



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

TESI DI DOTTORATO

Il microbiota intestinale e la modulazione del profilo glucidico e lipidico

Università di Roma Sapienza
Dottorato di Ricerca in Epatogastroenterologia Sperimentale e Clinica
XXX ciclo

Dott.ssa Flaminia Ferri
Matricola 945143

Relatore
Prof. Stefano Ginanni Corradini

Correlatore
Dott. Antonio Molinaro

A.A. 2018-2019

*Ai miei figlio Lorenzo e Alberto
che tutti giorni danno un senso alla mia vita*

INDICE

ABBREVIAZIONI	4
COLLABORAZIONI:	5
INTRODUZIONE.....	6
Il microbiota intestinale	6
Il microbiota intestinale e l'obesità.....	8
Il microbiota intestinale e il diabete mellito di tipo 2	10
Il microbiota intestinale e la chirurgia bariatrica	11
Ormoni gastrointestinali, microbiota intestinale e chirurgia bariatrica.....	12
OBIETTIVI DELLO STUDIO	14
MATERIALI E METODI.....	14
Popolazione.....	14
Valutazione del profilo glucidico e lipidico.....	17
Analisi del microbiota intestinale	17
Intervento di Sleeve Gastrectomy nei topi “conventionally raised” (CONV-R) e GF	19
Trapianto fecale nei topi germ-free.....	21
Test di tolleranza glucidica nei topi	22
Topi INSL5 wild type e knock-out sottoposti a SG o chirurgia sham.....	22
Estrazione dell'RNA e analisi dell'espressione genica mediante quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	23
Misurazione degli acidi biliari e del FGF19	25
Analisi dei questionari alimentari	26
Analisi statistica	27
RISULTATI.....	29
Variazioni del profilo metabolico post-SG	29
La sleeve gastrectomy altera la composizione e il patrimonio genetico del microbiota intestinale umano.....	30
Trasferimento del profilo metabolico dei pazienti sottoposti ad SG ai topi GF attraverso il trapianto fecale di microbiota.....	33
I miglioramenti osservati dopo SG necessitano della variazione del microbiota intestinale?	34
SG nell'uomo e nel topo è associata con l'aumento dell'FXR intestinale.....	36
Ruolo dell'INSL5 e miglioramento del profilo glucidico post-SG.....	37
DISCUSSIONE.....	39
BIBBLOGRAFIA.....	41
RINGRAZIAMENTI	42

ABBREVIAZIONI

4Y gruppo cross-sectional a 4 anni
6M sei mesi dopo la sleeve gastrectomy
18M diciotto mesi dopo la sleeve gastrectomy
AUC area sotto la curva
BAs acidi biliari
BCFAs acidi grassi a catena ramificata
BMI body mass index
C4 7alfa-idrossi-4-colesten-3-one
CA acido colico
CDCA acido chenodesossicolico
CONV-R topi cresciuti in maniera convenzionale
DCA acido desossicolico
FGF15 fattore di crescita dei fibroblasti 15
FGF19 fattore di crescita dei fibroblasti 19
FXR recettore nucleare farnesoide X
GCA acido glicocolico
GCDCA acido chenodesossicolico
GDCA acido glicodesossicolico
GLCA acido glicolitocolico
GF topi germ-free
GLP-1 glucagon-like peptide 1
GUDCA acido glicoursodesossicolico
HbA1c emoglobina glicata
HCA acido iocolico
HDCA acido iodesossicolico
HDL lipoproteine ad alta densità
INSL5 insulin-like peptide 5
IGF insulin-like growth factor
ipGTT curva da carico di glucosio intraperitoneale
iso.UDCA acido iso-ursodesossicolico
KOs KEGG Orthology database
LCA acido litocolico
LDL lipoproteine a bassa densità
OGGT curva da carico di glucosio per via orale
PCoA principal coordinate analysis
RYGB bypass gastrico Roux-en-Y
SCFAs acidi grassi a catena corta

SG sleeve gastrectomy
T2D diabete mellito di tipo 2
TCA acido taurocolico
TCDCA acido taurochenodesossicolico
TDCA acido taurodesossicolico
TGR5 Takeda-G-protein-receptor-5
TLCA acido taurolitocolico
TUDCA acido tauroursodesossicolico
UDCA acido ursodesossicolico
WT wild-type

COLLABORAZIONI:

Lo studio è stato eseguito in collaborazione con:

Wallenberg Laboratoriet, Dipartimento di Medicina molecolare e clinica, Università di Gothenburg, Sweden (Prof. Fredrik Bäcked, Dott. Antonio Molinaro)

la UOS Malattie Metaboliche e Diabetologia "Sapienza" Università di Roma (Prof.ssa Frida Leonetti, Dott.ssa Danila Capoccia)

la UOC Chirurgia Generale & Bariatric Center of Excellence "Sapienza" Università di Roma-Polo Pontino- AUSL LT ICOT (Prof. Gianfranco Silecchia)

INTRODUZIONE

Il microbiota intestinale

Il nostro organismo ospita circa 100 trilioni di microbi, la maggior parte di essi si trova all'interno del nostro tratto gastrointestinale e viene perciò chiamato microbiota intestinale¹.

La sua biomassa raggiunge, nell'adulto, il peso di circa 1.5 kg², il numero totale dei batteri che costituiscono tale biomassa supera il numero di cellule somatiche umane ed, infine, è stato stimato che il suo patrimonio genetico comprenda complessivamente circa 3 milioni di geni a fronte dei pressappoco 23 mila che compongono il genoma umano³. A differenza del genoma umano, quello del microbiota presenta un'elevata capacità di adattamento e va incontro a variazione in base a diversi fattori fra cui età dell'individuo, la provenienza geografica, la dieta e l'uso di antibiotici⁴⁻⁹.

Il nostro organismo ha sviluppato con il microbiota una relazione unica e dinamica, evolvendosi in simbiosi: noi forniamo un ambiente ricco di nutrimento che consente al microbiota di crescere ed il microbiota intestinale svolge importanti funzioni come la digestione dei nutrienti, la regolazione del sistema immunitario e la prevenzione delle infezioni¹⁰⁻¹². In particolare il microbiota intestinale è coinvolto in funzioni essenziali al mantenimento di un buono stato di salute, tra queste la produzione di vitamine, la sintesi di aminoacidi e neurotrasmettitori, il metabolismo della bile, la prevenzione della colonizzazione intestinale da parte di batteri patogeni e la regolazione della funzionalità delle strutture intestinali¹³⁻¹⁴

Il microbiota intestinale è composto da batteri, archibatteri, lieviti, virus e specie funginee^{15,16}, ma negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata prevalentemente sulle specie

batteriche¹⁷.

Nei soggetti sani il numero totale di specie batteriche identificate che compongono il microbiota intestinale è stato stimato essere di superiore a mille^{18,19}. Tali specie appartengono a 7 phyla: Firmicutes (Gram-positivi) e Bacteroidetes (Gram-negativi) che rappresentano il 90% della popolazione batterica (Firmicutes compresi tra il 60% e l'80% e Bacteroidetes tra il 20% e il 40%) e il restante 10% è suddiviso tra Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Tenericutes e Fusobacteria^{19,20}.

Il nostro tratto gastrointestinale è totalmente colonizzato ma la tipologia di specie batteriche e la loro abbondanza si modifica nei diversi tratti dell'apparato gastrointestinale sulla base dalla disponibilità di nutrienti, del livello di pH e del gradiente dell'ossigeno^{21,22}. La densità batterica aumenta dall'alto verso il basso del tratto gastrointestinale, partendo dal duodeno colonizzato da 10^3 batteri/ml, prevalentemente *Lactobacillus* e *Streptococcus*, e proseguendo a livello ileale con 10^6 - 10^8 batteri/ml (*Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Veilonella*). A livello del colon sono invece presenti fino a 10^{11} batteri/ml che appartengono ai generi *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionbacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Streptococcus*^{23,24}.

Nonostante l'enorme variabilità determinata dalla capacità di adattamento del microbiota intestinale è presente un "core" comune in ampie coorti di popolazione umana²⁰.

Durante la vita intrauterina l'intestino fetale è sterile, tale condizione persiste fino a pochi giorni dopo la nascita quando viene colonizzato dai batteri di provenienza prevalentemente materna²⁵. In questa fase si forma la nicchia primaria del microbiota, la cui composizione è influenzata da diversi fattori pre-, peri- e post-natali tra cui l'età gestazionale al momento

del parto, la tipologia di parto ed di nutrizione (allattamento materno vs allattamento artificiale)²⁶. Durante i primi anni di vita il contatto con i cibi solidi e la maturazione del sistema immunitario modificano profondamente il profilo del microbiota. Successivamente nella pre-adolescenza e nella adolescenza lo sviluppo ormonale, sessuale e il cambiamento delle abitudini di vita, sempre più simili a quelle dell'adulto, apportano un'ulteriore modifica, anche se meno significativa rispetto a quelle del passato, alla composizione del microbiota²⁶.

I diversi fattori che vanno a modulare il microbiota possono condurre od ad uno sviluppo sinergistico tra organismo e microbiota oppure alla disbiosi che provoca un'alterazione dell'omeostasi con conseguenze che nel tempo possono condurre a patologie croniche quali ad esempio obesità, diabete mellito e malattie infiammatorie intestinali²⁷

Il microbiota intestinale e l'obesità

La prevalenza dell'obesità è in continua crescita, l'Organizzazione mondiale della sanità stima che dal 1975 ad oggi sia triplicata. Nel 2016 1.9 miliardi di adulti nel mondo, pari al 39% della popolazione, erano sovrappeso e oltre 650 milioni, pari al 13% della popolazione, erano obesi²⁸. Le cause sono da ricondurre alla creazione da parte dell'uomo di un ambiente obesogenico che ha unito la sovralimentazione alla carenza di esercizio fisico²⁷. Questi fattori svolgono sicuramente un ruolo chiave nel progressivo incremento ponderale ma tale paradigma ad oggi appare incompleto e troppo semplicistico per spiegare in toto l'epidemia di obesità che si può attualmente osservare²⁷. Recenti studi in letteratura suggeriscono che il

microbiota possa contribuire ai cambiamenti di peso grazie alla capacità di alcuni batteri di aumentare l'estrazione di energia dai cibi, migliorare il trasferimento delle calorie dal cibo all'ospite e modificare la capacità di assorbimento dell'ospite²⁹. Tali dati sono stati confermati sia negli studi su soggetti umani sottoposti a dieta ipocalorica o a chirurgia bariatrica sia in quelli sui topi germ-free (GF)³⁰⁻³³.

Questi ultimi in particolare, non solo hanno dimostrato che il profilo dei topi "obesi" e "magri" si trasmette ai topi GF attraverso il microbiota ma, hanno anche dimostrato, come il microbiota intestinale dei topi obesi abbia un'aumentata capacità di degradare i polisaccaridi complessi e di accumulare le calorie in eccesso all'interno del tessuto adiposo³¹. Al contrario, i topi GF presenterebbero una ridotta capacità di degradare i polisaccaridi, un ridotto livello di acidi grassi a catena corta (SCFAs) che raggiungono il fegato attraverso la circolazione portale, ed una ridotta lipogenesi³³.

Per quanto riguarda, invece, il ruolo del microbiota umano nello sviluppo dell'obesità, si osserva un alterato rapporto tra i generi *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, a favore di quest'ultimo³⁴.³⁶ In particolare, quest'ultimo, data la presenza di numerosi geni in grado di influenzare il metabolismo lipidico e glucidico, svolgerebbe un ruolo preponderante nello sviluppo dell'obesità³⁷. Nel phylum dei *Firmicutes* si annoverano le varie specie dei Lattobacilli la cui abbondanza sembra essere più elevata nei soggetti obesi rispetto a quelli normopeso, in particolare, nel microbiota di tali soggetti sembra essere particolarmente rappresentata la specie *Lactobacillus reuteri*^{34, 38} mentre le specie che producono butirrato sarebbero ridotte³⁹. Sebbene molti studi abbiano dimostrato come la variazione del microbiota intestinale svolga un ruolo chiave nel determinare lo sviluppo dell'obesità, non è ancora chiaro quali

siano i meccanismi patofisiologici che conducano ad un'alterazione dell'omeostasi energetica dell'ospite.

