
TEZĂ DE DOCTORAT

Mecanisme epigenetice implicate în chirurgia obezității

Student doctorand: **Ciprian CUCOREANU**

Coordonator de doctorat: **Prof. dr. Constantin CIUCE**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
<i>Capitolul 1: Obezitatea și impactul asupra stării de sănătate</i>	5
1.1 Considerații generale și date epidemiologice	5
1.2 Tipuri de țesut adipos	8
1.3. Cauze și factori de risc asociați obezității	10
1.3.1 Factori non-modificabili	11
1.3.2 Factori modificabili	13
1.4. Implicațiile mecanismelor inflamatorii și epigenetice în fiziopatologia obezității	18
1.4.1. Adipokinele și echilibrul metabolic	19
1.4.2. Rolul sistemului imun	23
1.4.3. Sindromul metabolic	26
1.5 Mecanismele epigenetice și obezitatea	27
1.5.1 Definiție și caracteristici generale	27
1.5.2 Epigenetica în contextul chirurgiei metabolice	29
1.6. Metabolomica – amprentă a obezității la nivel molecular	30
1.6.1 Metabolomica în contextul obezității și al chirurgiei bariatrice	30
1.6.2 Metabolomica, mesaj preliminar al modificărilor epigenetice?	34
<i>Capitolul 2: Chirurgia bariatrică și rolul acesteia în managementul obezității</i>	37
2.1 Scurt istoric al evoluției bariatriciei	37
2.2 Principalele intervenții bariatrice și impactul lor asupra obezității	38
2.2.1 Gastric sleeve	39
2.2.2 By-pass gastric pe ansă în Y a la Roux	39
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	43
Ipoteza de lucru și obiectivele tezei	45
<i>Capitolul 3: Modificări epigenetice și disfuncții moleculare în obezitate: corelarea proteinei C reactive (PCR) și a statusului metilării ADN-ului cu inflamația sistemică</i>	47
3.1 Introducere	27
3.2 Ipoteza de lucru	47
3.3 Materiale și metodă	47
3.3.1 Caracterizarea loturilor de pacienți și analiza parametrilor clinici și de laborator	49
3.3.2 Colectarea probelor de material genetic și extracția acizilor nucleici	50
3.3.3 Metilarea globală a ADN-ului și determinarea 5-mC prin tehnica ELISA	51
3.3.4 Analiza expresiei genice	52
3.3.5 Analiza statistică	53
3.4 Rezultate	53
3.4.1 Parametrii clinici și de laborator	53
3.4.2 Evaluarea statusului de metilare ADN	54
3.4.3 Analiza expresiei genice	55
3.4.4 Evaluarea parametrilor clinici și de laborator în contextul modificărilor epigenetice și genetice	56
3.5 Discuții	60

3.6 Concluzii	64
Capitolul 4: Dinamica moleculelor proinflamatorii și a ligandului 1 al morții celulare programate (PD-L1) la pacienții cu obezitate care au fost supuși operației de gastric sleeve	65
4.1 Introducere	65
4.2 Ipoteza de lucru	67
4.3 Materiale și metodă	68
4.3.1 Selecția și urmărirea loturilor de pacienți	68
4.3.2 Colectarea, procesarea și stocarea probelor pentru analiza moleculară	69
4.3.3 Măsurarea citokinelor proinflamatorii circulante prin testare imunoenzimatică (ELISA)	69
4.3.4 Analiza statistică	70
4.4 Rezultate	70
4.4.1 Parametri clinici și analiza moleculară	70
4.4.2 Analiza multivariată	72
4.4 Discuții	75
4.5 Concluzii	79
Capitolul 5: Caracterizarea profilului metabolic al pacienților cu obezitate înainte și la 3 luni după intervenția de gastric sleeve	81
5.1 Introducere	81
5.2 Ipoteza de lucru	82
5.3 Materiale și metode	82
5.3.1 Selecția și urmărirea lotului de pacienți	82
5.3.2 Reactivi și substanțe chimice utilizate pentru prelucrarea probelor	84
5.3.3 Procesarea probelor	84
5.3.4 Metoda analitică	84
5.3.5 Analiza de date	89
5.4 Rezultate	90
5.4.1 Analiza profilului metabolic obținut în cadrul celor trei grupuri de pacienți	90
5.4.2 Corelații pentru prezicerea răspunsului la terapie, evaluarea statusului inflamator, a celui glicemic, a funcției renale și a îmbunătățirii profilului lipidic	98
5.5 Discuții	99
5.6 Concluzii	104
6. CONCLUZII GENERALE	105
7. ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI	107
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	109

Cuvinte cheie: obezitate, chirurgie metabolică, epigenetică, metabolomică, inflamație

INTRODUCERE

Pe parcursul ultimilor ani, tema obezității a devenit esențială atât în domeniul medicinei și al cercetării, cât și la nivel social.

Obezitatea reprezintă elementul cheie în numeroase patologii și rămâne una dintre cele mai provocatoare probleme de sănătate publică în majoritatea țărilor. Cercetarea orientată spre acest subiect de interes a devenit extrem de dinamică în ultimul deceniu datorită prevalenței în continuă creștere a persoanelor cu exces ponderal, fapt ce relevă necesitatea unui efort continuu, ghidat spre a înțelege mai bine mecanismele care stau la baza patogenezei obezității și a comorbidităților asociate acesteia, precum și spre dezvoltarea de noi metode de prevenție și tratament.

Una dintre cele mai eficiente metode de tratament pentru pierderea în greutate și ameliorarea riscurilor asociate, în special pentru obezitatea de grad III, rămâne chirurgia bariatrică (metabolică). (1) Deși datele din literatură validează superioritatea tratamentului chirurgical al obezității față de metodele terapeutice convenționale (modificarea stilului de viață, dietă, exercițiu fizic, medicație specifică), aceste intervenții se adresează doar unui segment limitat de pacienți și prezintă o heterogenitate importantă în răspunsul la tratament. (2) Din acest motiv, descoperirea de noi mecanisme, noi biomarkeri și noi ținte terapeutice de interes este primordială.

Dincolo de cauzele sale diverse, obezitatea se caracterizează la nivel molecular ca o stare inflamatorie cronică, în care țesutul adipos în exces contribuie la disfuncția adipocitelor. Numeroase studii au stabilit că inflamația cronică din cadrul țesutului adipos este fundamentală pentru disfuncțiile metabolice observate în comorbiditățile asociate obezității (3).

Boală multifactorială, obezitatea este influențată și de interacțiunea dintre predispoziția genetică și expunerea la factorii favorizanți ai obezității. Astfel, modificările epigenetice pot juca un rol cauzator în obezitate prin inducerea expresiei inadecvate sau prin suprimarea genelor și secvențelor reglatoare ale acestora, conducând astfel la dezechilibrele metabolice (4).

Comunitatea științifică se află astăzi în plin proces de evoluție a tehnologiilor omice (genomică, epigenomică, proteomică, transcriptomică, metabolomică), abordare modernă ce oferă posibilitatea unei vederi de ansamblu și a stabilirii posibilităților conexiuni aflate la intersecția unor domenii de cercetare vaste și diferite (genetică, epigenetică, biologie celulară și moleculară, biochimie, specialități medicale, etc.). Călea spre integrarea unor astfel de date, menită să descifreze variabilitatea interindividuală, poate fi răspunsul spre o mai bună alegere a metodelor terapeutice și implicit spre obținerea de rezultate superioare. (5)

Obezitatea este așadar un subiect de actualitate cu perspective multiple și o nevoie de soluții urgente. În consecință, cercetarea care stă la baza acestei teze de doctorat reprezintă o analiză multidisciplinară care îmbină elemente de genetică, epigenetică, studiul molecular al inflamației din obezitate și studii de metabolomică, raportate la actul chirurgical, cu scopul să identifice cei mai reprezentativi biomarkeri și căile metabolice de interes pentru descoperirea unor noi strategii cu utilitate în terapia personalizată a obezității.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stilul de viață contemporan, care de cele mai multe ori presupune asocierea sedentarismului cu un aport energetic exagerat, precum și promovarea socială și culturală a unor astfel de comportamente nesănătoase alcătuiesc condițiile optime pentru creșterea continuă și alarmantă a prevalenței obezității.

Obezitatea se asociază cu un risc ridicat de evenimente cardiovasculare, apariția rezistenței la insulină și a diabetului zaharat de tip 2, a bolilor reumatice și osteo-articulare, anumitor tipuri de cancer, afectarea calității vieții și a statusului psiho-emoțional, apariția unor afecțiuni respiratorii, renale sau cutanate. Complexitatea factorilor determinanți implicați în apariția obezității se reflectă mai ales în dificultatea managementului acesteia. Poate cel mai sugestiv indicator în acest sens este gradul scăzut de complianță al pacienților la tratamentul pe termen lung al obezității. Recăderile multiple și metodele terapeutice existente, care sunt extrem de variate, scot în lumină eficiența limitată și necesitatea de îmbunătățire continuă, raportat la impactul și prevalența în creștere a bolii. Toate aceste date evidențiază importanța unei abordări multidisciplinare și a unei colaborări constante și coordonate pe plan social, educațional, științific și medical, atât pentru prevenția cât și pentru tratamentul eficient al obezității. (6)

Capitolul 1: Obezitatea și impactul asupra stării de sănătate

Obezitatea este o problemă de sănătate complexă. Deși este recunoscută ca boală cronică, aceasta contribuie la agravarea unor patologii deja existente și provoacă apariția altora noi. Obezitatea poate influența aproape toate sistemele organismului producând dezechilibre numeroase. Consecințele obezității asupra indivizilor și societății sunt evidente prin prisma bolilor cronice asociate. Aceste afecțiuni, împreună cu dizabilitățile rezultate, conduc la o diminuare semnificativă a productivității în muncă și utilității individuale generale la nivel de societate (7, 8).

