas ao metabolismo da BH4, visando modular a resposta inflamatória na obesidade.

10 PERSPECTIVAS

As perspectivas para este trabalho incluem a ampliação do tamanho da amostra para aumentar o poder estatístico e a representatividade dos resultados. Também, seria essencial a mensuração dos níveis plasmáticos de BH4 e os níveis urinários de neopterinina, não apenas para os valores nesses fluidos biológicos, mas também para avaliar a razão entre esses biomarcadores no mesmo fluido, dando uma melhor ideia do fluxo de síntese da BH4 e seu consumo.

Também, poderiam ser adicionadas a esta pesquisa a avaliação dos níveis de BH4 e neopterinina diretamente no TAV e TAS. Apesar do desafio de conseguir realizar este ensaio, as informações poderão acrescentar muito sobre como o estado inflamatório do tecido adiposo influencia o metabolismo da BH4.

Outro fator que poderia contribuir muito com futuras pesquisas é adicionar a mensuração de citocinas pró e anti-inflamatórias no plasma, tecido adiposo e também em isolado de células imunes do sangue dos indivíduos com obesidade. Análises de expressão de genes do metabolismo da BH4 no tecido adiposo destes indivíduos também poderia abrir novas perspectivas sobre sua regulação genética.

Essas perspectivas podem contribuir para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na obesidade e fornecer subsídios para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais efetivas para o manejo da obesidade e de suas comorbidades.

11 REFERÊNCIAS

AASBRENN, M.; FARUP, P. G.; VIDEM, V. Changes in C-reactive protein, neopterin and lactoferrin differ after conservative and surgical weight loss in individuals with morbid obesity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17695, 27 nov. 2019.

ALTMAN, N.; KRZYWINSKI, M. Association, correlation and causation. **Nature Methods**, v. 12, n. 10, p. 899–900, 29 out. 2015.

ARSLAN, N. et al. Evaluation of serum neopterin levels and its relationship with adipokines in pediatric obesity-related nonalcoholic fatty liver disease and healthy adolescents. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 11–12, 1 jan. 2013.

AVANZAS, P. et al. Elevated serum neopterin predicts future adverse cardiac events in patients with chronic stable angina pectoris. **European Heart Journal**, v. 26, n. 5, p. 457–463, 1 mar. 2005.

AVCI, E. et al. Crucial markers showing the risk of coronary artery disease in obesity: ADMA and neopterin. **Journal of medical biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 452–459, 2 out. 2020.

AVCI, G. A.; AVCI, E. Neopterin, a marker of cellular immunity and oxidative stress in obese individuals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 120, p. S148, maio 2018.

AYDIN, M. Neutrophil lymphocyte ratio in obese adolescents. **Northern Clinics of Istanbul**, 2015.

BAKER, T. A.; MILSTIEN, S.; KATUSIC, Z. S. Effect of Vitamin C on the Availability of Tetrahydrobiopterin in Human Endothelial Cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 333–338, mar. 2001.

BENDALL, J. K. et al. Tetrahydrobiopterin in Cardiovascular Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 18, p. 3040–3077, 20 jun. 2014.

BIGORNIA, S. J. et al. Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. **Nutrition & Diabetes**, v. 2, n. 3, p. e30–e30, 5 mar. 2012.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 27 maio 2019.

BOZDEMIR, A. E. et al. C-Reactive protein and neopterin levels in healthy non-obese adults. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 44, n. 3, 1 jan. 2006.

BRANDACHER, G. et al. Bariatric Surgery Cannot Prevent Tryptophan Depletion Due to Chronic Immune Activation in Morbidly Obese Patients. **Obesity Surgery**, v. 16, n. 5, p. 541–548, 1 maio 2006.

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 213–221, 6 fev. 2018.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. 2004.

CASTOLDI, A. et al. The Macrophage Switch in Obesity Development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, 5 jan. 2016.

CHANDARANA, H. et al. Visceral adipose tissue in patients with COVID-19: risk stratification for severity. **Abdominal Radiology**, v. 46, n. 2, p. 818–825, 3 fev. 2021.

CHRISTENSEN, M. H. E. et al. Inflammatory markers, the tryptophan-kynurenine pathway, and vitamin B status after bariatric surgery. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192169, 5 fev. 2018.

CORNIER, M.-A. A review of current guidelines for the treatment of obesity. **The American Journal of Managed Care**, v. 28, n. Suppl 15, p. S288–S296, 1 dez. 2022.