Il microbiota intestinale e il diabete mellito di tipo 2

Il collegamento tra l'insorgenza del diabete mellito di tipo 2 (T2D) e microbiota intestinale è stato ormai documentato in numerosi studi che hanno dimostrato come i pazienti affetti da T2D presentino un moderato grado di disbiosi con una complessiva riduzione dei batteri produttori di butirrato, come ad esempio *Roseburia intestinalis* e *Faecalibacterium prausnitzii*, ed un associato aumento dei patogeni opportunisti⁴⁰⁻⁴⁸.

I batteri svolgerebbero un ruolo chiave nella regolazione del *signaling* dell'insulina, dell'infiammazione e dell'omeostasi del glucosio⁴⁰⁻⁴⁸. In particolare essi sarebbero in grado di indurre il meccanismo dell'insulino-resistenza ed influenzare la funzionalità delle cellule beta attraverso la regolazione dell'espressione di GLP-1 (glucagon-like peptide 1), PYY (peptide YY) attraverso SCFA e il suo ligando e Free Fatty Acid Receptor 2⁴⁹.

Ad oggi, però, data la scarsa concordanza degli studi finora effettuati⁵⁰, non è possibile delineare quale sia il profilo del microbiota intestinale caratteristico dei pazienti diabetici.

Secondo alcuni Autori, le specie di *Lactobacillus* risultano essere quelle maggiormente rappresentate nei pazienti affetti da diabete rispetto ai soggetti non diabetici⁵¹⁻⁵².

L'abbondanza di specie del genere *Lactobacillus*, infatti, correla positivamente con la presenza di alti valori di glicemia basale e di emoglobina glicata (HbA1c). Ugualmente per il genere *Clostridium*, che correla negativamente con valori normali di glicemia basale,

HbA1c, insulina basale, C-peptide e trigliceridemia e positivamente con la presenza di livelli normali di adiponectina e colesterolo HDL⁵².

Il microbiota intestinale e la chirurgia bariatrica

La chirurgia bariatrica è il miglior trattamento disponibile per l'obesità severa e le due principali procedure chirurgiche, la sleeve gastrectomy (SG) e il bypass gastrico Roux-en-Y (RYGB), hanno acquisito sempre maggior interesse come trattamento metabolico per la prevenzione e il trattamento del T2D⁵³⁻⁵⁵.

L'utilizzo della SG è stabilmente aumentato in tutto il mondo, probabilmente per la combinazione di diversi fattori, come il basso costo, la bassa incidenza di complicanze post-operatorie⁵⁶ e i risultati nel breve e medio termine che risultano paragonabile alla RYGB che rappresenta il gold standard⁵⁷⁻⁵⁸. Di conseguenza, attualmente la SG è l'intervento di chirurgia bariatrica più eseguito negli Stati Uniti d'America, in Spagna ed in Francia^{56,59,60}.

I risultati provenienti da studi su uomo ed animali indicano che la riduzione delle dimensioni dello stomaco ed il malassorbimento intestinale possono non essere i principali motori della perdita di peso e dei benefici metabolici della procedura⁶¹. Gli effetti indipendenti dalla perdita di peso, secondari ai riarrangiamenti del tratto gastro-intestinale e alla restrizione calorica, potrebbero svolgere un ruolo importante per il miglioramento del metabolismo del glucosio⁶², in particolare, i potenziali meccanismi proposti potrebbero essere la variazione degli ormoni gastrointestinali, degli acidi biliari e del microbiota^{63,64} che

si modificherebbe, secondo recenti studi dopo gli interventi di chirurgia bariatrica quali RYGB^{32,65-72} e SG^{68,73,74}.

Infatti, studi eseguiti in topi GF mostrerebbero come il trapianto di feci, di pazienti nella fase post-RYGB, in questi topi, porti sia ad una riduzione del peso sia ad una redistribuzione del grasso corporeo, indicando quindi un possibile collegamento tra RYGB, microbiota e perdita di peso^{70,75}.

Al contrario, non vi sono dati in letteratura riguardo ai possibili effetti a lungo termine che la SG potrebbe esercitare sul microbiota intestinale umano, né è stata mai indagata la possibile correlazione fra SG, microbiota intestinale e benefici metabolici a favore dell'individuo sottoposto a tale procedura chirurgica.

Ormoni gastrointestinali, microbiota intestinale e chirurgia bariatrica

Gli ormoni gastrointestinali, tra cui peptide YY e GLP-1 espressi dalle cellule L, presentano modificazioni significative in seguito alla chirurgia bariatrica^{55,76-78}, mostrando una minor secrezione dopo l'assunzione di cibo e migliorando il profilo metabolico del paziente⁷⁹⁻⁸⁵. Le modificazione nella secrezione ormonale è stata anche osservata modulando il microbiota attraverso la dieta, in particolare agendo sul contenuto di fibre e di carboidrati^{43,86}. Si ipotizza tre meccanismi di azione: 1) gli SCFAs (es. butirato, propionato, acetato), prodotti dalla fermentazione batterica che agiscono attraverso i recettori GPR41 e GPR43 a livello delle cellule L⁸⁷⁻⁹¹ oppure 2) attraverso la modulazione da parte del microbiota intestinale degli acidi biliari che interagiscono con il recettore TGR5 anch'esso presente a livello delle

cellule L⁹² o in aggiunta 3) mediante l'azione degli aminoacidi a catena ramificata che stimolano la secrezione di GLP1, il cui rilascio è aumentato in concomitanza con l'aumento dei Clostridia in virtù della capacità di quest'ultimi di indurre una maggiore proteolisi^{93,94}.

Recentemente è stato scoperto un terzo ormone abbondantemente espresso a livello delle cellule L del colon^{95,96} chiamato Insulin-like peptide 5 (INSL5). INSL5 è stato identificato per la prima volta nel 1999, si tratta di un piccolo ormone polipeptidico composto da 135 aminoacidi appartenente alla superfamiglia insulina/IGF/relaxina⁹⁷, quindi composta da due catene A e B connesse da un ponte disolfuro⁹⁸ e si lega al recettore (Rxfp4)⁹⁹⁻¹⁰¹. Una serie di studi hanno evidenziato un'elevata espressione di INSL5 a livello delle cellule enteroendocrine^{102,103,95} ma risulta presente anche in altri tessuti quali ad esempio il cervello⁹⁹.

Mentre altri membri della famiglia delle relaxine hanno un ruolo importante nella funzione riproduttiva e nel rimodellamento tissutale, la funzione dell'INSL5 è incerta¹⁰⁴. Un recente studio mostra come, nei topi, la secrezione dell'INSL5 da parte delle cellule L del colon aumenti l'assunzione di cibo⁹⁵.

In accordo con il suo ruolo di ormone che incrementa l'appetito, i livelli di INSL5 circolante aumentano durante il digiuno o i periodi di restrizione calorica e si riducono viceversa con l'assunzione di cibo⁹⁵. Un altro studio ha documentato la riduzione della secrezione insulinica e della presenza di cellule beta nei topi INSL5-/- mice dimostrando quindi un ruolo INSL5 nella regolazione dell'omeostasi glucidica¹⁰⁵. È stato anche osservato che INSL5 aumenta la secrezione di insulina in seguito a stimolo con glucosio sia in vivo che in vitro, suggerendo quindi che possa avere la funzione di incretina¹⁰⁶.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo principale del presente studio è di valutare come la variazione della composizione del microbiota intestinale prima e dopo l'intervento di SG possa influenzare la modificazione del peso corporeo, del profilo metabolico glucidico e lipidico, degli acidi biliari e dei markers infiammatori.

L'obiettivo secondario del presente studio è quello di dimostrare, attraverso il trapianto di feci nei topi germ-free, l'importanza del microbiota intestinale nel determinare le modificazioni evidenziate dopo l'intervento di SG ed individuare i meccanismi che sottendono tali variazioni.

MATERIALI E METODI

Popolazione

Nello studio sono stati arruolati presso DH della UOS Malattie Metaboliche e Diabetologia "Sapienza" Università di Roma 36 pazienti consecutivi ((20 con normale tolleranza glucidica, 6 con diagnosi di diabete di tipo II e 10 con diagnosi di intolleranza glucidica) da Novembre 2014 a Dicembre 2015. Tali pazienti sono stati sottoposti a sleeve gastrectomy laparoscopica secondo la tecnica chirurgica di Gagner¹⁰⁷ presso la UOC Chirurgia Generale & Bariatric Center of Excellence "Sapienza" Università di Roma- Polo Pontino- AUSL LT ICOT.

I criteri di inclusione allo studio erano i seguenti:

- età superiore a 18 anni
- eleggibilità alla chirurgia bariatrica (Sleeve Gastrectomy).

I criteri di esclusione dallo studio erano i seguenti:

- malattia epatica differente dalla Non-alcoholic fatty liver disease
- necessità di trapianto epatico o malattia epatica avanzata con complicanze (sanguinamento da varici o ascite)
- uso di farmaci capaci di peggiorare una steatoepatite o antibiotici, pre-probiotici nei precedenti 3 mesi
- intake etilico > 20 gr di etanolo/die
- uso di vitamina E o olio di pesce nei precedenti 2 mesi
- positività per *Helicobacter Pylori*
- malattie croniche gastrointestinali tra cui anche la stipsi (meno di 2 evacuazioni alla settimana)
- precedente chirurgia (che ne ha modificato l'anatomia) sul tratto gastrointestinale.

Tutti i pazienti sono stati seguiti nel pre-operatorio e a 6 mesi, mentre solo 23 pazienti sono stati esaminati anche a 18 mesi di follow-up dall'intervento chirurgico.

All'arruolamento e a sei mesi dall'intervento di SG i pazienti sono stati sottoposti a:

- compilazione di un questionario di tre giorni riguardante le abitudini alimentari
- misurazione dei parametri antropometrici
- misurazione pressione arteriosa
- prelievo venoso basale

- raccolta di un campione di feci (circa 2 g)
- meal test con 250 ml di Oxepa ® (Abbott, Italy, valori nutrizionale in Tabella 1) con l'esecuzione di ulteriori prelievi ematici a 90 e 120 minuti dall'assunzione del pasto liquido. La quantità totale di calorie somministrate era 750 (55,2% di grassi, 28,1% di carboidrati, 16,7% di proteine)
- Test da carico di glucosio (75 gr) (in un giorno differente rispetto a quando è stato effettuato meal test).

A 18 mesi dall' intervento di SG sono stati sottoposti a:

- prelievo venoso basale
- raccolta di un campione di feci (circa 2 g)
- compilazione di un questionario di tre giorni riguardante le abitudini alimentari
- misurazione dei parametri antropometrici
- misurazione pressione arteriosa.

Nel mese precedente all'intervento a tutti i pazienti è stato suggerito di ridurre l'assunzione di carboidrati ed aumentare quella di proteine al fine ottenere un calo ponderale pari al 5%.

Nel post-operatorio non è stata invece fornita nessuna indicazione dietetica.