Cauzele obezității derivă, după unii cercetători, din combinația unor factori individuali cu factori socio-culturali (obiceiuri alimentare nesănătoase). Obezitatea are însă și o componentă de și modificările expresiei genelor joacă un rol semnificativ în predispunerea indivizilor la obezitate. Astfel, interesul pentru epigenetică a crescut în mod constant în rândul cercetătorilor, numeroase studii fiind realizate cu scopul de a investiga rolul acesteia în apariția bolilor cronice, inclusiv al obezității. Metilarea ADN-ului continuă să fie cel mai studiat mecanism epigenetic în contextul obezității. Mecanismele epigenetice care reglează expresia genică ar putea explica multiplele beneficii ale intervențiilor chirurgicale bariatrice și ar putea încuraja viitoare cercetări ghidate spre această arie de interes. Studiile efectuate pe gemeni, persoane care coabitează (familii) și persoane adoptate, estimează că ereditatea obezității variază între 40% și 70%. Un profil genetic cu risc ridicat face ca acea persoană să fie mai vulnerabilă în fața unui mediu care contribuie la dezvoltarea acestei afecțiuni. Concluziile cercetărilor sugerează că prezența acestor gene crește riscul de apariție a obezității în

cursul vieții, însă nu determină în mod automat apariția ei. Acest risc moștenit poate fi redus prin alegeri alimentare sănătoase, activitate fizică regulată și evitarea altor factori care pot conduce la obezitate (9).

În ultimele decenii, studii ample s-au concentrat pe înțelegerea caracteristicilor biologice și a variabilității semnificative a obezității precum și a răspunsului la tratamentele existente pentru pierderea în greutate, având ca scop dezvoltarea unor noi abordări terapeutice sistematice și eficiente. Deși progresele actuale în cercetarea pe tema obezității sunt semnificative, rata de creștere a prevalenței obezității se manifestă într-un ritm și mai accelerat. Conform OMS, în anul 2022, peste 2,5 miliarde de adulți erau supraponderali și 890 de milioane, obezi. Aceste cifre însumează 43% din totalul adulților. Tendința globală nu este deloc favorabilă. Comparativ cu situația din 1990, când doar unul din patru adulți era supraponderal, epidemia obezității este în continuă creștere și, conform Atlasului Mondial al Obezității, până în anul 2035, prevalența globală a supraponderalității și obezității va ajunge la 51%. Creșterea îngrijorătoare a numărului de copii supraponderali și obezi evidențiază impactul semnificativ al acestei afecțiuni asupra sănătății la toate vârstele. Datele înregistrate anual privind numărul copiilor cu exces ponderal arată o creștere constantă. Mai mult de 60% dintre copiii care sunt supraponderali înainte de pubertate vor rămâne supraponderali sau vor deveni obezi și la maturitate (10).

Din punct de vedere istoric, dogma centrală a studiului obezității a fost că aceasta reprezintă un dezechilibru energetic: calorii ingerate versus calorii consumate. Urmărind acest model matematic, atunci, în esență, ar trebui ca exercițiile fizice suplimentare și reducerea aportului de alimente să fie eficiente pentru toată lumea. Totuși, realitatea este diferită. Mulți cercetători consideră că fiziopatologia obezității este mult mai complexă (11).

Comunitatea științifică a depus eforturi considerabile direcționate spre elucidarea cât mai detaliată a mecanismelor fiziopatologice ce stau la baza epidemiei obezității. Cu toate acestea, volumul enorm de informație necesar pentru a înțelege și a putea identifica aceste mecanisme precum și a posibilelor lor ținte terapeutice viitoare, poate deveni copleșitor. Integrarea acestor informații în plan clinic și descoperirea interconexiunilor existente reprezintă o adevărată și continuă provocare. Perseverența medicilor și cercetătorilor a condus spre progrese evidente, validate prin apariția de multiple tratamente. În același timp au apărut noi necunoscute care necesită răspuns.

O temă intens cercetată în raport cu obezitatea este cea a inflamației. Țesutul adipos, ca orice altă componentă a organismului, este dinamic, organic, se expansionează și se remodelează în mod constant. Țesutul adipos nu este doar un rezervor de stocare a trigliceridelor, ci studiile au arătat în mod repetat rolul sau metabolic activ, de producător de biomolecule cu funcții multiple. Acești mediatori au fost numiți adipokine. Creșterea în greutate este sinonimă cu expansiunea țesutului adipos și poate avea loc prin mărirea volumului adipocitelor (hipertrofie) și/sau creșterea numărului de adipocite (hiperplazie). În stadiile incipiente ale procesului de creștere ponderală, inflamația apare ca un răspuns fiziologic care ajută la menținerea homeostaziei metabolice și energetice. Totuși, atunci când obezitatea intră în faza sa cronică, hipertrofia adipocitelor duce la o perfuzie tisulară suboptimală și la hipoxie

locală. Hipoxia favorizează moartea adipocitelor și agravează procesul inflamator, generând inflamație locală și sistemică cronică. Secreția de adipokine proinflamatorii este în intimă relație cu procesul de producere de radicali liberi de oxigen și stres oxidativ. Această modelare mediată inflamator a țesutului adipos precipită profund echilibrul metabolic al organismului și conduce la dezvoltarea comorbidităților asociate obezității (12, 13).

O altă abordare în studiul obezității se referă la metabolismul energetic și modalitatea de adaptare a organismului prin mecanismele de consum și stocare a energiei. Până la data curentă nu există o imagine clară asupra cauzalității dezechilibrării balanței energetice. Un nivel crescut de oxidare a grăsimilor, o rată metabolică ridicată, activitatea fizică și activitatea sistemului nervos simpatic sunt considerați factori protectori împotriva creșterii în greutate. Cu toate acestea, nu se înțelege pe deplin modul în care acești factori afectează balanța dintre aportul și consumul de energie. Mecanismele care determină variabilitatea genetică în oxidarea substratului energetic nu sunt complet elucidate, dar ar putea contribui la înțelegerea variabilității interindividuale pronunțate ce face parte din procesul de creștere în greutate, mai ales în contextul stilului de viață modern care are rol determinant în epidemia obezității. În acest sens, amprentarea profilului metabolic înainte și după aplicarea unei metode terapeutice dovedite a fi eficiente atât în ameliorarea statusului ponderal cât și a celui metabolic poate fi extrem de utilă pentru a evidenția căi moleculare sau biomarkeri de interes pentru progresul în cunoașterea și înțelegerea modului de reglare a raportului depozitare/consum de energie.

Metabolomica se referă la analiza produșilor de metabolism (metaboliților) care provin din probele biologice ale pacienților cu diverse afecțiuni, în scopul de a identifica mecanismele fiziopatologice ce pot prezice eventual evoluția bolii. Metabolomica reprezintă așadar o abordare extrem de valoroasă pentru studierea răspunsurilor metabolice în dinamică și a adaptărilor sistemelor biologice la stimuli specifici. Această abordare a fost aplicată pe scară largă în numeroase domenii științifice, având ca scop identificarea amprentelor moleculare ce pot funcționa ca biomarkeri pentru diagnostic și prognoză. Analizele de metabolomică sunt efectuate, de regulă, prin tehnica de rezonanță magnetică nucleară sau prin spectrometrie de masă, în combinație cu diverse metode de separare cromatografică a metaboliților (electroforeză, cromatografia de lichide sau de gaze). Aceste tehnici de detecție eficientizează caracterizarea produșilor de metabolism cu greutate mică moleculară (50-1500Da) din diferite clase (14).

Aplicarea metabolomicii în studiul obezității ar putea îmbunătăți nu doar cunoașterea disfuncțiilor biochimice și de metabolism asociate cu această afecțiune, ci și conștientizarea efectelor intervențiilor terapeutice precum cele bariatrice, la nivel molecular, având potențialul de a oferi o explicație pentru heterogenitatea rezultatelor acestui tip de tratament.