COURCOULAS, A. P. Weight Change and Health Outcomes at 3 Years After Bariatric Surgery Among Individuals With Severe Obesity. **JAMA**, 4 nov. 2013.

CRONIN, S. J. F. et al. The metabolite BH4 controls T cell proliferation in autoimmunity and cancer. **Nature**, v. 563, n. 7732, p. 564–568, 7 nov. 2018.

DEN HARTIGH, L. J. et al. Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 3, p. 466–475, 1 mar. 2017.

DENG, C. et al. Newly established LC-MS/MS method for measurement of plasma BH4 as a predictive biomarker for kidney injury in diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 178, p. 1–6, jan. 2022.

DENG, T. et al. Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 411–422, 5 mar. 2013.

DHURANDHAR, N. V. What is obesity?: Obesity Musings. **International journal of obesity (2005)**, v. 46, n. 6, p. 1081–1082, 14 jun. 2022.

DIXON, S. J. et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 1060–1072, maio 2012.

EICHWALD, T. et al. Tetrahydrobiopterin: Beyond Its Traditional Role as a Cofactor. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1037, 3 maio 2023.

ERDAL, E.; İNANIR, M. Platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) and Plateletcrit (PCT) in young patients with morbid obesity. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 65, n. 9, p. 1182–1187, set. 2019.

FASSHAUER, M.; BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 461–470, 26 jul. 2015.

FDA-NIH BIOMARKER WORKING GROUP. **BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource**. [s.l: s.n.].

FIGUEIREDO, B. Q. DE et al. O enorme custo da obesidade para a saúde pública brasileira: Uma breve revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e33610918276, 28 jul. 2021.

FOXTON, R. H.; LAND, J. M.; HEALES, S. J. R. Tetrahydrobiopterin Availability in Parkinson's and Alzheimer's Disease; Potential Pathogenic Mechanisms. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 4–5, p. 751–756, 22 mar. 2007.

FRIKKE-SCHMIDT, H. et al. Does bariatric surgery improve adipose tissue function? **Obesity Reviews**, v. 17, n. 9, p. 795–809, set. 2016.

FUCHS, D. et al. Neopterin, Interferon- γ , and Immunodeficiency States. Em: **Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993. p. 715–718.

GARIBALLA, S. et al. Total adiponectin in overweight and obese subjects and its response to visceral fat loss. **BMC Endocrine Disorders**, v. 19, n. 1, p. 55, 3 dez. 2019.

GEWALTIG, M. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, v. 55, n. 2, p. 250–260, 1 ago. 2002.

GHABEN, A. L.; SCHERER, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 242–258, 4 abr. 2019.

GHIASSI, S.; MORTON, J. M. Safety and Efficacy of Bariatric and Metabolic Surgery. **Current Obesity Reports**, v. 9, n. 2, p. 159–164, 6 jun. 2020.

GONZALEZ-CAMPOY, J. M. Hormonal Regulation of Energy Balance and Energy Stores. Em: **Bariatric Endocrinology**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 37–57.

GRANÉR, M. et al. Cardiac Steatosis Associates With Visceral Obesity in Nondiabetic Obese Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1189–1197, 1 mar. 2013.

HIGGINS, C. E.; GROSS, S. S. Tetrahydrobiopterin. Em: **Nitric Oxide**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 169–209.

HIRAKAWA, H. et al. Expression Analysis of the Aldo-Keto Reductases Involved in the Novel Biosynthetic Pathway of Tetrahydrobiopterin in Human and Mouse Tissues. **Journal of Biochemistry**, v. 146, n. 1, p. 51–60, 1 jul. 2009.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–226, jul. 1976.

HORN, R. C. et al. Obesity, bariatric surgery and oxidative stress. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 3, p. 229–235, mar. 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 13 dez. 2006.

HUANG, A. et al. Ascorbic Acid Enhances Endothelial Nitric-oxide Synthase Activity by Increasing Intracellular Tetrahydrobiopterin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17399–17406, jun. 2000.

IBGE; BRASIL. **Pesquisa Nacional de Saúde 2019: atenção primária à saúde e informações antropométricas**. 1. ed. Rio de Janeiro: Centro de Documentação e Disseminação de Informações, 2020.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 1, p. 11–18, jan. 2010.