Tutti i soggetti hanno assunto acido ursodesossilico (12 mg/kg) nei sei mesi dopo l'intervento chirurgico come prevenzione della formazione dei calcoli della colecisti. Solo n=5 hanno avuto la necessità di proseguire il trattamento a 6 e n=3 a 18 mesi

Nello studio è anche stata anche arruolata una coorte cross-sectional di 27 pazienti a 4 anni dall'intervento di SG. Tali pazienti sono stati sottoposti a:

- compilazione di un questionario di tre giorni riguardante le abitudini alimentari
- misurazione dei parametri antropometrici
- misurazione pressione arteriosa
- prelievo venoso basale
- raccolta di un campione di feci (circa 2 g)
- Test da carico di glucosio (75 gr)

Valutazione del profilo glucidico e lipidico

In tutti i soggetti la glicemia è stata misurata su sangue venoso mediante CONTOUR blood glucose meter, l'insulina è stata misurata mediante saggio immunoenzimatico utilizzando il kit ELISA Human Insulin ELISA (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) e l'INSL5 mediante saggio immunoenzimatico dedicato (ELISA Kit Human Insulin Like Protein 5, Novatein Biosciences, Woburn, MA, USA) seguendo le indicazioni del produttore.

I dosaggi dei lipidi sono stati eseguiti mediante metodi colorimetrici.

Analisi del microbiota intestinale

Estrazione del DNA

Tutti i campioni fecali sono stati raccolti al proprio domicilio dai partecipanti in un contenitore sterile e trasportati all'ospedale dove sono stati immediatamente conservati a -80°C entro 4 ore dalla raccolta.

Al fine di facilitare l'estrazione di DNA, il campione di feci, di peso pari a 100 mg, è stato trattato associando la lisi chimica con Lysing Matrix E (MP Biomedicals) e Lysis buffer (4% w/v SDS; 500 mmol/L NaCl; 50 mmol/L EDTA; 50 mmol/L Tris·HCl; pH 8) alla lisi meccanica (5.0 m/s per 60 secondi nell'omogenizzatore FastPrep®-24-MP Biomedicals). Il campione così ottenuto è stato quindi refrigerato fino al raggiungimento di una temperatura pari a 85°C per 15 minuti ed in seguito centrifugato ad alta velocità per 5 minuti a 4°C. Questo procedimento è stato eseguito in doppio allo scopo di allontanare, il più possibile, la matrice proteica e lipidica dal campione. Dal sovranatante così ottenuto è stato quindi isolato il DNA genomico totale usando il QIAamp DNA mini stool kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) come descritto da Salonen¹⁰⁸.

Metagenomica: sequenziamento ed analisi del DNA microbico.

Frammenti di DNA di lunghezza pari a circa 150 bp, sono stati sequenziati tramite tecnica di *Next Generation Sequencing* (NGS) ovvero sequenziamento in parallelo, utilizzando lo strumento Illumina NextSeq 500 presso la "Genomics Core Facility" dell'Università di Gothenburg.

L'analisi di omologia e di allineamento multiplo delle sequenze ottenute, è stata eseguita utilizzando il software FASTX (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Sono state ritenute idonee soltanto le sequenze di DNA che presentavano una lunghezza minima pari a 35 bp di allineamento ed una soglia minima di omologia non inferiore alle 20 bp. Le sequenze di DNA sono state inoltre selezionate mediante software Bowtie2 al fine di rimuovere stringhe di nucleotidi di origine umana (NCBI version 37)¹⁰⁹ ed, infine, sono state analizzate

mediante la piattaforma Multi-Draft based Scaffolder (MEDUSA) al fine di determinarne l'ordine e l'orientamento corretti¹¹⁰.

Inoltre, esse sono state confrontate tra di loro e con quelle di specie batteriche di riferimento depositate in banche dati dedicate (Bowtie2).

La classificazione tassonomica delle specie presenti è stata ricavata mediante NCBI taxonomy database; mentre, la caratterizzazione dei geni implicati nell'attivazione di diverse vie metaboliche è stata ottenuta mediante KEGG Orthology (KOs) database.

Infine, la quantità relativa di specie batteriche presenti è stata desunta dividendo il numero totale di genomi, classificati secondo i criteri sopra descritti, per il numero totale di sequenze ottenute.

Intervento di Sleeve Gastrectomy nei topi "conventionally raised" (CONV-R) e GF

Trentuno topi maschi Swiss Webster CONV-R (età 13-20 settimane) e ventidue GF (età 11-14 settimane) sono stati randomizzati in gruppi accoppiati per peso corporeo e successivamente sottoposti o a SG o a sham surgery. Nel gruppo dei CONV-R 4 sottoposti *sham surgery* e 10 a SG sono deceduti per complicanze chirurgiche (non capisco quanti CONV sono morti), nel gruppo di topi GF sono stati invece, rispettivamente, 2 e 6. Pertanto, i dati ottenuti da questi topi, non sono stati inclusi nell'analisi.

Il numero finale di topi incluso nello studio è stato quindi pari a 17 topi CONV-R e 14 topi GF. Per quanto riguarda i topi CONV-R, 10 sono stati sottoposti a chirurgia sham mentre 7 ad SG. Per quanto riguarda invece il gruppo dei topi GF, 8 sono stati sottoposti a chirurgia sham mentre 6 sono stati sottoposti a chirurgia.

I topi sono stati allevati in regime dietetico "chow" (Labdiet) ad eccezione dei due giorni precedenti l'intervento chirurgico e dei tre successivi, nei quali invece, hanno seguito una dieta liquida Peptamen (Nestlé Sverige AB, Helsingborg, Sweden).

L'assunzione di cibo e il peso corporeo sono stati monitorati settimanalmente fino alla fine dell'esperimento. Dopo 6 settimane dall'intervento chirurgico, i topi sono stati mantenuti a digiuno per 4 ore e successivamente sacrificati. Gli organi sono stati prelevati e conservati in azoto liquido o fissati in paraformaldeide tamponata al 4%.

Il sangue è stato raccolto in provette Micro tube K3E EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) contenente Aprotinina proteasi inibitore e dipeptidil-peptidasi IV (DPP-4) inibitore.

Tutti gli esperimenti condotti sugli animali sono stati attuati in accordo con le linee guida dettate dal Comitato Etico per le Sperimentazioni Animali dell'Università di Gothenburg (Svezia).

La SG è stata eseguita previa anestesia con isofluorano con incisione laterale dello stomaco e lasciando uno stomaco residuo tubulare in continuità con l'esofago superiormente e con piloro e duodeno inferiormente. La chirurgia sham è stata eseguita mediante analogo isolamento dello stomaco seguito dall'applicazione manuale della pressione con una pinza smussata lungo la linea verticale tra lo sfintere esofageo e il piloro.

La presenza di colonizzazione batterica, nei topi GF, è stato controllata, dopo intervento chirurgico, mediante ricerca del DNA ribosomale batterico 16S. Il gene 16S è stato ricercato, a livello dell'intestino cieco, tramite PCR quantitativa condotta su 30 di 31 contenuti cecali disponibili. Tutti i campioni esaminati sono risultati essere positivi alla presenza del rDNA

microbico 16S indicando, pertanto, una spontanea anche se parziale ricolonizzazione successiva alla chirurgia.

Trapianto fecale nei topi germ-free

Il trapianto fecale, in topi GF, di microbiota umano, ha previsto l'utilizzo di due campioni di feci, raccolte da due pazienti di sesso femminile, prima dell'intervento di SG e a 18 mesi dalla SG.

Il raggiungimento di un normale valore di Body Mass Index (BMI) ($BMI < 25 \text{ Kg/m}^2$, Tabella 2), in seguito ad intervento di SG, è stato il criterio in base al quale sono stati scelti i donatori le cui feci sono state trasferite in topi GF Swiss Webster di sesso femminile (n=5 per ogni campione di donatore).

Approssimativamente 500 mg di feci umane congelate sono state tagliate e sospese in 5 ml di soluzione salina contenente 0.2 g/l di solfuro di sodio e 0.5 g/l cisteina come agente riducente proteico. A questo punto, i topi GF prescelti ed aventi un'età di 10-13 settimane, sono stati colonizzati somministrando 200 μl di soluzione fecale, per due settimane, mediante sonda oro-gastrica e sono stati nutriti con cibo ed acqua sterile.

I topi che hanno ricevuto il trapianto fecale dal medesimo donatore, sono stati ospitati all'interno della stessa gabbia nel modulo ISOcage (Tecniplast, Italy). Il peso corporeo è stato registrato un giorno dopo la colonizzazione e successivamente con cadenza settimanale fino alla fine della sperimentazione. L'assunzione di cibo è stata misurata settimanalmente e la composizione corporea è stata valutata al 1° e al 14° giorno post-

colonizzazione, mediante le immagini ottenute con risonanza magnetica (Echo Medical System, Houston, TX, USA).

Test di tolleranza glucidica nei topi.

Dopo 5 ore di digiuno, il test di tolleranza al glucosio, è stato eseguito mediante somministrazione di glucosio o con sonda orogastrica (3g di glucosio/kg di peso corporeo) o tramite somministrazione intraperitoneale (2g di glucosio/kg di peso corporeo).

Sul campione di sangue prelevato dalla coda è stata misurata la glicemia mediante il misuratore Contour XT (Ascensia Diabetes Care, Basel, Switzerland) prima (30 e 0 minuti) e dopo (15, 30, 60, 90 and 120 min) carico glucidico.

Sul medesimo campione di sangue, raccolto in Microvette CB 300 Z (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Germany) sono stati misurati anche i livelli di insulina mediante saggio immunoenzimatico (Ultra-Sensitive Mouse Insulin kit, Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) seguendo il protocollo consigliato dal produttore .

Topi INSL5 wild type e knock-out sottoposti a SG o chirurgia sham

Trentuno topi maschi wild-type (WT) e trentotto topi maschi knock-out (KO) per INSL5, tutti di età pari a 8-10 settimane sono stati nutriti, per 10 settimane, con una dieta ad alto contenuto di grassi e zuccheri (Adjusted Fat Diet TD.96132, Harlan Teklad, Indianapolis, IN, USA). Quindi, i due gruppi sono stati randomizzati e successivamente 15 WT e 15 KO

sono stati soggetti a chirurgia sham mentre 9 WT e 9 KO-sono stati sottoposti ad intervento SG.

Due topi KO-sham, nove KO-SG e due WT-VSG sono deceduti in seguito ad intervento chirurgico mentre 4 sottoposti a SG di ciascun genotipo hanno presentato un insuccesso della chirurgia dimostrata attraverso un eccessivo allargamento dello stomaco. Gli interventi chirurgici sono stati eseguiti come già precedentemente descritto.

Dopo l'intervento chirurgico i topi hanno proseguito la dieta ad alto contenuto di grassi e zuccheri per ulteriori 12 settimane, il peso corporeo e l'assunzione sono stati monitorati settimanalmente. Al termine delle 12 settimane, i topi sono stati sacrificati ed il sangue e gli organi interni sono stati congelati in azoto liquido.

L'OGTT con il dosaggio di insulina e glicemia sono stata eseguiti come precedentemente descritto.

Estrazione dell'RNA e analisi dell'espressione genica mediante quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

L'RNA è stato isolato dalle biopsie di fegato e ileo murino dopo omogeneizzazione in TissueLyser (Qiagen s.r.l.). I campioni sono stati posti in RTL buffer contenente 2-mercaptoetanololo e la rottura del tessuto è stata facilitata mediante utilizzo di biglie magnetiche da 5 mm (Qiagen s.r.l.).

L'RNA è stato estratto usando il kit RNeasy in accordo con i protocolli descritti dal produttore (Qiagen s.r.l.).

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale, utilizzando il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems Inc, 850 Lincoln Centre Drive Foster City, CA 94404. USA) seguendo il protocollo consigliato dal produttore.

Tutti i campioni di cDNA ottenuti, sono stati quindi saggiati, in duplicato, tramite PCR real time di tipo quantitativo condotta in termociclatore CFX96 Real-Time (Bio-Rad s.r.l) al fine di ricercare.

La quantificazione del DNA è stata ottenuta a partire da 10 ng di cDNA e mediante l'utilizzo di sonde a ibridazione di tipo SYBR (SYBR Green Master Mix , Thermo Scientific).