Capitolul 2: Chirurgia bariatrică și rolul acesteia în managementul obezității

Chirurgia bariatrică reprezintă o strategie terapeutică importantă pentru facilitarea pierderii durabile în greutate la persoanele cu obezitate. Schimbările metabolice care apar după operație joacă un rol semnificativ în ameliorarea bolii deoarece extind beneficiile intervenției chirurgicale dincolo de pierderea ponderală. Reflectând însăși denumirea sa, chirurgia metabolică are drept scop și abordarea disfuncțiilor metabolice asociate obezității. Datele actuale sugerează că metodele chirurgicale de tratament sunt mai eficiente comparativ cu standardul de îngrijire (de ex.: modificări ale stilului de viață, medicamente specifice pentru slăbit, exerciții fizice) atât în ceea ce privește obținerea unei pierderi semnificative în greutate precum și pentru ameliorarea dezechilibrelor metabolice. Este de remarcat faptul că efectele obținute după operație persistă pe perioadă îndelungată (ani de zile). În plus, există dovezi considerabile care susțin rolul chirurgiei bariatrice în obținerea îmbunătățirii statusului glicemic la pacienții care suferă de diabet zaharat de tip 2, ajungând în unele cazuri la remisia completă a bolii. Raționamentul principal care stă la baza chirurgiei metabolice este de a eficientiza scăderea în greutate la persoanele care nu au reușit să slăbească prin metode non-chirurgicale, după eforturi susținute și sub consiliere atentă de specialitate. Ghidurile de practică internațională specifică faptul că această variantă de tratament a obezității este optimă pentru pacienții cu un indice de masă corporală (IMC) care depășește 40 kg/m^2 sau pentru cei cu un IMC mai mare de 35 kg/m^2 , dar care prezintă concomitent comorbidități asociate (DZ tip 2, apnee în somn, etc.). Dintre diferitele opțiuni chirurgicale bariatrice, intervențiile cel mai frecvent realizate sunt bypassul gastric pe ansă în Y a la Roux (RYGB) și gastrectomia longitudinală/gastric sleeve (SG). RYGB implică separarea chirurgicală a stomacului în regiunea sa proximală cu crearea unui mic rezervor gastric cu volum de aproximativ 30 ml și rearanjarea circuitului intestinului subțire pentru a scurta lungimea traseului digestiv necesar absorbției nutrienților (mecanism de pierdere în greutate restrictiv și malabsorbțiv). Alternativ, SG se caracterizează prin excizia a aproape 80% din stomac, ducând la formarea unui stomac tubular (mecanism de pierdere în greutate restrictiv) (15).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Capitolul 3: Modificări epigenetice și disfuncții moleculare în obezitate: corelarea proteinei C reactive (PCR) și a statusului metilării ADN-ului cu inflamația sistemică

Ipoteze și obiective ale studiului

Acest studiu propune analiza relației dintre metilarea ADN-ului, inflamație și adipogeneză în obezitate. O înțelegere mai aprofundată a mecanismelor epigenetice implicate în obezitate are potențialul de a deschide direcții noi de cercetare pentru o mai bună stratificare, monitorizare și decizie terapeutică în favoarea pacienților obezi.

Rezultate principale

Un număr total de 121 de pacienți au fost incluși în studiu, dintre care 65 în grupul pacienților obezi (18 bărbați și 47 femei) și 56 în grupul pacienților normoponderali (lot control: 32 bărbați și 24 femei). Pacienții obezi au prezentat niveluri semnificativ mai mari ale proteinei C reactive (PCR) comparativ cu lotul control, indicând un status inflamator global mai ridicat al acestora. Valorile sideremiei au fost semnificativ mai scăzute la pacienții cu obezitate comparativ cu cei normoponderali, ceea ce poate indica o tendință către deficitul funcțional de fier. Numărul total de leucocite a fost semnificativ crescut la pacienții obezi, cu un număr total de neutrofile, limfocite și monocite urmând aceeași tendință. Numărul de trombocite a fost semnificativ mai mare în grupul pacienților cu obezitate. Raportul dintre neutrofile și limfocite (NLR) a fost crescut în grupul de obezi comparativ cu grupul control, dar fără semnificație statistică. Statusul metilării ADN-ului a fost determinat în lotul control (n=17) și în grupul pacienților cu obezitate (n=31) prin măsurarea cantității totale de 5-metilcitozină (5-mC).

Procentajul mediu de 5-mC a fost de 1.24%, cu valoarea maximă a metilării de 2.08% într-o probă aparținând grupului control, în timp ce valoarea minimă a metilării a fost de 0.91% într-o probă din grupul pacienților cu obezitate. Valoarea medie a statusului de metilare ADN între grupul pacienților normoponderali și grupul de obezi a fost comparată, diferența dintre cele două grupuri fiind semnificativă din punct de vedere statistic, cu un $p < 0.001$. Rezultatele obținute pentru grupul pacienților cu obezitate au prezentat valori mai constante decât în grupul de control unde distribuția a variat de la mai puțin de 1% până la 2.08% 5-mC. Nivelul mai scăzut al statusului metilării ADN-ului (hipometilare) observat în cadrul grupului pacienților cu obezitate sugerează faptul că mecanismele fiziologice de control a adipogenezei pot fi perturbate. Analiza genelor asociate cu adipogeneza FTO, METTL3 și YTHDF1 a fost realizată pe 33 de probe, incluzând lotul control (n = 14), grupul pacienților obezi (n = 15) și respectiv 4 probe (n=4) din grupul de urmărire la 3 luni postoperator (followup - FWP). În toate

cele trei cazuri, grupul pacienților cu obezitate a prezentat o tendință de expresie genică mai amplificată, semnificativă statistic pentru METTL3 ($p=0.003$) și YTHDF1 ($p=0,045$) comparativ cu grupul de control. Creșterea nivelului de expresie a genelor analizate indică faptul că adipogeneza a fost semnificativ stimulată. Conform mediei IMC-ului din grupul pacienților cu obezitate, expresia genelor asociate adipogenezei se corelează cu statusul ponderal al acestora.

În ceea ce privește comparația între lotul pacienților cu obezitate și lotul de urmărire (FWP) se observă o scădere semnificativ statistică a nivelului de expresie a tuturor celor trei gene implicate în adipogeneză, sugerând reversibilitatea modificărilor genetice în urma intervenției chirurgicale.

Concomitent cu evaluarea expresiei genelor implicate în adipogeneză a fost realizată investigarea statusului inflamației la nivel de material genetic prin analiza expresiei genice pentru trei gene care codifică citokine proinflamatorii cheie, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ și $IL-8$, utilizând același set de probe. Rezultatele au arătat o suprexprimare semnificativă a $TNF\alpha$ în grupul pacienților cu obezitate comparativ cu grupul control ($p < 0.001$), distribuția datelor fiind compactă în cadrul grupului de obezi și indicând faptul că $TNF\alpha$ ar putea fi relevant pentru validarea statusului proinflamator al pacienților obezi. $IL-1\beta$ a fost semnificativ suprexprimit la pacienții obezi comparativ cu grupul control ($p = 0.006$), distribuția datelor fiind însă mai heterogenă. Nivelul de expresie genică a $TNF\alpha$ și $IL-1\beta$ prezintă o scădere statistic semnificativă în cadrul grupului de urmărire la 3 luni postoperator, evidențiind reducerea terenului proinflamator în urma chirurgiei bariatrice. Analiza de corelație dintre parametrii biochimici ai grupurilor studiate și cei genetici scoate în evidență variabilele proteina C reactivă (PCR) și 5-mC ca fiind cele mai semnificative. Astfel este demonstrată legătura strânsă dintre inflamația cronică și modificările la nivel de ADN, nivelul de 5-mC fiind scăzut în grupul pacienților cu obezitate, iar PCR este crescută, în timp ce în cazul grupului control relația este inversă.

Concluzii

Studiul în cauză validează existența relației dintre statusul de hipometilare a ADN-ului genomic și starea de inflamație cronică la pacienții cu obezitate, făcând recurs la nivelele de expresie genică a unor gene cheie implicate în procesele de adipogeneză și reglare a eliberării de citokine proinflamatorii. Evaluarea aprofundată a mecanismelor moleculare și epigenetice și analiza cât mai completă a legăturii dintre markerii de inflamație, expresia genică și metilarea ADN-ului, ne poate orienta spre dezvoltarea de noi modele de stratificare a riscului de morbiditate sau de noi terapii personalizate, capabile să abordeze mai eficient disfuncțiile inflamatorii și metabolice asociate cu obezitatea.

Capitolul 4: Dinamica moleculelor proinflamatorii și a ligandului 1 al morții celulare programate (PD-L1) la pacienții cu obezitate care au fost supuși operației de gastric sleeve

Ipoteze și obiective ale studiului

Cel de-al doilea studiu din cadrul tezei își propune să ofere perspective asupra aspectelor moleculare ale obezității și face apel la chirurgia metabolică investigând potențialul acestora de a îmbunătăți terenul proinflamator asociat excesului ponderal.

Obiectiv principal este așadar realizarea unei analize la nivel molecular asupra cineticii inflamației în rândul pacienților cu obezitate, comparativ cu un grup control format din participanți normoponderali, precum și în cadrul unui grup mai restrâns de pacienți cu obezitate evaluați la trei luni după operația de gastric sleeve. Cercetarea are la bază efectuarea de analize de sânge standard și cuantificarea nivelelor plasmatică a unor molecule specifice precum citokinele proinflamatorii și proteine esențiale în reglarea imunității și a inflamației.