ILES, K. E.; FORMAN, H. J. Macrophage Signaling and Respiratory Burst. **Immunologic Research**, v. 26, n. 1–3, p. 095–106, 26 jan. 2002.

ILLÁN-GÓMEZ, F. et al. Obesity and Inflammation: Change in Adiponectin, C-Reactive Protein, Tumour Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 After Bariatric Surgery. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 6, p. 950–955, 13 jun. 2012.

ITOH, M. et al. Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, jun. 2004.

KIM, D. H. et al. A fat-derived metabolite regulates a peptidergic feeding circuit in *Drosophila*. **PLoS Biology**, v. 15, n. 3, 28 mar. 2017.

KIRSCH, M. et al. The Autoxidation of Tetrahydrobiopterin Revisited. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24481–24490, jul. 2003.

KRAFT, V. A. N. et al. GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. **ACS Central Science**, v. 6, n. 1, p. 41–53, 22 jan. 2020.

KRAUS, V. B. Biomarkers as drug development tools: discovery, validation, qualification and use. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 6, p. 354–362, 14 jun. 2018.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 8, p. 1201–1209, 15 abr. 2003.

LATINI, A. et al. Tetrahydrobiopterin improves hippocampal nitric oxide-linked long-term memory. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 1–2, p. 104–111, 1 set. 2018.

LATREMOLIERE, A. et al. Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. **Neuron**, v. 86, n. 6, p. 1393–1406, 17 jun. 2015.

LEDOCHOWSKI, M. et al. Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations. **Clinica Chimica Acta**, v. 282, n. 1–2, p. 115–123, abr. 1999.

LEHR, S.; HARTWIG, S.; SELL, H. Adipokines: A treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 6, n. 1–2, p. 91–101, jan. 2012.

LENOIR DA SILVA, T. et al. Blood advanced glycation end products and biomarkers of inflammation in class III obese Brazilian subjects. **Integrative Obesity and Diabetes**, v. 3, n. 2, 2017.

LENZ, M. et al. Adipose tissue in health and disease through the lens of its building blocks. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10433, 26 dez. 2020.

LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 6 set. 2021.

LOOS, R. J. F.; YEO, G. S. H. The genetics of obesity: from discovery to biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 2, p. 120–133, 23 fev. 2022.

LÓPEZ-TABOADA, I.; GONZÁLEZ-PARDO, H.; CONEJO, N. M. Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. **Frontiers in Psychology**, v. 11, 23 nov. 2020.

MARRA, A. et al. The neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) positively correlates with the presence and severity of metabolic syndrome in obese adults, but not in obese children/adolescents. **BMC Endocrine Disorders**, v. 23, n. 1, p. 121, 26 maio 2023.

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 378–400, 26 dez. 2014.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595–603, nov. 1999.

MCLAUGHLIN, T. et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 5–13, 3 jan. 2017.

MICHAEL, H.; TIAN, L.; GHEBREMICHAEL, M. The ROC curve for regularly measured longitudinal biomarkers. **Biostatistics**, v. 20, n. 3, p. 433–451, 1 jul. 2019.

MICHAILIDOU, Z.; GOMEZ-SALAZAR, M.; ALEXAKI, V. I. Innate Immune Cells in the Adipose Tissue in Health and Metabolic Disease. **Journal of Innate Immunity**, v. 14, n. 1, p. 4–30, 2022.

MILSTIEN, S.; KATUSIC, Z. Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 681–684, out. 1999.

MÜLLER, T. D. et al. Anti-obesity drug discovery: advances and challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 3, p. 201–223, 23 mar. 2022.

MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MÜNZBERG, H. Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance. **Annual Review of Physiology**, v. 70, n. 1, p. 537–556, 1 mar. 2008.

NEDEVA, I. et al. Neopterin in the Evolution from Obesity to Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 19, n. 4, p. 249–255, 1 maio 2021.

NGUYEN, N. T.; VARELA, J. E. **Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: State of the art. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology** Nature Publishing Group, , 1 mar. 2017.

NUDEL, J.; SANCHEZ, V. M. Surgical management of obesity. **Metabolism**, v. 92, p. 206–216, 1 mar. 2019.

OGURI, Y. et al. Tetrahydrobiopterin activates brown adipose tissue and regulates systemic energy metabolism. **JCI Insight**, v. 2, n. 9, 4 maio 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OKUNOGBE, A. et al. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for eight countries. **BMJ Global Health**, v. 6, n. 10, p. e006351, 4 out. 2021.