L'idoneità del campione ottenuto, invece, è stata saggiata mediante amplificazione contemporanea dei geni di interesse insieme con il gene costitutivo L32 (Ribosomal Protein L32).

Infine, la concentrazione relativa dei geni target nel campione incognito è stata determinata utilizzando il metodo del $\Delta\Delta CT$ e la relativa espressione genica.

Misurazione di SCFAs e BCFAs

I SCFAs e BCFAs fecali sono stati misurati mediante gascromatografia associata a spettrometria di massa. In particolare, dai 50 ai 250 mg di feci o contenuto cecale, sono stati miscelati con standard interno, raccolti in provette e congelati.

Quindi si è proceduto ad acidificazione di tutti i campioni mediante acido cloridrico e gli SCFAs sono stati estratti utilizzando una miscela di dietilere al fine di isolarli dalla matrice e di rimuovere eventuali fonti di interferenza, come proteine e zuccheri.

A questo punto, il sovrinatante organico è stato raccolto, l'agente derivatizzante N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamide (Sigma-Aldrich s.r.l. Stockholm, Sweden) è stato aggiunto e i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 12 ore.

SCFAs sono stati quindi identificati e quantificati mediante il gascromatografo 7090A associato allo spettrometro (Agilent Technologies).

Il saggio è stato effettuato utilizzando soluzioni SCFAs standard stabilizzate e a titolo noto.

Misurazione degli acidi biliari e del FGF19

Gli acidi biliari sono stati analizzati utilizzando la cromatografia liquida ad ultra alta prestazione associata alla spettrometria di massa come precedentemente descritto nello studio di Tremaroli et al.¹⁰⁵. Gli acidi biliari sono stati estratti da 25-50 µl di plasma murino o umano utilizzando una miscela proteica di precipitazione in 10 volumi di metanolo contenente gli standard interni.

Dopo averli miscelati e centrifugati, i campioni sono stati lasciati evaporare e ricostituire in una soluzione di metanolo:acqua (1:1) di volume pari a 200 µl.

Per quanto riguarda le feci, un campione di circa 50 mg è stato inserito in una provetta da 2 ml di polipropilene con sei sfere di ceramica (3 mm; Retsch GmbH, Haan, Germany) e 500 µl di standard interno contenente metanolo. Le feci sono state omogenizzate e centrifugate, e il sovrinatante è stato diluito dieci volte in metanolo:acqua (1:1) prima dell'analisi. Gli acidi biliari sono stati separati utilizzando una colonna cromatografica Kinetex C18 (2.1 × 100 mm with 1.7-µm particles) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) tenuta a 60 °C.

La fase mobile è stata composta da una fase mobile A (acqua con 7.5-mM ammonio acetato e 0.019% acido formico, pH 4.5) e fase mobile B (acetonitrile con 0.1% di acido formico). Lo strumento QTRAP 5500 (Sciex, Toronto, Canada) è stato utilizzato per la determinazione degli acidi biliari tramite monitoraggio di reazioni multiple condotte in modalità di ione negativo. Gli acidi biliari standard sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich s.r.l. (Stockholm, Sweden), CDN Isotopes (Quebec, Canada), e Toronto Research Chemicals (Downsview, Ontario, Canada).

La concentrazione plasmatica di FGF19 è stata misurata mediante saggio immunoenzimatico utilizzando il kit ELISA Quantikine Human FGF-19 Immunoassay (R&D Systems, UK) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Analisi dei questionari alimentari

A tutte le tempistiche di studio (pre-SG, 6M e 18M post-SG) l'introito, di macro e micronutrienti dei pazienti è stato stimato tramite l'utilizzo di un diario alimentare di 3 giorni (2 feriali e un festivo) compilato del paziente precedentemente istruito.

È stato registrato l'utilizzo di supplementi nutrizionali, vitaminici e integratori.

Le porzioni sono stati valutate al momento della consegna del diario mediante l'utilizzo di un atlante alimentare.

I dati relativi alla composizione della dieta in termini di calorie, macronutrienti, micronutrienti ed acqua totale sono stati calcolati come media dei tre giorni di rilevazione con il diario alimentare e sono stati poi analizzati tramite un software dedicato e sviluppato nel nostro laboratorio in accordo con le tavole della Banca Dati di composizione degli Alimenti per studi epidemiologici in Italia (<http://www.bda-ieo.it/>).

Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm errore standard o come mediana e intervallo interquartile. E' stata valutata la normalità della distribuzione mediante il test di Kolmogorov-Smirnov ed in base all'esito del test le differenze statistiche tra i gruppi sono state analizzate con i test T di Student per variabili con distribuzione normale o con Mann-Whitney per le variabili con distribuzione non normale. La differenza statistica tra più gruppi per due variabili indipendenti è stata analizzata con l'ANOVA a due vie. Un modello di ANOVA misto è stato utilizzato anche per valutare l'effetto di due fattori (chirurgia e genotipo) nel tempo. In questo modello, il tempo è stato impostato come fattore "entro i soggetti" mentre il microbiota e la chirurgia sono stati impostati come fattori "tra i soggetti". L'analisi statistica dei dati provenienti dallo studio metagenomico è stata seguita con il software R (R Core Team, 2015). Le differenze di abbondanza del genoma microbico, generi e KOs sono state testate con DESeq2 (Love et al., 2014) (version 1.8.2) utilizzando un modello con i timepoint e ID individuali come fattori. E' stato impostato `minReplicatesForReplace=Inf`, diversamente sono state utilizzate le impostazioni di default. I valori della p sono stati aggiustati con il metodo di Benjamini e Hochberg (False

Discovery Rate, FDR, Benjamini and Hocheberg method, 1995). L'analisi di arricchimento di annotazioni biomolecolari KEGG in KOs alterati significativamente dalla chirurgia sono state basate sulla distribuzione ipergeometrici utilizzando il Goseq package (Young et al., 2010). I parametri statisticamente significativi sono stati analizzati con l'analisi della varianza multivariata non-parametrica (Adonis, 999 permutations) (Anderson, 2001).

RISULTATI

Variazioni del profilo metabolico post-SG

I dati mostrati in Tabella 3 evidenziano un miglioramento, rispetto al pre-SG, già dopo 6M del BMI ($p<0.001$), dei valori pressori sia sistolici ($p<0.001$) che diastolici ($p=0.002$), del colesterolo HDL ($p=0.002$), dei trigliceridi ($p<0.001$) e del metabolismo glucidico basale (glicemia $p<0.001$, insulina $p=0.028$, emoglobina glicata $p<0.001$, INSL5 $p=0.020$). Tale miglioramento si instaura precocemente e tende a mantenersi nel tempo come mostra il confronto tra 6M e 18M mostrato in Tabella 3, solo BMI e il colesterolo HDL ($p=0.007$ e $p=0.003$, rispettivamente).

La differenza delle aree sotto la curva (AUC) in corso di OGTT è statisticamente significativa per quanto riguarda i valori glicemia (pre-SG 16598 ± 3678 vs 6M 13143 ± 3505 , $p<0.001$), ed mentre le curve dei valori di insulina durante l'OGTT non differiscono tra pre-SG e dopo 6 mesi dalla SG (pre-SG 8696 ± 5589 vs 7467 ± 5718 , $p=0.378$). Se invece si confrontano di dati pre-SG con il gruppo cross-sectional a 4Y il miglioramento si evidenzia sia per la curva glicemica che insulinemica ($p=0.003$ e $p=0.030$, rispettivamente).

In corso invece di meal test il confronto tra pre-SG e 6M evidenzia un miglioramento unicamente dei trigliceridi (pre-SG 87483 ± 44110 vs 6M 53555 ± 21858 , $p=0.001$) ma non del colesterolo libero e degli esteri del colesterolo (pre-SG 132626 ± 24545 vs 130614 ± 23046 , $p=0.665$) (280356 ± 80253 vs 267442 ± 59355 , $p=0.227$).

Dal confronto tra pre-SG e 6M dei questionari alimentari è emersa una significativa riduzione dell'introito energetico attraverso la riduzione dei macronutrienti (Tabella 4) che

tende invece ad riaumentare a 18M senza mai ritornare ai valori pre-SG. Nel confronto tra i pazienti a 18M e il gruppo cross-sectional 4Y non si evidenziano invece sostanziali differenze (Tabella 4).

La sleeve gastrectomy altera la composizione e il patrimonio genetico del microbiota intestinale umano

La composizione e il patrimonio genetico del microbiota fecale è stato valutato mediante il sequenziamento shotgun dell'intero genoma (22.5 ± 4.8 milioni di paired-end reads/sample, intervallo min-max 11.6-32.6). In paragone con il baseline, la quantità del genoma microbico è aumentata di 119 e 77 rispettivamente dopo SG (Figure 1A-B, Figura 2A; Wald test, $FDR < 0.05$), mostrando una modificazione della composizione complessiva del microbiota rispetto a baseline (Figura 2B).

Circa un terzo del genoma microbico che si è arricchito a 6M apparteneva ai batteri produttori di acido lattico (Firmicutes, es. *Streptococcus*, $n=32$; *Lactobacillus*, $n=2$; and *Enterococcus*, $n=1$), mentre la restante parte includeva altri batteri tipici della cavità orale (es. del genere degli *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium* e *Lautropia*), Proteobacteri and *Akkermansia muciniphila* (Figura 1A). La maggioranza dei genomi significativamente depleti a 6M dopo l'intervento appartenevano ai Firmicutes (27 di 44) e in particolare al genere *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium* e *Ruminococcus* (Figura 1A). A 18M 47 genomi sono risultati significativamente aumentati, di questi 23 appartenevano ai Proteobacteri (es. *Desulfovibrio* e *Enterobacter*) e la restante parte ai Firmicutes ($n=16$, di cui 8

allo *Streptococcus*), agli Actinobatteri (n=7, inclusi i genomi di batteri del cavo orale *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Rothia*) ai *Bacteroides* (n=1) (Figura 1B). Come osservato per i campioni a 6M, la maggior parte dei genomi significativamente depleti a 18 M appartenevano ai Firmicutes (20 di 30) (Figura 1B). 44 di 77 genomi significativamente modificati a 6M erano analogamente modificati a 18M, e in modo particolare erano aumentati gli Actinobatteri orali, i Proteobatteri in particolare *Desulfovibrio* ed *Enterobacter*, e i Firmicutes in particolare *Streptococcus*, *Dethiobacter* e *Heliobacterium*, mentre si osservava una riduzione di *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium* e *Ruminococcus* appartenenti ai Firmicutes (Figura 3).

Nel gruppo di pazienti 4Y paragonati con i pazienti obesi pre-SG la ricchezza del microbiota aumenta in maniera significativa, il 52.2% di tali variazioni sono già presenti a 6M e 18 M post-SG (Figure 2A e 4). In particolare il microbiota intestinale si è arricchito di Actinobatteri di origine orale, *Streptococcus*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter* e *Akkermansia*, mentre si sono ridotti i batteri appartenenti a *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium* e *Ruminococcus* (Figura 3).

Confrontando il gruppo di pazienti a 18M e quello di controllo 4Y si osserva una simile composizione del microbiota (Figura 2A). Tali risultati indicano che la maggior parte delle variazioni si osservano a 6M e 18M dopo SG, in particolare per quanto riguarda la deplezione di diversi genomi nel gruppo dei Firmicutes, e sono durature nel tempo (Figure 3-4).

L'analisi dei geni eseguita mediante database KEGG Orthology (Kanehisa and Goto, 2000), è stata osservata una variazione dell'abbondanza di 264 e 572 funzioni geniche microbiche

rispettivamente a 6M e 18M post-SG (Figura 5). La maggior parte delle funzioni che risultava modificata a 6M si manteneva modificata anche a 18M (Figura 5).