Rezultate principale

Pentru realizarea studiului în cauză au fost incluși un număr total de 54 de pacienți, dintre care 31 în grupul pacienților cu obezitate (OBZ) și 23 în grupul pacienților normoponderali (CTR). Statusul proinflamator în grupul pacienților cu obezitate este evidențiat de nivelurile circulante crescute a citokinelor proinflamatorii, cuantificate prin ELISA. IL-18 ($p = 0.006$) și MCP-1 ($p = 0.035$) sunt singurele variabile cu modificări semnificative statistic între grupuri (OBZ vs. CTR). Nivelurile circulante de PD-L1 sunt mai scăzute în grupul OBZ comparativ cu grupul CTR. IL-8 și RANTES nu au prezentat diferențe între grupuri. Concomitent au fost observate creșteri semnificative ale markerilor de inflamație generală, cum ar fi PCR precum și al numărului de monocite, leucocite, neutrofile și trombocite, care au fost semnificativ diferite, prezentând valori mai elevate în rândul grupului OBZ.

Concluzii

Până în prezent, nu există dovezi științifice care să investigheze relația și dinamica dintre markerii proinflamatori circulanți, PD-L1 și efectele intervenției chirurgicale de gastric sleeve. Acest studiu reconfirmă faptul că markerii proinflamatori sunt crescuți la pacienții cu obezitate și manifestă un potențial de reversibilitate a procesului prin scăderea în greutate. După operație, la un interval relativ scurt (3 luni de zile) aceste concentrații tind să scadă, indicând o normalizare progresivă. În schimb, nivelurile plasmatică de PD-L1 au prezentat o tendință de creștere postoperatorie, ceea ce sugerează o îmbunătățire a nivelului inflamației sistemice și a funcționalității imunologice. Aceste modificări ale nivelurilor circulante de PD-L1 aduc în lumină potențialul acestei proteine de a servi drept biomarker valoros pentru monitorizarea și evaluarea statusului inflamator precum și în estimarea ameliorării metabolice generale la pacienții care au suferit o intervenție bariatrică. Sunt necesare însă studii viitoare cu

loturi mai mari de pacienți și perioade de urmărire mai lungi pentru a valida aceste observații și pentru a înțelege mai bine rolul PD-L1 în contextul obezității și al intervențiilor bariatrice.

Capitolul 5: Caracterizarea profilului metabolic al pacienților cu obezitate înainte și la 3 luni după intervenția de gastric sleeve

Ipoteze și obiective ale studiului

Cel de-al treilea studiu își propune să investigheze profilul metabolic al pacienților cu obezitate înainte și la 3 luni după intervenția de gastric sleeve prin analiza moleculară a unor produși de metabolism de tipul acilcarnitinelor și aminoacizilor, cu scopul de a identifica biomarkeri sau factori predictivi ai răspunsului la tratamentul bariatric și de a evidenția modul de adaptare a metabolismului energetic după intervenția chirurgicală.

Rezultate principale

Douăzeci și două de probe control și 31 probe de plasmă de la pacienții cu obezitate au fost analizate prin spectrometrie de masă. Analiza profilului metabolic prin studiul a peste 130 de produși de metabolism a evidențiat 25 de variabile semnificativ diferite între cele două grupuri (t-test $p \leq 0,01$). Profilul metabolic compus din cele 25 de variabile grupează fidel pacienții în cele două grupuri.

Se observă de asemenea un nivel circulant mai scăzut ($|FC| \geq 1,2$) a 3 reprezentări din clasa acilcarnitinelor (cu lanț lung - C18, C20; dicarboxilice – C12DC) la pacienții cu obezitate și concomitent creșterea carnitinei libere (C0), a acilcarnitinelor cu lanț scurt și mediu (C2 și C5), a patru acilcarnitine hidroxilate (C4-OH, C5-OH, C18-OH și C18:1-OH), precum și a trei acilcarnitine dicarboxilice (C4DC, C6DC, C8DC). Modificări în raportul acilcarnitinelor a fost semnificativ diferit la OBZ comparativ cu pacienții CTR: s-a evidențiat creșterea raportului C16-OH/C16 și C5/C3 dar și scăderea C5DC/C5-OH.

În cazul metaboliților din clasa aminoacizilor, s-a observat creșterea semnificativă a glutaminei și a activității glutaminazei în cadrul pacienților OBZ comparativ cu CTR și creșterea semnificativă a nivelului plasmatic al valinei.

Analiza profilului metabolic la pacienții din grupul de urmărire postoperatorie (FWP) față de OBZ a evidențiat 21 variabile semnificativ diferite ($p \leq 0,01$).

În cadrul grupului FWP, se observă scăderea statistic semnificativă ($FC > 1,2$, $p < 0,01$) a carnitinei libere, a C5-OH, a acilcarnitinelor cu catena scurtă (C3 și C5), acompaniată de creșterea acilcarnitinelor cu catenă medie (C10) și lungă (C20, C18) (Fig. 16C). De asemenea, s-a observat creșterea raportului C2/C0, a metaboliților asociați cu beta-oxidarea și C5DC/C5-OH și scăderea C3/C2, C5-OH/C8, C5/C2, C3/C16 în grupul FWP.

Au fost observate modificări și în cadrul metaboliților din clasa aminoacizilor. Astfel, comparativ cu grupul OBZ, în grupul FWP se reduce semnificativ nivelul plasmatic de tirozina, fenilalanină, valina și crește nivelul de serină și glicină.

Modificări în profilul metabolic al pacienților pereche OBZ-FWP au fost analizate statistic. Astfel s-a determinat creșterea caracteristică FWP a sintezei ornitinei și a

aminoacizilor serină și glicină comparativ cu probele pereche din grupul OBZ. S-a observat creșterea C18:2, și a rapoartelor C5DC/C5-OH și Leu/Phe în FWP față de OBZ. În grupul FWP s-a observat scăderea valinei, fenilalaninei și tirozinei și a totalului de aminoacizi aromatici. Din grupul acilcarnitinelor, în grupul FWP scad carnitina liberă, C3, C4, C5, C5:1, C5-OH și rapoartele C5/C0, C5-OH/C8, C3/C2, C5/C2 și C3/C16.

Analiza profilului metabolic a evidențiat 18 variabile semnificativ diferite între grupul control (normoponderali - CTR) și cel FWP.

În grupul FWP comparativ cu cei din grupul CTR se observă scăderea rapoartelor C3/C2, C5/C2, C5-OH/C8, C3/C16 și C5DC/C8 (Fig. 18C) concomitent cu creșterea C4OH, C6DC, C18:1-OH, acilcarnitinei C2, acilcarnitinelor cu lanț mediu (C6, C8) și lung (C14:1, C16:1), a metaboliților asociați cu beta-oxidarea și activitatea glutaminazei. S-a observat, de asemenea, în cadrul grupului FWP comparativ cu CTR, scăderea nivelului glutaminei.

Studiul de corelații între parametrii produșilor de metabolism și indicele de masă corporală (IMC) demonstrează corelația puternic negativă a nivelului plasmatic preoperator de serină cu scăderea IMC (Δ -BMI) în perioada de după operație.

Concluzii

Profilul metabolic al pacienților cu obezitate care au fost supuși intervenției de gastric sleeve afișează, la 3 luni de la operație, o transformare a consumului de energie către un model ce utilizează în proporție mai ridicată rezervele energetice din depozitele de grăsime. Acest lucru este obiectivat prin intensificarea proceselor de β -oxidare, degradare de aminoacizi și variația concentrațiilor de acilcarnitine. Având în vedere că serina este un aminoacid cu posibil impact asupra gradului de metilare a ADN-ului, așa cum a fost menționat în cercetări anterioare, corelația ei puternic negativă cu scăderea IMC (Δ -BMI) postoperator atrage atenția asupra unei eventuale utilități pentru predicția scăderii în greutate. Altfel, un nivel crescut de serină plasmatică la pacienții cu obezitate indică o scădere ponderală mai bună după intervenția chirurgicală.

Aprofundarea legăturii dintre aceste fluctuații de metaboliți și mecanismele genetice și epigenetice care modulează metabolismul energetic și starea de recuperare metabolică în obezitate poate fi un domeniu de interes valoros pentru cercetări viitoare. Studii riguroase, efectuate pe un număr mai mare de pacienți sau care să urmărească profilul metabolic individual al fiecărui pacient în dinamică, cu cât mai multe puncte de control pe perioada de urmărire postoperatorie, ar putea veni în ajutorul descoperirii de biomarkeri importanți sau la dezvoltarea de terapii personalizate.

OBSERVAȚII FINALE

Ideile centrale ale acestei lucrări de doctorat își aduc aportul la progresul medical prin integrarea unei metode comprehensive de analiză ce îmbină noțiuni din domeniul geneticii și epigeneticii, al medicinei moleculare și de laborator și al chirurgiei metabolice. Complementaritatea acestor noțiuni face posibilă conexiunea mecanismelor de modificare epigenetică cu cele ale inflamației cronice generată de excesul ponderal și implicat cu variațiile de profil metabolic rezultate în urma actului terapeutic chirurgical.