PARDINA, E. et al. Alterations in the Common Pathway of Coagulation During Weight Loss Induced by Gastric Bypass in Severely Obese Patients. **Obesity**, v. 20, n. 5, p. 1048–1056, maio 2012.

PARRA-PERALBO, E.; TALAMILLO, A.; BARRIO, R. Origin and Development of the Adipose Tissue, a Key Organ in Physiology and Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 21 dez. 2021.

PATEL, K. B. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 203–211, fev. 2002.

PURDY, J. C.; SHATZEL, J. J. The hematologic consequences of obesity. **European Journal of Haematology**, v. 106, n. 3, p. 306–319, 13 mar. 2021.

QUAIL, D. F.; DANNENBERG, A. J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 3, p. 139–154, 20 mar. 2019.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p. 633–643, 11 nov. 2017.

REMOR, A. P. et al. Chronic Metabolic Derangement-Induced Cognitive Deficits and Neurotoxicity Are Associated with REST Inactivation. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 1539–1557, 14 mar. 2019.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 432, 30 mar. 2018.

ROSS, R. et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 177–189, 4 mar. 2020.

ROSSI, A. P. et al. Predictors of Ectopic Fat Accumulation in Liver and Pancreas in Obese Men and Women. **Obesity**, v. 19, n. 9, p. 1747–1754, set. 2011.

SCHULZ, E. et al. Nitric Oxide, Tetrahydrobiopterin, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 1115–1126, 1 jun. 2008.

STEFAN, N.; BIRKENFELD, A. L.; SCHULZE, M. B. Global pandemics interconnected — obesity, impaired metabolic health and COVID-19. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 3, p. 135–149, 21 mar. 2021.

SWIERCZYNSKI, J. et al. Serum Phenylalanine Concentration as a Marker of Liver Function in Obese Patients Before and After Bariatric Surgery. **Obesity Surgery**, v. 19, n. 7, p. 883–889, 23 jul. 2009.

TANG, L.; ZHANG, F.; TONG, N. The association of visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue with metabolic risk factors in a large population of Chinese adults. **Clinical Endocrinology**, v. 85, n. 1, p. 46–53, 1 jul. 2016.

TAYLOR, E. B. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. **Clinical Science**, v. 135, n. 6, p. 731–752, 26 mar. 2021.

THEILADE, S. et al. An overview of obesity mechanisms in humans: Endocrine regulation of food intake, eating behaviour and common determinants of body weight. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 23, n. S1, p. 17–35, 23 fev. 2021.

THEOFYLAKTOPOULOU, D. et al. A community-based study on determinants of circulating markers of cellular immune activation and kynurenines: the Hordaland Health Study. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 173, n. 1, p. 121–130, 6 jun. 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, jan. 2007.

VÁSQUEZ-VIVAR, J. et al. Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: Implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 10, p. 1655–1661, 1 out. 2002.

VERBOVEN, K. et al. Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4677, 16 dez. 2018.

VISARIA, A.; SETOGUCHI, S. Body mass index and all-cause mortality in a 21st century U.S. population: A National Health Interview Survey analysis. **PLOS ONE**, v. 18, n. 7, p. e0287218, 5 jul. 2023.

WANG, Q.; WU, H. T Cells in Adipose Tissue: Critical Players in Immunometabolism. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 30 out. 2018.

WEI, C.-C.; CRANE, B. R.; STUEHR, D. J. Tetrahydrobiopterin Radical Enzymology. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 6, p. 2365–2384, 1 jun. 2003.

WERNER, E. R. et al. Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 6, p. 3189–3192, fev. 1990.

WERNER, E. R.; BLAU, N.; THÖNY, B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. 397–414, 15 set. 2011.

WOODWARD, L.; AKOUMIANAKIS, I.; ANTONIADES, C. Unravelling the adiponectin paradox: novel roles of adiponectin in the regulation of cardiovascular disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 22, p. 4007–4020, nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Overweight and obesity**.

WORLD OBESITY FEDERATION. **World Obesity Atlas**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.worldobesity.org/#worldobesityatlas>.

XIAO, L. et al. Large adipocytes function as antigen-presenting cells to activate CD4(+) T cells via upregulating MHCII in obesity. **International journal of obesity (2005)**, v. 40, n. 1, p. 112–20, 7 jan. 2016.

ds