Le funzioni geniche risultavano significativamente diverse tra i campioni pre-SG e i campioni del gruppo di controllo 4Y, quest'ultimo risultava invece sovrapponibile a quello dei pazienti a 18M per il 67% delle funzioni (Figure 5). Di conseguenza, la principal coordinate analysis (PCoA) basata sulle funzioni di 686 geni è risultata significativamente alterata nei campioni a 6M e 18M mostrando un clustering significativo dei campioni pre- vs. post-SG (adonis test based on 5000 permutations, $p < 0.0002$, 0.0004 , 0.0002 per i campioni a 6M, 18M e 4Y vs pre-SG, rispettivamente) così come per i campioni a 6M e 18M (adonis test based on 5000 permutations, $p = 0,030$), il risultato non è stato significativo tra i campioni a 18M e i controlli 4Y (adonis test based on 5000 permutations, $p = 0.210$) (Figura 6). Tali risultati indicano quindi una consistente modificazione nel contenuto funzionale del microbiota intestinale tra i campioni pre-SG e i campioni post-SG.

Pathway enrichment analysis ha mostrato che i geni coinvolti nel ciclo dell'acido citrico, del glicolilato, del butirrato e del metabolismo del carbonio sono aumentati mentre i geni coinvolti nel metabolismo del solfuro e la biosintesi degli aminoacidi, in particolare di quelli a catena ramificata sono ridotti dopo SG a tutti i diversi timing di misurazione e nel gruppo di controllo 4Y (Figure 7, Tabelle 5-7).

Al fine di valutare l'effetto del microbiota intestinale sul metabolismo microbico dei carboidrati e degli aminoacidi sono stati valutati i livelli fecali di SCFAs e di BCFAs e è stato osservato che i livelli di SCFAs totali, acetato e propionato tendono ad aumentare a 6M post-SG ma a diminuire a 18 M e nei campioni a 4Y (Figure 8A-D).

I livelli totali di BCFAs, isobutirrato e isovalerato, invece, aumentano anch'essi significativamente a 6M e tendono ad aumentare anche a 18 M e nei campioni a 4Y (Figure 7E-G).

Si verifica quindi una riduzione del rapporto SCFA/BCFA in tutti i campioni post-SG (Figure 8H), indicando un rapido effetto della SG sul processo di fermentazione microbica ed il viraggio verso la fermentazione proteica. Sebbene non ci sia una modificazione significativa nel rapporto proteine/fibre assunte con la dieta, questi risultati questi risultati potrebbero essere compatibili con la significativa diminuzione del rapporto carboidrati/proteine che si osserva per i pazienti a 6M e a 18M post-SG rispetto al pre-SG (Tabella 3).

Il rapporto carboidrati/proteine è risultato invece simile tra i pazienti obesi pre-SG e il gruppo di controllo a 4Y (Tabella 3), stando ad indicare che il cambiamento dell'attività di fermentazione microbica osservato non è totalmente correlato alle modificazioni delle abitudini dietetiche, ma potrebbe essere invece associato alla quantità totale di calorie assunte.

Trasferimento del profilo metabolico dei pazienti sottoposti ad SG ai topi GF attraverso il trapianto fecale di microbiota

Al fine di valutare se le modifiche del microbiota intestinale dei pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica fossero responsabili delle modificazioni del profilo metabolico della SG, è stato trapiantato il microbiota fecale di due pazienti donne pre-SG e 18M post-SG in topi

GF di sesso femminile (le caratteristiche cliniche delle donatrici sono riassunte in Tabella 2). Due settimane dopo la colonizzazione è stato eseguito il test di tolleranza al glucosio intraperitoneale (ipGTT) che ha mostrato una riduzione dei livelli di glicemia basale (Figure 9A) e un miglioramento della tolleranza glucidica (Figure 9B-C) nei topi che hanno ricevuto il microbiota post-SG. Il miglioramento del metabolismo glucidico non appare correlato alla riduzione né del peso né dell'adiposità del topo che ha ricevuto il microbiota post-SG (Figure 9D-H). Tali risultati indicano come la variazione del microbiota intestinale documentata post-SG contribuisca direttamente al miglioramento del metabolismo glucidico e sia un fattore indipendente dal peso corporeo e dall'adiposità.

I miglioramenti osservati dopo SG necessitano della variazione del microbiota intestinale?

Al fine di valutare se i miglioramenti osservati post-SG necessitino della variazione del microbiota intestinale è stata eseguita una SG su topi CONV-R e topi GF. E' stato quindi creato un gruppo di topi CONV-R e di topi GF che sono stati sottoposti a chirurgia sham.

La chirurgia (SG o sham) è stata eseguita al di fuori dell'ambiente sterile dell'isolatore causando quindi una colonizzazione spontanea dei topi sia durante che post-intervento. La caratterizzazione dei taxa microbici nel ceco dei topi ha rilevato la presenza di un microbiota scarsamente complesso dominato da solo nove taxa che si riscontrano comunemente sulla cute e sulle superfici ma non tipici dell'ambiente intestinale. La colonizzazione dei topi GF ha portato ad una normalizzazione dell'adiposità ai livelli dei

topi CONV-R, però non ha modificato altre peculiarità fenotipiche dei topi GF come l'ingrandimento del ceco, i ridotti livelli cecali di SCFAs, l'aumento del GLP-1 circolante e la scarsa differenziazione del pool degli acidi biliari, stando ad indicare che questi aspetti fisiologici sono regolati da specifici batteri intestinali.

E' stato evidenziato come i topi CONV-R e sottoposti a SG presentano una riduzione del peso corporeo dopo quattro settimane del 12%, mentre quelli sottoposti a chirurgia sham del 1,5% dopo sei settimane (Figura 10A).

Diversamente, i topi GF sottoposti ad SG hanno raggiunto una perdita di peso del 6,8% mentre quelli sottoposti a chirurgia sham hanno mostrato un iniziale perdita di peso a cui è seguito un recupero del peso corporeo iniziale alla fine dell'esperimento (Figura 10A).

A sei settimane dall'intervento chirurgico i topi sono stati sottoposti ad un test di tolleranza al glucosio. I topi CONV-R sottoposti ad a SG hanno presentato un significativo miglioramento rispetto ai gruppi sottoposti a chirurgia sham, oltre che del peso corporeo (Figura 10B), anche dei livelli basali di glicemia (Figura 10C) ed insulina (Figura 10D) associati ad una migliore tolleranza glucidica (Figure 10E ed 10F). Nel gruppo dei topi GF non si osservava invece diversa tolleranza glucidica tra il gruppo dei topi sottoposti ad SG e quelli sottoposti a chirurgia sham (Figura 10F)

La misurazione dell'insulinemia a 15 minuti dal carico orale di glucosio ha evidenziato una migliore capacità di rilascio della stessa in entrambi i gruppi di topi sottoposti a SG rispetto ai gruppi di topi sottoposti a chirurgia sham (Figura 10G).

Al fine di misurare il grado di insulino-resistenza è stato deciso di calcolare dell'HOMA-index. Il calcolo ha evidenziato una riduzione dell'insulino-resistenza nel gruppo dei topi

CONV-R e sottoposti a SG, mentre nessuna differenza è stata evidenziata comparando i topi GF sottoposti ad SG e i gruppi dei topi sottoposti a chirurgia sham (Figura 10H).

In fine, dalla valutazione della composizione corporea e l'istologia del grasso bianco, è stata osservata una riduzione della massa grassa e della grandezza degli adipociti in entrambi i gruppi sottoposti a SG rispetto ai gruppi sottoposti a chirurgia sham ((Figure 10I-J, Figure 11A-C) ad indicare che la SG reduce l'adiposità indipendentemente dalla presenza del microbiota. Lo stato infiammatorio del grasso bianco, misurato come la presenza di strutture a corona non è risultato influenzato né dal tipo di chirurgia né dal tipo di colonizzazione (Figure 11D).

SG nell'uomo e nel topo è associata con l'aumento dell'FXR intestinale

Nello studio di Ryan et al (2014) è stato dimostrato come il signaling degli acidi biliari (BAs) attraverso il recettore di FXR è indispensabile per ottenere gli effetti benefici dall'intervento di SG. Tuttavia per determinare se la SG agisce sul metabolismo degli BAs e sul signaling di FXR nella corte di pazienti in studio sono stati misurati i livelli di BAs ed di FGF19 a digiuno e nei campioni raccolti durante il meal test eseguito pre-SG e a 6M post-SG. Tali misurazioni hanno evidenziato come i valori post-prandiali dopo SG degli BAs fossero più elevati, principalmente per l'aumento degli BAs coniugati secondari (Tabelle 8-9, Figure 12-13). Oltre all'incremento degli BAs è stato osservato anche l'aumento del FGF19 circolante sia nei campioni basali che in quelli post-prandiali post-SG (Tabelle 8-9, Figure 12-13). La misurazione di C4, precursore degli BAs, ha messo in evidenza che ad alti livelli di FGF19 sono associate ridotti livelli di C4 ed una ridotta sintesi degli acidi biliari. In considerazione del riscontro di un aumento degli BAs secondari, è stato ipotizzato che il ruolo

dell'alterazione del microbiota intestinale in tale contesto sia nell'induzione del signaling di FXR. Per dimostrarlo è stata determinata l'espressione ileale di FGF15 (analogo murino di FGF19), come indice di attivazione di FXR, a livello dell'intestino dei topi GF sottoposti a trapianto di feci dai campioni dei pazienti 18M post-SG. I dati hanno mostrato un incremento dell'espressione di FGF15 ($p < 0,050$). Dati analoghi sono stati osservati nei topi CONV-R sottoposti a SG ($p < 0,050$) ma non nei topi GF sottoposti a SG ($p = 0,170$). In conclusione i risultati mostrano come il microbiota intestinale post-SG possa aumentare il livello di attivazione di FXR, modulare la sintesi degli acidi biliari e influenzare il metabolismo dell'ospite.

Ruolo dell'INSL5 e miglioramento del profilo glucidico post-SG

In considerazione del fatto che l'INSL5 dell'ospite aumenta dopo SG sia per quanto riguarda i valori basali sia durante il meal test in associazione con gli altri miglioramenti metabolici, è stato deciso di valutarne il suo ruolo post-SG nei topi. I dati hanno mostrato che i topi presentano una riduzione del peso e del grasso corporeo indipendentemente dal genotipo (WT vs KO) ma unicamente legato al tipo di chirurgia (SG vs sham, peso corporeo $p < 0,001$ e grasso corporeo $p < 0,001$, Figura 14A-C), l'unica differenza, anche se non statisticamente significativa, è stata che nel gruppo KO-SG tali modificazioni si presentavano più lentamente (Figura 14A-C).

Al fine di investigare il ruolo di INSL5 nelle modificazioni del profilo glucidico post-SG è stata eseguita una OGTT. I dati ottenuti hanno confermato il ruolo della SG nel

miglioramento della glicemia sia basale che in corso di OGTT (Figura 15A-B, $p < 0.001$ e $p < 0,001$ rispettivamente) senza differenza nei due genotipi.

L'insulinemia è stata valutata a 0 e 15 minuti dopo il carico di glucosio, tali misurazioni hanno messo in evidenza che i livelli basali di insulina sono inferiori (-50% circa) nei topi KO rispetto ai WT sia dopo SG che dopo sham (Figura 15C, effetto della chirurgia, $p < 0.001$ e del genotipo $p < 0.01$) e si riducono similmente dopo SG in entrambi i genotipi ($p < 0.001$). Nei campioni raccolti dopo 15 minuti dal carico di glucosio, i livelli di insulina sono risultati aumentati in tutti gli animali, i topi KO indipendentemente dalla chirurgia presentavano valori assoluti inferiori (Figura 15C) ma rispetto al valore basale tutti presentavano la stessa capacità di incrementare la secrezione (Figura 15D).