Prin prisma datelor primului studiu al cercetării doctorale, corelația dintre gradul de inflamație generală (cuantificat prin nivelul PCR) și statusul de metilare al ADN constituie fundamentul unor investigații viitoare pentru calcularea de scoruri de risc asociate cu obezitatea și potențialul de morbiditate al obezității, utilizând acești parametri. Analiza integrată a pacienților incluși în studiu urmează linearitatea fenomenelor biologice de modificare a materialului genetic și transpunere la nivel de fenotip prin expresia genică, alăturând acestui aspect parametrii clinico-biologici. Acest tip de model experimental conferă valoare științifică superioară printr-o analiză mult mai cuprinzătoare față de evaluarea separată a fiecărui proces în parte.

Cel de-al doilea studiu este primul model experimental uman care evaluează modificările nivelurilor circulante de PD-L1 și evidențiază potențialul acestei proteine de a servi ca biomarker valoros pentru monitorizarea statusului inflamator și evaluarea ameliorării metabolice generale la pacienții care au suferit o intervenție bariatrică. De asemenea, testează legătura dintre răspunsul inflamator și medierea imună a inflamației în context postoperator, la 3 luni.

Profilul metabolic la pacienții cu obezitate supuși intervenției de gastric sleeve completează ipotezele studiilor anterioare și propune modele de predicție pentru răspunsul la terapia chirurgicală. Dovedirea serinei ca element predictiv pentru scăderea în greutate precum și a altor metaboliți din clasa acilcarnitinelor pentru evaluarea adaptabilității metabolismului glicemic și a statusului inflamator, deschide noi oportunități de alegere mai eficientă a metodelor terapeutice pentru slăbit și îndeamnă la continuarea dezvoltării de noi cercetări în această direcție.

Având în vedere posibilitatea cuantificării anumitor metaboliți prin metode analitice rapide, fiabile, ieftine și eficiente, dezvoltarea cercetărilor în această direcție poate avea un impact și o utilitate clinică deosebită în practica medicală curentă, sărind în ajutorul clinicianului cu variante optime de stratificare a pacienților obezi pe baza profilului lor metabolic și prin ghidarea deciziei terapeutice în conformitate cu principiile moderne ale medicinei personalizate.

Referințe bibliografice

1. Voruganti VS. Precision Nutrition: Recent Advances in Obesity. *Physiology*. 2023 Jan 1;38(1):42–50.
2. Pipek LZ, Moraes WAF, Nobetani RM, Cortez VS, Condi AS, Taba JV, et al. Surgery is associated with better long-term outcomes than pharmacological treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2024 Apr 25;14(1):9521.
3. Rohm T V., Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*. 2022 Jan;55(1):31–55.
4. Aronica L, Levine AJ, Brennan K, Mi J, Gardner C, Haile RW, et al. A systematic review of studies of DNA methylation in the context of a weight loss intervention. *Epigenomics*. 2017 May 18;9(5):769–87
5. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites*. 2019 Apr 18;9(4):76.
6. Ferrara F, Nava L, Trama U, Nava E, Vitiello A. The Slow Path to Therapeutic Adherence. *Hosp Pharm*. 2022 Oct 14;57(5):593–5
7. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? *Advances in Nutrition*. 2019 Jan;10:S4–9.
8. Masood B, Moorthy M. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine*. 2023 Jul;23(4):284–91.
9. Pulit SL, Stoneman C, Morris AP, Wood AR, Glastonbury CA, Tyrrell J, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet*. 2019 Jan 1;28(1):166–74.
10. Phelps NH, Singleton RK, Zhou B, Heap RA, Mishra A, Bennett JE, et al. Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*. 2024 Mar;403(10431):1027–50.
11. Hall KD, Farooqi IS, Friedman JM, Klein S, Loos RJ, Mangelsdorf DJ, et al. The energy balance model of obesity: beyond calories in, calories out. *Am J Clin Nutr*. 2022 May;115(5):1243–54.
12. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021 Mar 1;320(3):C375–91.
13. Le Thuc O, García-Cáceres C. Obesity-induced inflammation: connecting the periphery to the brain. *Nature Metabolism* 2024 6:7. 2024 Jul 12;6(7):1237–52.
14. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites*. 2019 Apr 18;9(4):76.
15. Roomy M Al, Hussain K, Behbehani HM, Abu-Farha J, Al-Harris R, Ambi AM, et al. Therapeutic advances in obesity management: an overview of the therapeutic interventions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15.

PhD THESIS

Epigenetic mechanisms involved in bariatric surgery

PhD candidate: **Ciprian CUCOREANU**

PhD supervisor: **Prof. dr. Constantin CIUCE**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

SUMMARY

INTRODUCTION	1
LITERATURE REVIEW	3
<i>Chapter 1: Obesity and its impact on health</i>	5
1.1 General Considerations and Epidemiological Data	5
1.2 Types of Adipose Tissue	8
1.3. Causes and risk factors associated with obesity.	10
1.3.1 Non-modifiable factors	11
1.3.2 Modifiable factors	13
1.4 Implications of inflammatory and epigenetic mechanisms in the pathophysiology of obesity	18
1.4.1. Adipokines and Metabolic Balance	19
1.4.2. The role of the immune system	23
1.4.3. Metabolic Syndrome	26
1.5 Epigenetic mechanisms and obesity	27
1.5.1 Definition and general characteristics	27
1.5.2 Epigenetics in the context of metabolic surgery	29
1.6. Metabolomics – a molecular signature of obesity	30
1.6.1 Metabolomics in the context of obesity and bariatric surgery	30
1.6.2 Metabolomics, a preliminary message of epigenetic changes	34
<i>Chapter 2: Bariatric surgery and its role in the management of obesity</i>	37
2.1 A brief history of the development of bariatrics	37
2.2 The primary bariatric interventions and their effects on obesity	38
2.2.1 The gastric sleeve (sleeve gastrectomy)	39
2.2.2 he Roux-en-Y gastric bypass	39
PERSONAL CONTRIBUTION	43
Hypothesis and objectives	45
<i>Chapter 3: Epigenetic changes and molecular dysfunctions in obesity: correlation of c-reactive protein (CRP) and DNA methylation status with systemic inflammation</i>	47
3.1 Introduction	27
3.2 Hypothesis and objectives	47
3.3 Materials and methods	47
3.3.1 Characterization of patient cohorts and analysis of clinical and laboratory parameters	49
3.3.2 Collection of genetic material samples and extraction of nucleic acids	50
3.3.3 Global DNA methylation and determination of 5-mC using the ELISA technique	51
3.3.4 Gene expression analysis	52
3.3.5 Statistical analysis	53
3.4 Results	53
3.4.1 Clinical and laboratory parameters of patient cohort	53
3.4.2 Assessment of DNA methylation status	54
3.4.3 Examination of gene expression	55
3.4.4 Assessment of clinical and laboratory parameters in the context of epigenetic and genetic modifications	56

3.5 Discussions	60
3.6 Conclusions	64
<i>Chapter 4: The dynamics of pro-inflammatory molecules and programmed cell death ligand 1 (pd-l1) in obese patients undergoing gastric sleeve surgery</i>	65
4.1 Introduction	65
4.2 Hypothesis and objectives	67
4.3 Materials and methods	68
4.3.1 Selection and follow-up of patient cohorts	68
4.3.2 Collection, processing, and storage of samples for molecular analysis	69
4.3.3 Measurement of circulating proinflammatory cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay (elisa)	69
4.3.4 Statistical analysis	70
4.4 Results	70
4.4.1 Clinical parameters and molecular analysis	70
4.4.2 Multivariate analysis	72
4.4 Discussions	75
4.5 Conclusions	79
<i>Chapter 5: Characterization of the metabolic profile of obese patients before and 3 months after gastric sleeve surgery</i>	81
5.1 Introduction	81
5.2 Hypothesis and objectives	82
5.3 Materials and methods	82
5.3.1 Selection and follow-up of the patient cohort	82
5.3.2 Reagents and chemicals used for sample processing	84
5.3.3 Sample processing for mass spectrometry analysis	84
5.3.4 Analytical method implemented for metabolomic profiling	84
5.3.5 Mass spectrometry data analysis	89
5.4 Results	90
5.4.1 Analysis of the metabolic profile obtained in the three patient groups	90
5.4.2 Correlations for predicting therapy response, assessment of the inflammatory status, glycemic and renal function, and improvement of the lipid profiles in patients with obesity after bariatric treatment	98
5.5 Discussions	99
5.6 Conclusions	104
6. GENERAL CONCLUSIONS	105
7. ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS	107
BIBLIOGRAPHY	109

Keywords: obesity, metabolic surgery, epigenetics, metabolomics, inflammation

INTRODUCTION

In recent years, the topic of obesity has become essential in the fields of medicine and research, as well as at the social level. Obesity is a key element in numerous pathologies and remains one of the most challenging public health issues in most countries. Research focused on this area of interest has become extremely dynamic over the last decade due to the increasing prevalence of individuals with excess weight, highlighting the need for ongoing efforts aimed for a better understanding of the mechanisms underlying the pathogenesis of obesity and its associated comorbidities, as well as for the development of new prevention and treatment methods.