Tali dati suggeriscono quindi che INSL5 nei topi non svolge alcun ruolo nella riduzione del peso corporeo e nel miglioramento del profilo glucidico post-SG.

DISCUSSIONE

I dati raccolti durante lo studio longitudinale hanno dimostrato che la SG provoca una modificazione consistente del microbiota intestinale entro i primi 6 mesi, che prosegue ulteriormente in misura meno evidente, per poi stabilizzarsi dopo 18 mesi dalla procedura chirurgica, come è stato evidenziato dal confronto con la coorte cross-section di paziente arruolati a 4 anni dalla SG. Le modificazioni messe in rilievo non riguardano solo la quantità e la tassonomia del microbiota intestinale ma anche l'insieme delle funzioni geniche e metaboliche che esso svolge in particolare per quanto riguarda il metabolismo dei carboidrati e la regolazione degli acidi biliari.

La caratterizzazione longitudinale del microbiota umano ha rivelato la forte modulazione della composizione tassonomica determinata dalla SG; già sei mesi post-intervento è stato osservato un aumento dei batteri produttori di acido lattico (specie appartenenti agli *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Enterococcus*), degli Actinobatteri del genere *Rothia*, e dei Proteobatteri dei generi *Desulfovibrio*, *Enterobacter* e *Lautropia*. Al contrario è stata osservata una riduzione dei livelli dei batteri appartenenti al Clostridium cluster XIVa: *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium* e *Ruminococcus*. Una riduzione dei Clostridia post-SG, è stata già evidenziata in un piccolo studio di Damms-Machado⁷³ e potrebbe rappresentare la conseguenza della ridotta introduzione di fibre con la dieta che si verifica nei primi mesi post-SG¹¹¹⁻¹¹³ o ad una variazione del pH intestinale che potrebbe essere anche la causa dell'aumento dei Proteobatteri (es. *Desulfovibrio* e *Lautropia*), dei produttori di acido lattico (es. *Desulfovibrio* e *Lautropia*) e dei batteri di origine orale (es. *Rothia*)^{114,115}.

La modificazione tassonomica del microbiota intestinale si traduce anche in una modificazione dell'espressione genica dello stesso come ad esempio l'aumento dei geni coinvolti del metabolismo del gliossilato. Tale variazione è associata in particolare all'aumento dei Proteobatteri che sono noti produttori di acetato. Il metabolismo del gliossilato è un pathway metabolico tipico dei batteri e delle piante ed assente invece nei soggetti vertebrati. Tale metabolismo consente, in assenza di zuccheri semplici, di produrre carboidrati a partire dagli acidi grassi e probabilmente rappresenta un adattamento alla ridotta assunzione di carboidrati post-SG. Mentre la riduzione dei Clostridia induce una minor proteolisi con calo degli aminoacidi ramificati circolanti e conseguente miglioramento del profilo glucidico, come già descritto in letteratura^{93,94}.

L'esperimento condotto sui topi GF che hanno ricevuto il microbiota post-SG delle due donatrici ha evidenziato che il microbiota induce un miglioramento del profilo glucidico indipendente dalla perdita di peso.

Al fine di chiarire se il microbiota intestinale sia indispensabile per la comparsa dei benefici indotti dalla SG è stato condotto un secondo esperimento sottoponendo topi GF e CONV-R alla SG ed evidenziando come i benefici della SG si instaurano unicamente in presenza di un microbiota intestinale intatto.

In base ai dati ottenuti nei pazienti pre e post-SG è stato ipotizzato che le modificazioni del microbiota portassero ad un aumento del rilascio a parte delle cellule L intestinali di INSL5 e che tale ormone potesse svolgere un ruolo chiave nel determinare sia la perdita di peso che il miglioramento del profilo glucidico post-SG. Purtroppo l'esperimento condotto su

topi WT e KO per il gene di INSL5 ha mostrato che, nei topi, INSL5 non è indispensabile per ottenere il miglioramento clinico suddetto.

L'analisi degli acidi biliari ha evidenziato che la SG induce, oltre alle modificazioni già enunciate, una modificazione del metabolismo degli acidi biliari, sia negli uomini che nei topi, anche in questo caso la modificazione è precoce (6M) e tende a stabilizzarsi con il tempo. Tale variazione è stata evidenziata sia nei valori basali che nei valori in corso di meal test. I dati ottenuti mostrano come ci sia una riduzione del C4, precursore degli acidi biliari, e degli acidi biliari primari con concomitante aumento degli acidi biliari secondari e degli acidi biliari totali. A fronte di tali risultati è stato valutato anche l'FGF19/FGF15 (umano/murino) che in seguito ad SG tende ad aumentare. Tali dati mostrano quindi come la SG sia allo stesso tempo un attivatore di FXR e abbia invece una funzione down-regolatoria sugli acidi biliari primari. Come già dimostrato da Feng et al.¹¹⁶ l'attivazione selettiva del recettore FXR a livello intestinale è associata ad un miglioramento del peso corporeo, dell'infiammazione globale e del profilo glucidico.

In conclusione lo studio ha dimostrato che il valore terapeutico della SG non è totalmente riconducibile alla riduzione dell'introito dietetico, ma il meccanismo di azione suggerito, dai dati ottenuti nel corso di questo studio e dalla letteratura attuale¹¹⁷, è che il microbiota induca una modificazione del metabolismo degli acidi biliari e quindi del signaling prodotto dagli stessi attraverso FXR e TGR5 e che tali modificazioni siano indispensabili a produrre i benefici indotti dalla SG sia in termini di peso corporeo che sul profilo metabolico. L'attivazione selettiva di FXR nel piccolo intestino potrebbe quindi rappresentare un pathway metabolico utile per mimare gli effetti della chirurgia bariatrica.

BIBLIOGRAFIA

1. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837-848.
2. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10452-10459
3. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
4. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;488:178-184.
5. Walker AW, Ince J, Duncan SH, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 2011;5:220-230.
6. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008;6:e280.
7. Choi M et al. Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat Med*. 2006;12:1253-1255.
8. Kir S et al. FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science*. 2011;331:1621-1624.
9. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:776-788.
10. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-1359.

11. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol* 2007;19:59-69.
12. Muszer M, Noszczyńska M, Kasperkiewicz K, Skurnik M. Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015 Aug;63(4):287-98.
13. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-1920.
14. Musso G, Gambino R, Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med* 2011;62:361-380.)
15. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Transl Res* 2012;160:246-257.
16. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010;466:334-338.
17. Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Dig Liver Dis* 2015;47:1007-1012.
18. Parks D. J. et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999;284:1365-1368.
19. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207–214.

20. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
21. Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, Bittinger K, Chen J, Laughlin A, Grunberg S, Baldassano RN, Lewis JD, Li H, Thom SR, Bushman FD, Vinogradov SA, Wu GD. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* 2014;147:1055-1063 e1058.
22. Kohl KD, Stengel A, Samuni-Blank M, Dearing MD. Effects of anatomy and diet on gastrointestinal pH in rodents. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2013;319:225-229.
23. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;47:241-259.
24. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:859-904.
25. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 2013;43:198–21

26. Lorenza Putignani, Federica Del Chierico, Andrea Petrucca, Pamela Vernocchi, Bruno Dallapiccola. The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res.* 2014 Jul;76(1):2-10
27. Richard W. Stephens, Lidia Arhire, and Mihai Covasa. Gut Microbiota: From Microorganisms to Metabolic Organ Influencing Obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2018 May;26(5):801-809
28. WHO data (<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>).
29. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008;3:213-223.
30. Ley RE, Turnbaugh PJ, lein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022-1023.
31. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. di. *Nature* 2006;444:1027-1031.
32. Furet JP, Kong LC, Tap J, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 2010;59:3049-3057.
33. Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15718-15723.

34. Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccach D, Raoult D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 2009;4:e7125.
35. Million M, Maraninchi M, Henry M, et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:817-825.
36. Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015;18:515-520
37. Kallus SJ, Brandt LJ. The intestinal microbiota and obesity. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:16-24).
38. Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul M. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:305-313
39. Gao R, Zhu C, Li H, Yin M, Pan C, Huang L, Kong C, Wang X, Zhang Y, Qu S, Qin H. Dysbiosis Signatures of Gut Microbiota Along the Sequence from Healthy, Young Patients to Those with Overweight and Obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2018 Feb;26(2):351-361.
40. Tai N, Wong FS, Wen L. The role of gut microbiota in the development of type 1, type 2 diabetes mellitus and obesity. *Rev Endocr Meta Disord*. 2015;16:55–65.
41. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012;3:279–88.

42. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun.* 2013;4:1829.
43. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut.* 2009;58:1091–103.
44. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012;490:55–60.
45. Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, Fontes G, Poitout V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- κ B signalling. *PLoS One.* 2012;7:e36200.
46. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, Ueno M, Prada PO, Ropelle ER, Hirabara SM, Castoldi A, Vieira P, Camara NO, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol.* 2011;9:e1001212.
47. Dali-Youcef N, Mecili M, Ricci R, Andres E. Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. *Ann Med.* 2013;45:242–53
48. Tanti JF, Ceppo F, Jager J, Berthou F. Implication of inflammatory signalling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:181.
49. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1546-58.

50. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010;5:e9085.
51. Lê KA, Li Y, Xu X, Yang W, Liu T, Zhao X, et al. Alterations in fecal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in type 2 diabetic patients in Southern China population. *Front Physiol* 2013;3:496.
52. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54(Pt 5):1469–76.
53. Carlsson, L.M., Peltonen, M., Ahlin, S., Anveden, A., Bouchard, C., Carlsson, B., Jacobson, P., Lonroth, H., Maglio, C., Naslund, I., et al. (2012). Bariatric surgery and prevention of type 2 diabetes in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 367, 695-704.
54. Dixon, J.B., le Roux, C.W., Rubino, F., and Zimmet, P. (2012). Bariatric surgery for type 2 diabetes. *Lancet* 379, 2300-2311.
55. Rubino, F., Nathan, D.M., Eckel, R.H., Schauer, P.R., Alberti, K.G., Zimmet, P.Z., Del Prato, S., Ji, L., Sadikot, S.M., Herman, W.H., et al. (2016). Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations. *Diabetes care* 39, 861-877
56. Kizy S, Jahansouz C, Wirth K, Ikramuddin S, Leslie D. Bariatric Surgery: A Perspective for Primary Care. *Diabetes Spectr.* 2017 Nov;30(4):265-276.)
57. Peterli R, Wölnerhanssen B, Peters T, Devaux N, Kern B, Christoffel-Courtin C, Drewe J, von Flüe M, Beglinger C. Improvement in glucose metabolism after bariatric

surgery: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective randomized trial. *Ann Surg*. 2009 Aug;250(2):234-41.