One of the most effective weight loss intervention, also significantly alleviating obesity associated risks, particularly for grade III obesity, remains bariatric (metabolic) surgery (1). Although literature data validate surgical treatment as more suitable over conventional therapeutic methods (lifestyle changes, diet, physical exercise, specific medication), these interventions target only a limited segment of patients and present significant heterogeneity in treatment response (2). For this reason, discovering new mechanisms, biomarkers, and therapeutic targets of interest is crucial.

Beyond its various causes, obesity is characterized at the molecular level by a persistent inflammatory state wherein an excess of adipose tissue leads to the impairment of adipocyte function. Numerous studies established that chronic inflammation within adipose tissue is fundamental to the metabolic dysfunctions observed in the comorbidities associated with obesity (3).

Obesity is a multifactorial disease, influenced by the interaction between genetic predisposition and exposure to obesogenic environment. Thus, epigenetic alterations may play a causative role in obesity pathogenesis by inducing inappropriate expression or suppressing genes and their regulatory sequences, thereby leading to metabolic imbalances (4).

The scientific community is presently engaged in the advancement of "omics" technologies, including genomics, epigenomics, proteomics, transcriptomics, and metabolomics. This modern approach offers the possibility of obtaining an overview and establishing potential connections at the crossroads of vast and diverse research fields (genetics, epigenetics, cellular and molecular biology, biochemistry, medical specialties). The path toward integrating such data, aimed at deciphering interindividual variability, may provide the answer for better selection of therapeutic methods and, implicitly, for achieving superior outcomes (5).

Obesity is therefore a current topic with multiple perspectives and an urgent need for solutions. Consequently, the research underlying this thesis represents a multidisciplinary analysis that combines elements of genetics, epigenetics, the molecular study of inflammation in obesity, and metabolomics studies, in relation to surgical intervention, with the aim of identifying the most representative biomarkers and metabolic pathways of interest for the discovery of new strategies useful in the personalized therapy of obesity.

LITERATURE REVIEW

The contemporary lifestyle, which often involves a combination of sedentary behavior and excessive energy intake along with societal and cultural encouragement of these detrimental habits, fosters the optimal conditions for the ongoing and concerning increase in the prevalence of obesity.

Obesity is linked to an increased risk of cardiovascular events, the development of insulin resistance and type 2 diabetes, rheumatic and musculoskeletal diseases, certain types of cancer, a decline in quality of life and psychological well-being, as well as the onset of respiratory, renal, or skin conditions. The complexity of the causative factors contributing to the onset of obesity is particularly evident in the challenges associated with its management. A key indicator of this is the low compliance rate among patients undergoing long-term obesity treatment. The frequent relapses and the wide array of available therapeutic methods highlight the limited effectiveness of current approaches and underscore the need for ongoing improvements, especially in the light of the increasing impact and prevalence of the disease. All these findings reveal the significance of a multidisciplinary approach and the need for coordinated collaboration across social, educational, scientific, and medical fields, both for the prevention and effective treatment of obesity (6).

Chapter 1: Obesity and Its Health Impact

Obesity is a complex and multifactorial health problem. Although it is recognized as a chronic disease, it not only exacerbates pre-existing conditions but also contributes to the development of new ones. Obesity has widespread effects on nearly all biologic systems, causing various metabolic imbalances. Its impact on individuals and society is profound, particularly when considering its associated chronic diseases. These conditions, along with their potential to cause disability, lead to a substantial reduction in workplace productivity and a decrease in the overall functional capacity of individuals within society (7, 8).

The causes of obesity, according to some researchers, stem from the combination of individual factors and socio-cultural factors (such as unhealthy eating habits). However, obesity also has a genetic component, and changes in gene expression play a significant role in predisposing individuals to obesity. Thus, interest in epigenetics has steadily increased among researchers, with numerous studies conducted to investigate its role in the development of chronic diseases, including obesity. DNA methylation continues to be the most studied epigenetic mechanism in the context of obesity. Epigenetic mechanisms that regulate gene expression could explain the multiple benefits of bariatric surgeries and could encourage future research focused on this area of interest. Studies conducted on twins, cohabiting individuals (families), and adoptees estimate that the heredity of obesity ranges between 40% and 70%. A high-risk genetic profile makes an individual more vulnerable to an obesogenic environment. Research findings suggest that the presence of these genes increases the risk of obesity during life but does not automatically cause it. This inherited risk can be reduced through healthy

dietary choices, regular physical activity, and the avoidance of other factors that may lead to obesity (9).

In recent decades, extensive studies have focused on understanding the biological characteristics and significant variability of obesity, as well as the response to existing weight loss treatments, with the goal of developing new, systematic, and effective therapeutic approaches. Although current progress in obesity research is substantial, the rate of increase in obesity prevalence is accelerating even further. According to the WHO, by 2022, over 2.5 billion adults were overweight and 890 million were obese. These figures account for 43% of the total adult population. The global trend is far from favorable. Compared to the situation in 1990, when only one in four adults was overweight, the obesity epidemic continues to grow, and according to the World Obesity Atlas, by 2035, the global prevalence of overweight and obesity is expected to reach 51%. The concerning rise in the number of overweight and obese children highlights the significant impact on health at all ages. Annual data on the number of children with excess weight shows a constant increase. More than 60% of children who are overweight before puberty will remain overweight or become obese in adulthood (10).

Historically, the prevailing theory in obesity research has been that it stems from an energy imbalance, specifically the relationship between calories consumed and calories burned. According to this model, increasing physical activity and decreasing caloric intake should, in theory, be effective for everyone. However, the actual situation is more nuanced. Numerous researchers argue that the underlying mechanisms of obesity are significantly more intricate (11).

The scientific community has made significant efforts aimed at thoroughly elucidating the pathophysiological mechanisms underlying the obesity epidemic. However, the vast amount of information required to understand and identify these mechanisms, as well as potential future therapeutic targets, can be overwhelming. Integrating this information into clinical practice and uncovering existing interconnections presents an ongoing and substantial challenge. The dedication of physicians and researchers has led to notable advancements, evidenced by the emergence of various treatments. Concurrently, new uncertainties have arisen that demand answers.

A highly researched topic related to obesity is inflammation. Adipose tissue, like any other component of the body, is dynamic and organic, constantly expanding and remodeling itself. It serves not only as a reservoir for triglycerides but has also been shown through numerous studies to play an active metabolic role by producing biomolecules with various functions. These mediators are referred to as adipokines. Weight gain is synonymous with the expansion of adipose tissue, which can occur through the enlargement of adipocyte volume (hypertrophy) and/or an increase in the number of adipocytes (hyperplasia). In the early stages of weight gain, inflammation arises as a physiological response that aids in maintaining metabolic and energy homeostasis. However, when obesity progresses to a chronic stage, adipocyte hypertrophy leads to suboptimal tissue perfusion and local hypoxia. Hypoxia promotes

adipocyte death and exacerbates the inflammatory process, resulting in chronic local and systemic inflammation. The secretion of pro-inflammatory adipokines is closely linked to the production of reactive oxygen species and oxidative stress. This inflammation-mediated remodeling of adipose tissue significantly disrupts the body's metabolic balance and contributes to the development of obesity-related comorbidities (12, 13).

An alternative approach to studying obesity focuses on energy metabolism and the body's adaptive mechanisms for energy consumption and storage. Despite extensive research, the underlying causality of energy balance disruption remains poorly understood. Factors such as increased fat oxidation, a high metabolic rate, physical activity, and heightened sympathetic nervous system activity are considered protective against weight gain. The precise mechanisms by which factors like fat oxidation, metabolic rate, physical activity, and sympathetic nervous system activity influence the balance between energy intake and expenditure remain unclear. Genetic variability in substrate oxidation may offer insight into differences in weight gain, particularly in the context of modern lifestyles driving the obesity epidemic. In this regard, profiling metabolic changes before and after the application of effective therapeutic interventions aimed at improving both weight and metabolic health offers significant potential. Such approaches can help uncover molecular pathways or biomarkers that deepen our understanding of the regulation of energy storage and expenditure.

Metabolomics refers to the comprehensive analysis of metabolites derived from biological samples of individuals with various conditions, with the goal of uncovering pathophysiological mechanisms that may predict disease progression. As a highly valuable approach, metabolomics enables the study of dynamic metabolic responses and the adaptation of biological systems to specific stimuli. Widely utilized across diverse scientific disciplines, it aims to identify molecular signatures that can serve as reliable biomarkers for diagnosis and prognosis. Typically, metabolomic analyses are conducted using nuclear magnetic resonance (NMR) or mass spectrometry, in combination with advanced chromatographic separation techniques such as electrophoresis, liquid chromatography, or gas chromatography. These detection techniques efficiently characterize low molecular weight metabolic products (50-1500 Da) from various biochemical classes, offering deep insights into the molecular underpinnings of health and disease (14).