58. Schauer, P.R., Kashyap, S.R., Wolski, K., Brethauer, S.A., Kirwan, J.P., Pothier, C.E., Thomas, S., Abood, B., Nissen, S.E., and Bhatt, D.L. (2012). Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med* 366, 1567-1576)
59. Debs, T., Petrucciani, N., Kassir, R., Iannelli, A., Amor, I.B., and Gugenheim, J. (2016). Trends of bariatric surgery in France during the last 10 years: analysis of 267,466 procedures from 2005-2014. *Surg Obes Relat Dis* 12, 1602-1609.
60. Lecube, A., de Hollanda, A., Calanas, A., Vilarrasa, N., Rubio, M.A., Breton, I., Goday, A., Vidal, J., Iglesias, P., Fernandez-Soto, M.L., et al. (2016). Trends in Bariatric Surgery in Spain in the Twenty-First Century: Baseline Results and 1-Month Follow Up of the RICIBA, a National Registry. *Obes Surg* 26, 1836-1842.
61. Stefater, M.A., Wilson-Perez, H.E., Chambers, A.P., Sandoval, D.A., and Seeley, R.J. (2012). All bariatric surgeries are not created equal: insights from mechanistic comparisons. *Endocr Rev* 33, 595-622.
62. Pories, W.J., Swanson, M.S., MacDonald, K.G., Long, S.B., Morris, P.G., Brown, B.M., Barakat, H.A., deRamon, R.A., Israel, G., Dolezal, J.M., et al. (1995). Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Annals of surgery* 222, 339-350; discussion 350-332.
63. Albaugh, V.L., Banan, B., Ajouz, H., Abumrad, N.N., and Flynn, C.R. Bile acids and bariatric surgery. *Mol Aspects Med* 2017:56:75-89

64. le Roux, C.W., Aylwin, S.J., Batterham, R.L., Borg, C.M., Coyle, F., Prasad, V., Shurey, S., Ghatei, M.A., Patel, A.G., and Bloom, S.R. (2006). Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 243, 108-114.
65. Graessler, J., Qin, Y., Zhong, H., Zhang, J., Licinio, J., Wong, M.L., Xu, A., Chavakis, T., Bornstein, A.B., Ehrhart-Bornstein, M., et al. (2013). Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J* 13, 514-522.
66. Ilhan, Z.E., DiBaise, J.K., Isern, N.G., Hoyt, D.W., Marcus, A.K., Kang, D.W., Crowell, M.D., Rittmann, B.E., and Krajmalnik-Brown, R. (2017). Distinctive microbiomes and metabolites linked with weight loss after gastric bypass, but not gastric banding. *ISME J*.
67. Kong, L.C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouillot, J.L., Zucker, J.D., Dore, J., and Clement, K. (2013). Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr* 98, 16-24.
68. Murphy, R., Tsai, P., Jullig, M., Liu, A., Plank, L., and Booth, M. (2017). Differential Changes in Gut Microbiota After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy Bariatric Surgery Vary According to Diabetes Remission. *Obes Surg* 27, 917-925.
69. Palleja, A., Kashani, A., Allin, K.H., Nielsen, T., Zhang, C., Li, Y., Brach, T., Liang, S., Feng, Q., Jorgensen, N.B., et al. (2016). Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese

patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med* 8, 67

70. Tremaroli, V., Karlsson, F., Werling, M., Stahlman, M., Kovatcheva-Datchary, P., Olbers, T., Fandriks, L., le Roux, C.W., Nielsen, J., and Backhed, F. (2015). Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab* 22, 228-238.

71. Ward, E.K., Schuster, D.P., Stowers, K.H., Royse, A.K., Ir, D., Robertson, C.E., Frank, D.N., and Austin, G.L. (2014). The effect of PPI use on human gut microbiota and weight loss in patients undergoing laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 24, 1567-1571 (Zhang et al., 2009)

72. Zhang H., DiBaise J.K., Zuccolo A., Kudrna D., Braidotti M., Yu Y., Parameswaran P., Crowell M.D., Wing R., Rittmann B.E., Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106:2365–2370

73. Damms-Machado, A., Mitra, S., Schollenberger, A.E., Kramer, K.M., Meile, T., Konigsrainer, A., Huson, D.H., and Bischoff, S.C. (2015). Effects of surgical and dietary weight loss therapy for obesity on gut microbiota composition and nutrient absorption. *Biomed Res Int* 2015, 806248

74. Liu, R., Hong, J., Xu, X., Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., Shi, J., Zhao, S., Liu, W., Wang, X., et al. (2017). Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*

75. Liou, A.P., Paziuk, M., Luevano, J.M., Jr., Machineni, S., Turnbaugh, P.J., and Kaplan, L.M. (2013). Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med* 5, 178ra141.
76. Chambers AP, Jessen L, Ryan KK, Sisley S, Wilson-Pérez HE, Stefater MA, Gaitonde SG, Sorrell JE, Toure M, Berger J, D'Alessio DA, Woods SC, Seeley RJ, Sandoval DA Weight-independent changes in blood glucose homeostasis after gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in rats. *Gastroenterology*. 2011 Sep;141(3):950-8
77. Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Sigalet DL, Berthoud HR. Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1588-97.
78. Chambers AP, Stefater MA, Wilson-Perez HE, Jessen L, Sisley S, Ryan KK, Gaitonde S, Sorrell JE, Toure M, Berger J, D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ, Woods SC. Similar effects of roux-en-Y gastric bypass and vertical sleeve gastrectomy on glucose regulation in rats. *Physiol Behav*. 2011 Nov 30;105(1):120-3
79. Gutzwiller JP, Degen L, Heuss L, Beglinger C. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and eating. *Physiol Behav*. 2004 Aug;82(1):17-9.
80. Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):69-72.

81. Vrang N, Madsen AN, Tang-Christensen M, Hansen G, Larsen PJ. PYY(3-36) reduces food intake and body weight and improves insulin sensitivity in rodent models of diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Aug;291(2):R367-75
82. Ayala JE1, Bracy DP, James FD, Julien BM, Wasserman DH, Drucker DJ. The glucagon-like peptide-1 receptor regulates endogenous glucose production and muscle glucose uptake independent of its incretin action. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1155-64.
83. Hvidberg A, Nielsen MT, Hilsted J, Orskov C, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107amide) on hepatic glucose production in healthy man. *Metabolism*. 1994 Jan;43(1):104-8.
84. Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Dec;8(12):728-42.
85. Sandoval DA, Bagnol D, Woods SC, D'Alessio DA, Seeley RJ. Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes*. 2008 Aug;57(8):2046-54. doi: 10.2337/db07-1824
86. Cani PD, Hoste S, Guiot Y, Delzenne NM. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br J Nutr* 2007;98:32-37.
87. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16767-16772.
88. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR,

- Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 2003;278:11312-11319.
89. Hoverstad T, Midtvedt T. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J Nutr* 1986;116:1772-1776.
90. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* 1990;70:567-590.
91. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 2013;54:2325-2340.
92. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakai C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009;10:167-177.
93. Bloomgarden Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes*. 2018 May;10(5):350-352.
94. Saad MJA, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* 31: 283–293, 2016
95. Grosse J, Heffron H, Burling K, Akhter Hossain M, Habib AM, Rogers GJ, Richards P, Larder R, Rimmington D, Adriaenssens AA, Parton L, Powell J, Binda M, Colledge WH, Doran J, Toyoda Y, Wade JD, Aparicio S, Carlton MB, Coll AP, Reimann F, O'Rahilly S, Gribble FM. Insulin-like peptide 5 is an orexigenic gastrointestinal hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 29;111(30):11133-8.

96. Lee YS, De Vadder F, Tremaroli V, Wichmann A, Mithieux G, Bäckhed F. Insulin-like peptide 5 is a microbially regulated peptide that promotes hepatic glucose production. *Mol Metab.* 2016 Jan 25;5(4):263-270.
97. Conklin D, Lofton-Day CE, Haldeman BA, Ching A, Whitmore TE, Lok S, Jaspers S. Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics* 1999;60:50-56.
98. Akhter Hossain M, Bathgate RA, Kong CK, Shabanpoor F, Zhang S, Haugaard-Jonsson LM, Rosengren KJ, Tregear GW, Wade JD. Synthesis, conformation, and activity of human insulin-like peptide 5 (INSL5). *Chembiochem* 2008;9:1816-1822.
99. Liu C, Kuei C, Sutton S, Chen J, Bonaventure P, Wu J, Nepomuceno D, Kamme F, Tran DT, Zhu J, Wilkinson T, Bathgate R, Eriste E, Sillard R, Lovenberg TW. INSL5 is a high affinity specific agonist for GPCR142 (GPR100). *J Biol Chem* 2005;280:292-300.
100. Sutton SW, Bonaventure P, Kuei C, Nepomuceno D, Wu J, Zhu J, Lovenberg TW, Liu C. G-protein-coupled receptor (GPCR)-142 does not contribute to relaxin-3 binding in the mouse brain: further support that relaxin-3 is the physiological ligand for GPCR135. *Neuroendocrinology* 2005;82:139-150.
101. Belgi A, Hossain MA, Shabanpoor F, Chan L, Zhang S, Bathgate RA, Tregear GW, Wade JD. Structure and function relationship of murine insulin-like peptide 5 (INSL5): free C-terminus is essential for RXFP4 receptor binding and activation. *Biochemistry* 2011;50:8352-8361.
102. Mashima H, Ohno H, Yamada Y, Sakai T, Ohnishi H. INSL5 may be a unique marker of colorectal endocrine cells and neuroendocrine tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432:586-592.

103. Thanasupawat T, Hammje K, Adham I, Ghia JE, Del Bigio MR, Krcek J, Hoang-Vu C, Klonisch T, Hombach-Klonisch S. INSL5 is a novel marker for human enteroendocrine cells of the large intestine and neuroendocrine tumours. *Oncol Rep* 2013;29:149-154.
104. Bathgate RA, Halls ML, van der Westhuizen ET, Callander GE, Kocan M, Summers RJ. Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol Rev* 2013;93:405-480.
105. Burnicka-Turek O, Mohamed BA, Shirneshan K, Thanasupawat T, Hombach-Klonisch S, Klonisch T, Adham IM. INSL5-deficient mice display an alteration in glucose homeostasis and an impaired fertility. *Endocrinology* 2012;153:4655-4665.
106. Luo X, Li T, Zhu Y, Dai Y, Zhao J, Guo ZY, Wang MW. The insulinotrophic effect of insulin-like peptide 5 in vitro and in vivo. *Biochem J* 2015;466:467-473.
107. Silecchia, G., Boru, C., Pecchia, A., Rizzello, M., Casella, G., Leonetti, F., and Basso, N. (2006). Effectiveness of laparoscopic sleeve gastrectomy (first stage of biliopancreatic diversion with duodenal switch) on co-morbidities in super-obese high-risk patients. *Obesity surgery* 16, 1138-1144.
108. Salonen, A., Nikkila, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R.A., Palva, A., and de Vos, W.M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods* 81, 127-134.
109. Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 9, 357-359.

110. Karlsson, F.H., Nookaew, I., and Nielsen, J. (2014). Metagenomic data utilization and analysis (MEDUSA) and construction of a global gut microbial gene catalogue. *PLoS computational biology* 10, e1003706
111. Cotillard, A., Kennedy, S.P., Kong, L.C., Prifti, E., Pons, N., Le Chatelier, E., Almeida, M., Quinquis, B., Levenez, F., Galleron, N., et al. (2013). Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585-588.
112. Duncan, S.H., Lobley, G.E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A.M., Louis, P., and Flint, H.J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)* 32, 1720-1724
113. De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., and Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14691-14696.)
114. Imhann, F., Bonder, M.J., Vich Vila, A., Fu, J., Mujagic, Z., Vork, L., Tigchelaar, E.F., Jankipersadsing, S.A., Cenit, M.C., Harmsen, H.J., et al. (2016). Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* 65, 740-748.
115. Jackson, M.A., Goodrich, J.K., Maxan, M.E., Freedberg, D.E., Abrams, J.A., Poole, A.C., Sutter, J.L., Welter, D., Ley, R.E., Bell, J.T., et al. (2016). Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut* 65, 749-756.
116. Yan X, Li P, Tang Z, Feng B. The relationship between bile acid concentration, glucagon-like-peptide 1, fibroblast growth factor 15 and bile acid receptors in rats during progression of glucose intolerance. *BMC Endocr Disord.* 2017 Sep 25;17(1):60.

117. Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R, Wilson-Pérez HE, Sandoval DA, Kohli R, Bäckhed F, Seeley RJ. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 2014 May 8;509(7499):183-8. doi: 10.1038/nature13135. Epub 2014 Mar 26.