The application of metabolomics in the study of obesity could enhance not only the understanding of the biochemical and metabolic dysfunctions associated with this condition but also provide insights into the molecular effects of therapeutic interventions, such as bariatric surgery. This approach has the potential to explain the heterogeneity of outcomes observed in such treatments, offering a deeper understanding of individual variations in response to therapy.

Chapter 2: Bariatric surgery and its role in the management of obesity

Bariatric surgery is a crucial therapeutic strategy for achieving sustainable weight loss in individuals with obesity. The metabolic changes that occur after surgery play a significant role in improving the condition, as it extends the benefits of the surgical intervention beyond weight loss. True to its name, metabolic surgery also aims to address the metabolic dysfunctions associated with obesity. Current data suggest that surgical treatment methods are more effective compared to the standard of care (e.g., lifestyle changes, specific weight-loss medications, physical exercise) in both achieving significant weight loss and improving metabolic imbalances.

Moreover, the effects achieved after bariatric surgery persist for an extended period (years). Additionally, there is substantial evidence supporting the role of bariatric surgery in improving glycemic status in patients with type 2 diabetes, with some cases even achieving complete remission of the disease. The main rationale behind metabolic surgery is to enhance weight loss in individuals who have been unable to lose weight through non-surgical methods, despite sustained efforts and careful professional guidance. International practice guidelines specify that this treatment option for obesity is optimal for patients with a body mass index (BMI) exceeding 40 kg/m^2 or for those with a BMI greater than 35 kg/m^2 who also have associated comorbidities (e.g., type 2 diabetes, sleep apnea). Among the different bariatric surgical options, the most frequently performed interventions are Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and sleeve gastrectomy (SG). RYGB involves the surgical separation of the stomach at its proximal region, creating a small gastric pouch of approximately 30 ml, and rearranging the small intestine to shorten the length of the digestive tract required for nutrient absorption (a mechanism of weight loss that is both restrictive and malabsorptive). Alternatively, SG involves the excision of nearly 80% of the stomach, resulting in the formation of a tubular stomach (a restrictive weight loss mechanism) (15).

PERSONAL CONTRIBUTION

Chapter 3: Epigenetic changes and molecular dysfunctions in obesity: correlation of c-reactive protein (CRP) and DNA methylation status with systemic inflammation

Hypothesis and goals of the study

This study proposes an analysis of the relationship between DNA methylation, inflammation, and adipogenesis in obesity. A deeper understanding of the epigenetic mechanisms involved in obesity has the potential to open new research directions for better stratification, monitoring, and therapeutic decision-making for obese patients.

Main results

A total of 121 patients were included in the study, 65 in the obese group (18 men and 47 women) and 56 in the normal-weight group (control group: 32 men and 24 women). Obese patients exhibited significantly higher levels of C-reactive protein (CRP) compared to the control group, indicating a higher overall inflammatory status. Serum iron levels were significantly lower in obese patients compared to normal-weight patients, suggesting a tendency towards functional iron deficiency. The total white blood cell count was significantly increased in obese patients, with the total number of neutrophils, lymphocytes, and monocytes following the same trend. The platelet count was significantly higher in the obese group. The neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) was elevated in the obese group compared to the control group, though without statistical significance.

DNA methylation status was determined in the control group (n=17) and in the obese group (n=31) by measuring the total amount of 5-methylcytosine (5-mC). The average 5-methylcytosine (5-mC) percentage was 1.24%, with the highest methylation value reaching 2.08% in the control group and the lowest at 0.91% in the obese group. The comparison between the two groups revealed a statistically significant difference ($p < 0.001$), with the obese group showing more consistent 5-mC levels, while the control group exhibited a broader distribution. The lower DNA methylation observed in the obese group (hypomethylation) suggests a disruption in the physiological mechanisms regulating adipogenesis.

Gene expression analysis of FTO, METTL3, and YTHDF1 in 33 samples revealed that the obese group exhibited significantly elevated gene expression for METTL3 ($p = 0.003$) and YTHDF1 ($p = 0.045$) compared to the control group, indicating enhanced adipogenesis. The correlation between gene expression and BMI suggests that adipogenesis is closely linked to weight status, further highlighting the role of epigenetic factors in obesity.

When comparing the cohort of patients with obesity to the follow-up group (FWP), a statistically significant reduction in the expression levels of all three

adipogenesis-related genes was observed. This finding suggests the potential reversibility of genetic changes following surgical intervention, highlighting the capacity of bariatric surgery to modulate underlying molecular processes associated with obesity and adipogenesis. In addition to the analysis of adipogenesis-related gene expression, the study also examined the inflammatory status at the genetic level by assessing the expression of three key pro-inflammatory cytokines: TNF α , IL-1 β , and IL-8, using the same sample set. The results revealed a significant overexpression of TNF α in the obesity group compared to the control group ($p < 0.001$), with a tight data distribution within the obese cohort, indicating that TNF α could serve as a relevant marker for the pro-inflammatory status in obese patients. IL-1 β also showed significant overexpression in the obese group compared to controls ($p = 0.006$), though the data distribution was more variable. Both TNF α and IL-1 β expression levels significantly decreased in the follow-up group three months post-surgery, reflecting a reduction in the pro-inflammatory environment following bariatric surgery.

Correlation analysis between the biochemical parameters of the studied groups and genetic factors identified C-reactive protein (CRP) and 5-mC as the most significant variables. This finding highlights a strong connection between chronic inflammation and DNA modifications. Specifically, the obesity group exhibited low 5-mC levels and elevated CRP levels, while the control group showed the opposite pattern, with higher 5-mC levels and lower CRP levels. This suggests a clear relationship between inflammation and epigenetic changes in obesity.

Conclusions

This study validates the relationship between the hypomethylation status of genomic DNA and chronic inflammation in obese patients, drawing upon gene expression levels of key genes involved in adipogenesis and the regulation of pro-inflammatory cytokine release. A thorough evaluation of molecular and epigenetic mechanisms, along with a comprehensive analysis of the connection between inflammation markers, gene expression, and DNA methylation, could guide the development of new risk stratification models for morbidity or personalized therapies. These therapies would be better equipped to address the inflammatory and metabolic dysfunctions associated with obesity.

Chapter 4: The dynamics of pro-inflammatory molecules and programmed cell death ligand 1 (pd-1) in obese patients undergoing gastric sleeve surgery

Hypothesis and goals of the study

The second study of this thesis aimed to provide insights into the molecular aspects of obesity, focusing on metabolic surgery and its potential to improve the pro-inflammatory environment associated with excess weight. The main objective is to perform a molecular-level analysis of the inflammatory kinetics in obese patients,

comparing them with a control group of normal-weight participants, as well as in a smaller group of obese patients evaluated three months post-gastric sleeve surgery. This research is based on standard blood analyses and the quantification of plasma levels of specific molecules, including pro-inflammatory cytokines and proteins essential for regulating immunity and inflammation.

Main results

A total of 54 patients were included in this study, with 31 in the obesity group (OBZ) and 23 in the control group (CTR). The pro-inflammatory status in the obesity group is highlighted by the increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines, quantified through ELISA. IL-18 ($p = 0.006$) and MCP-1 ($p = 0.035$) were the only variables showing statistically significant differences between the groups (OBZ vs. CTR). Circulating PD-L1 levels were lower in the OBZ group compared to the CTR group. IL-8 and RANTES did not show differences between the groups. Additionally, significant increases were observed in general inflammation markers, such as C-reactive protein (CRP), as well as in the number of monocytes, leukocytes, neutrophils, and platelets, all of which were significantly elevated in the OBZ group.

Conclusions

Until now, there is no scientific evidence investigating the relationship and dynamics between circulating pro-inflammatory markers, PD-L1, and the effects of gastric sleeve surgery. This study reaffirms that pro-inflammatory markers are elevated in obese patients and exhibit potential for reversibility through weight loss. After surgery, within a relatively short interval (3 months), these concentrations tend to decrease, indicating a progressive normalization. In contrast, plasma levels of PD-L1 showed a tendency to increase postoperatively, suggesting an improvement in systemic inflammation and immunological functionality. These changes in circulating PD-L1 levels highlight the potential of this protein to serve as a valuable biomarker for monitoring and assessing inflammatory status, as well as estimating overall metabolic improvement in patients who have undergone bariatric surgery. However, future studies with larger patient cohorts and longer follow-up periods are necessary to validate these observations and to better understand the role of PD-L1 in the context of obesity and bariatric interventions.

Chapter 5: Characterization of the metabolic profile of obese patients before and 3 months after gastric sleeve surgery Hypothesis and goals of the study

The third study aimed to investigate the metabolic profile of obese patients before and three months after gastric sleeve surgery through molecular analysis of metabolic products such as acylcarnitines and amino acids. The goal was to identify biomarkers or predictive factors of response to bariatric treatment and to highlight how energy metabolism adapts following the surgical intervention.

Main results

A total of 22 control samples and 31 plasma samples from obese patients were subjected to mass spectrometry analysis. The comprehensive metabolic profiling, encompassing over 130 metabolic products, identified 25 variables that were significantly different between the two groups (t-test $p \leq 0.01$). The resulting metabolic profile, derived from these 25 variables, effectively differentiated and clustered the patients into their respective groups, providing a robust framework for understanding metabolic alterations in obesity. The analysis also revealed a lower circulating level ($|FC| \geq 1.2$) of three representatives from the long-chain acylcarnitines (C18, C20) and dicarboxylates (C12DC) in obese patients, alongside an increase in free carnitine (C0), short- and medium-chain acylcarnitines (C2 and C5), four hydroxy-acylcarnitines (C4-OH, C5-OH, C18-OH, and C18:1-OH), and three dicarboxyl acylcarnitines (C4DC, C6DC, C8DC). Significant changes in the acylcarnitine ratio were observed in obese patients (OBZ) compared to the control group (CTR): an increase in the C16-OH/C16 and C5/C3 ratios, along with a decrease in C5DC/C5-OH.

Regarding amino acid metabolites, a significant increase in glutamine and glutaminase activity was found in OBZ patients compared to CTR, along with a significant rise in plasma valine levels.

The analysis of the metabolic profile in the post-operative follow-up (FWP) group compared to the obese (OBZ) group revealed 21 significantly different variables ($p \leq 0.01$). In the FWP group, a statistically significant decrease ($FC > 1.2$, $p < 0.01$) was observed in free carnitine, C5-OH, and short-chain acylcarnitines (C3 and C5), accompanied by an increase in medium-chain (C10) and long-chain (C20, C18) acylcarnitines (Fig. 16C). Additionally, an increase in the C2/C0 ratio, metabolites associated with beta-oxidation, and C5DC/C5-OH was observed, alongside a decrease in C3/C2, C5-OH/C8, C5/C2, and C3/C16 ratios in the FWP group.

Changes were also observed in amino acid metabolites. Compared to the OBZ group, the FWP group showed a significant reduction in plasma levels of tyrosine, phenylalanine, and valine, while the levels of serine and glycine increased.

The analysis of metabolic profile changes between the paired OBZ-FWP groups revealed several significant differences. Specifically, the FWP group exhibited increased synthesis of ornithine, serine, and glycine compared to the OBZ group. Additionally, there was an increase in C18:2 and the ratios of C5DC/C5-OH and Leu/Phe in the FWP group compared to OBZ.

In the FWP group, a decrease in plasma levels of valine, phenylalanine, tyrosine, and the total aromatic amino acids was observed. From the acylcarnitine group, the FWP group showed reduced levels of free carnitine, C3, C4, C5, C5:1, C5-OH, as well as the ratios of C5/C0, C5-OH/C8, C3/C2, C5/C2, and C3/C16.

The analysis of the metabolic profile also revealed 18 significantly different variables between the control group (CTR) and the FWP group. Compared to the CTR group, the FWP group showed a decrease in the ratios C3/C2, C5/C2, C5-OH/C8, C3/C16, and C5DC/C8 (Fig. 18C), along with an increase in C4OH, C6DC, C18:1-OH,

acetylcarnitine C2, medium-chain (C6, C8) and long-chain (C14:1, C16:1) acylcarnitines, beta-oxidation metabolites, and glutaminase activity. Additionally, a decrease in glutamine levels was noted in the FWP group compared to CTR.

Correlation analysis between metabolic products and body mass index (BMI) showed a strong negative correlation between preoperative plasma serine levels and postoperative BMI reduction (Δ -BMI).

Conclusions

The metabolic profile of obese patients who underwent gastric sleeve surgery reveals three months post-surgery, a shift in energy consumption toward a model that predominantly utilizes energy reserves from fat deposits. This transformation is evidenced by the intensification of β -oxidation processes, amino acid degradation, and variations in acylcarnitine concentrations. Given that serine is an amino acid with potential implications for DNA methylation, as highlighted in previous studies, its strong negative correlation with post-surgical BMI reduction (Δ -BMI) suggests its potential utility as a predictive marker for weight loss. Conversely, higher plasma levels of serine in obese patients indicate a more significant weight reduction following surgical intervention. Deepening the understanding of the relationship between fluctuations in metabolites and the genetic and epigenetic mechanisms that regulate energy metabolism and metabolic recovery in obesity could be a valuable area for future research. Rigorous studies conducted on a larger number of patients, or those tracking the individual metabolic profile of each patient dynamically with multiple follow-up points during the post-surgical period, could aid in the discovery of important biomarkers or the development of personalized therapies.

GENERAL CONCLUSIONS

The central ideas of this thesis significantly contribute to advancing medical knowledge by integrating a comprehensive analytical approach which merges concepts from genetics, epigenetics, molecular and laboratory medicine, and metabolic surgery. The synergy of these fields facilitates the exploration of how epigenetic alterations interplay with chronic inflammation induced by excess body weight, and, by extension, how these processes influence metabolic profile variations following surgical intervention. This integrative approach not only enhances our understanding of the complex mechanisms underlying obesity but also paves the way for the development of more precise and effective therapeutic strategies.

The data from the first study establish a crucial link between general inflammation (quantified through CRP levels) and DNA methylation status, laying the groundwork for future investigations aimed at developing risk scores associated with obesity and its potential morbidity. The integrated analysis of the study's participants captures the linear progression of biological phenomena, from genetic material modification to phenotype expression via gene activity, while incorporating clinical and biological parameters. This comprehensive experimental approach adds significant

scientific value by offering a more holistic evaluation, surpassing the insights gained from isolated analyses of each separate process. The second study stands as the pioneering human experimental model assessing the alterations in circulating PD-L1 levels, underscoring the potential of this protein as a critical biomarker for monitoring inflammatory status and evaluating overall metabolic improvements in patients post-bariatric surgery. Furthermore, it investigates the intricate relationship between the inflammatory response and immune-mediated inflammation in the postoperative period, specifically at the three-month follow-up. This exploration offers new insights into the dynamic role of PD-L1 in both inflammation and metabolic recovery, providing a robust framework for future therapeutic strategies.

The investigation of metabolic profile changes in obese patients undergoing gastric sleeve surgery, as presented in the third original study, builds on the findings of previous research and offers predictive models for the response to surgical therapy. Identifying serine as a predictive biomarker for weight loss, along with other metabolites from the acylcarnitine class that assess glyceic metabolism and inflammatory status, introduces promising new pathways for more effective selection of weight loss treatments and stimulates further research in this field.

With the potential for quantifying these metabolites using rapid, reliable, cost-effective, and efficient analytical techniques, advancing research in this area could have a profound clinical impact that offers practical value in everyday medical practice by providing clinicians with improved patient stratification based on metabolic profiles and enabling personalized therapeutic decisions, in line with the latest advances in personalized medicine.

References

1. Voruganti VS. Precision Nutrition: Recent Advances in Obesity. *Physiology*. 2023 Jan 1;38(1):42–50.
2. Pipek LZ, Moraes WAF, Nobetani RM, Cortez VS, Condi AS, Taba JV, et al. Surgery is associated with better long-term outcomes than pharmacological treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2024 Apr 25;14(1):9521.
3. Rohm T V., Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*. 2022 Jan;55(1):31–55.
4. Aronica L, Levine AJ, Brennan K, Mi J, Gardner C, Haile RW, et al. A systematic review of studies of DNA methylation in the context of a weight loss intervention. *Epigenomics*. 2017 May 18;9(5):769–87
5. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites*. 2019 Apr 18;9(4):76.
6. Ferrara F, Nava L, Trama U, Nava E, Vitiello A. The Slow Path to Therapeutic Adherence. *Hosp Pharm*. 2022 Oct 14;57(5):593–5
7. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? *Advances in Nutrition*. 2019 Jan;10:S4–9.
8. Masood B, Moorthy M. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine*. 2023 Jul;23(4):284–91.

9. Pulit SL, Stoneman C, Morris AP, Wood AR, Glastonbury CA, Tyrrell J, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for body fat distribution in 694 649 individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet.* 2019 Jan 1;28(1):166–74.
10. Phelps NH, Singleton RK, Zhou B, Heap RA, Mishra A, Bennett JE, et al. Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults. *The Lancet.* 2024 Mar;403(10431):1027–50.
11. Hall KD, Farooqi IS, Friedman JM, Klein S, Loos RJ, Mangelsdorf DJ, et al. The energy balance model of obesity: beyond calories in, calories out. *Am J Clin Nutr.* 2022 May;115(5):1243–54.
12. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2021 Mar 1;320(3):C375–91.
13. Le Thuc O, García-Cáceres C. Obesity-induced inflammation: connecting the periphery to the brain. *Nature Metabolism* 2024 6:7. 2024 Jul 12;6(7):1237–52.
14. Pinu FR, Beale DJ, Paten AM, Kouremenos K, Swarup S, Schirra HJ, et al. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites.* 2019 Apr 18;9(4):76.
15. Roomy M Al, Hussain K, Behbehani HM, Abu-Farha J, Al-Harris R, Ambi AM, et al. Therapeutic advances in obesity management: an overview of the therapeutic interventions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;15.