TABELLE

Table 1 Oxepa nutritional value (meal test)

For 250 ml	Value	%RDI/%DV
Protein, g	14.8	
Fat, g	22.2	
Carbohydrate, g	25.0	
Taurine, mg	75	
L-Carnitine, mg	43	
Water, g	186	
Calories	355	
Vitamin A, IU	2840	57
Beta-Carotene, mg	1.2	
Vitamin D, IU	100	25
Vitamin E, IU	75	250
Vitamin K, mcg	20	25
Vitamin C, mg	205	340
Folic Acid, mcg	200	50
Vitamin B1, mg	0.75	50
Vitamin B2, mg	0.85	50
Vitamin B6, mg	1.0	50
Vitamin B12, mcg	3.0	50
Niacin, mg	10	50
Choline, mg	150	NA
Biotin, mcg	150	50
Pantothenic Acid, mg	5.0	50
Sodium, mEq	13.5	NA
Potassium, mEq	11.9	NA
Chloride, mEq	11.3	12
Calcium, mg	250	25
Phosphorus, mg	250	25
Magnesium, mg	100	25
Iodine, mcg	38	25
Manganese, mg	1.3	65
Copper, mg	0.50	25
Zinc, mg	5.7	38
Iron, mg	4.5	25
Selenium, mcg	18	26
Chromium, mcg	30	25
Molybdenum, mcg	38	51

RDI: reference daily intake

DV: daily value

Table 2 Fecal Transplantation: clinical parameters of two female donors

	ID 3		ID 10	
	Pre-SG	18M	Pre-SG	18M
Age (years)	49	-	31	-
Weight (Kg)	97,6	64,2	98,6	62,4
BMI (Kg/m²)	33,3	24,2	38,5	22,9
Basal Glucose (mg/dL)	82	85	80	67

Pre-SG: before sleeve gastrectomy; 18M: 18 months post-sleeve gastrectomy; BMI: body mass index

Table 3 Overall clinical parameters

	media±standard deviation				p-values					
	Pre (n=36)	6M (n=36)	18M (n=23)	4Y (n=27)	pre vs 6M	pre vs 18M	6M vs 18M	pre vs 4Y	6M vs 4Y	18M vs 4Y
Gender F (%)	28 (78)			21 (81)						
Age (years)	38,7±12,1			44,4±11,1				0,055		
Weight pre-SG (Kg)	124±21,3			127±24				0,609		
Weight (Kg)	124±21,3	91,2±14,5	84±12	83,8±21,2	<0,001	<0,001	0,007	<0,001	0,126	0,979
BMI (Kg/m ²)	44,5±6,8	32,7±5,5	30,6±5,2	30±6,2	<0,001	<0,001	0,057	<0,001	0,071	0,705
BMI Loss	-	11,8±3,6	14,9±6,0	15,9±5,2	<0,001	<0,001	0,007	<0,001	0,001	0,567
BMI Loss %	-	26,4±1,0	35,1±2,8	34,5±1,9	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,859
Systolic blood pressure	127±12,5	119±9,6	115±9,5	115±18,2	<0,001	<0,001	0,329	0,006	0,401	0,949
Diastolic blood pressure	82,5±10,3	76,2±7	76,4±6	75,1±17,4	0,002	0,009	0,463	0,062	0,774	0,737
Total Cholesterol mg/dL	189±31,5	191±31,1	192±30,6	192±39,2	0,617	0,802	0,103	0,727	0,922	0,982
HDL mg/dL	50,8±11,6	55,9±14,3	65,8±19,9	64,7±16	0,002	<0,001	0,003	<0,001	0,029	0,840
LDL mg/dL	109±26,4	116±26,3	114±26,5	112±34,9	0,067	0,703	0,002	0,727	0,573	0,829
Triglycerides mg/dL	142±71,4	88,8±26,6	80,9±30,5	83,1±40,2	<0,001	<0,001	0,399	<0,001	0,528	0,828
HbA1c (%)	5,6±0,9	5±0,3	5,4±0,5	5,35±1	<0,001	0,057	0,373	0,335	0,078	0,988
Basal Glucose mg/dL	98,9±24,1	81,8±7,7	80,9±8,5	84,68±14,2	<0,001	<0,001	0,719	0,006	0,403	0,310
Basal Insulin µU/mL	21,9±15,0	9,2±12,3	NA	4,67±3,7	0,028	NA	NA	<0,001	0,071	NA
Basal INSL5	735,8±617,1	2383,4±3222	1573,7±1560,7	NA	0,020	0,011	0,069	NA	NA	NA
AUC Glucose*	16598±3678	13143±3505	NA	13587±2824	<0,001	NA	NA	0,003	0,836	NA
AUC Insulin*	8696±5589	7467±5718	NA	6039±4594	0,378	NA	NA	0,030	0,800	NA
AUC Triglycerides§	87483±44110	53555±21858	NA	NA	<0,001	NA	NA	NA	NA	NA
AUC Free Cholesterol§	132626±24545	130614±23046	NA	NA	0,665	NA	NA	NA	NA	NA
AUC Cholesterol Ester§	280356±80253	267442±59355	NA	NA	0,227	NA	NA	NA	NA	NA
AUC INSL5§	82885±82899	208283±235554	NA	NA	0,030	NA	NA	NA	NA	NA

*AUC durante OGTT; §AUC durante meal test; Data are express as mean±standard deviation. Statistical difference was analysed with Student's t-test or Mann-Whitney U test as appropriate. SG: sleeve gastrectomy; Pre-SG: before sleeve gastrectomy; 6M: 6 months post-sleeve gastrectomy; 18M: 18 months post-sleeve gastrectomy; 4Y: cross-sectional cohort of patients 4Y after sleeve gastrectomy ; BMI: body mass index; BMI: body mass index; HDL: high lipoprotein; LDL low density lipoprotein; HbA1c: glycated haemoglobin; INSL5: insulin-like peptide 5; NA: not available.

Table 4 Nutritional values of patients food intake

	media±standard deviation				p-values					
	pre	6M	18M	4Y	pre vs 6M	pre vs 18M	6M vs 18M	pre vs 4Y	6M vs 4Y	18M vs 4Y
Fluids (mL/die)	1607,1±558,8	961,9±495,9	1212±602,1	972,8±186,8	<0,001	0,031	0,184	<0,001	0,432	0,290
Total Energy (Kcal/day)	1787,8 ±535,5	985,5±241	1309,6±233,2	1288,3±258,9	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,805
Proteins (gr/day)	71,1±21,3	45,8±14,6	58,1±12,1	49,1±9,4	<0,001	0,094	0,003	<0,001	0,367	0,052
Proteins (% weight)	19,6±3,8	22,4±5,7	22±3,9	19,2±4	<0,001	<0,001	0,914	<0,001	0,052	0,049
Carbohydrates (gr/day)	231,1±68,5	121,3±37,1	153,9±34,9	156,8±43	<0,001	<0,001	0,025	<0,001	0,009	0,957
Carbohydrates (% weight)	62,5±6,1	58,8±9,2	57,6±7,7	59,6±6,5	0,042	<0,001	0,380	<0,001	n.s.	0,427
Fats (gr/die)	67,2±28,5	38,3±13,3	54,4±18,3	55±14,1	<0,001	<0,001	0,002	0,286	<0,001	0,708
Fats (% weight)	17,9±4,6	18,8±6,3	20,4±6	21,2±4,1	0,476	<0,001	0,188	0,022	0,133	0,664
Fibers (gr/die)	16,3±5,8	9,2±3,7	11,0±2,9	9,8±3,2	<0,001	<0,001	0,171	<0,001	0,580	0,247
Carbohydrates /Proteins	3,3±0,9	2,9±1,1	2,8±0,8	3,3±0,9	0,022	0,018	0,575	0,800	0,197	0,089
Proteins/Fibers	4,8±1,7	5,6±2,6	5,8±2,7	5,3±1,4	0,389	0,231	0,349	0,246	0,699	0,986

Data are express as mean±standard deviation. Statistical difference was analysed with Student's t-test or Mann–Whitney U test as appropriate. Pre-SG: before sleeve gastrectomy; 6M: 6 months post-sleeve gastrectomy; 18M: 18 months post-sleeve gastrectomy; 4Y: cross-sectional cohort of patients 4Y after sleeve gastrectomy

a**Table 5 Enriched (a) and depleted (b) pathways pre-sleeve gastrectomy vs 6 months after sleeve gastrectomy**

Pathway ID	Pathway metabolico	KO ID	padj	sign. level	Titolo KO
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00382	0,04652604	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00281	0,03247116	*	glycine dehydrogenase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00282	0,04031269	*	glycine dehydrogenase subunit 1
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K03781	0,01275882	*	catalase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00283	0,02998055	*	glycine dehydrogenase subunit 2
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00605	0,00061817	**	aminomethyltransferase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K11473	0,01430048	*	glycolate oxidase iron-sulfur subunit
ko01200	Carbon	K00382	0,04652604	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko01200	Carbon	K00281	0,03247116	*	glycine dehydrogenase
ko01200	Carbon	K00282	0,04031269	*	glycine dehydrogenase subunit 1
ko01200	Carbon	K03781	0,01275882	*	catalase
ko01200	Carbon	K00283	0,02998055	*	glycine dehydrogenase subunit 2
ko01200	Carbon	K00605	0,00061817	**	aminomethyltransferase
ko01200	Carbon	K11261	0,03931176	*	formylmethanofuran dehydrogenase subunit E
ko01200	Carbon	K00150	0,03729354	*	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P))
ko01200	Carbon	K03519	0,04270883	*	carbon-monoxide dehydrogenase medium subunit
ko01200	Carbon	K12339	0,00835011	**	cysteine synthase B
ko01200	Carbon	K01623	0,02682746	*	fructose-bisphosphate aldolase, class I
ko00650	Butanoate	K00929	0,00169406	**	butyrate kinase
ko00650	Butanoate	K01580	0,02998055	*	glutamate decarboxylase
ko00650	Butanoate	K00135	0,00614351	**	succinate-semialdehyde dehydrogenase / glutarate-semialdehyde dehydrogenase
ko00650	Butanoate	K00019	0,00894557	**	3-hydroxybutyrate dehydrogenase
ko00650	Butanoate	K01035	0,00157735	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase beta subunit
ko00650	Butanoate	K01034	0,00058822	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit
ko00260	Butanoate	K00382	0,04652604	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00281	0,03247116	*	glycine dehydrogenase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00282	0,04031269	*	glycine dehydrogenase subunit 1
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00283	0,02998055	*	glycine dehydrogenase subunit 2
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00605	0,00061817	**	aminomethyltransferase

b

Pathway ID	Pathway metabolico	KO ID	padj	sign. level	Pathway ID
ko00195	Photosynthesis	K02113	0,02235863	*	F-type H+-transporting ATPase subunit delta
ko00195	Photosynthesis	K02115	0,01430048	*	F-type H+-transporting ATPase subunit gamma
ko00195	Photosynthesis	K02110	0,00911404	**	F-type H+-transporting ATPase subunit c
ko00195	Photosynthesis	K02112	0,01275882	*	F-type H+-transporting ATPase subunit beta
ko00195	Photosynthesis	K02114	0,02508245	*	F-type H+-transporting ATPase subunit epsilon
ko00195	Photosynthesis	K02109	0,01901011	*	F-type H+-transporting ATPase subunit b
ko00195	Photosynthesis	K02111	0,01769278	*	F-type H+-transporting ATPase subunit alpha
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K02203	0,01869638	*	phosphoserine / homoserine phosphotransferase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K14260	0,005552	**	alanine-synthesizing transaminase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00290	0,00593015	**	saccharopine dehydrogenase (NAD+, L-lysine forming)
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K11358	0,04428049	*	aspartate aminotransferase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01703	0,00289033	**	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01624	0,03937135	*	fructose-bisphosphate aldolase, class II
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00891	0,02011045	*	shikimate kinase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00014	0,03506235	*	shikimate dehydrogenase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01586	0,02422287	*	diaminopimelate decarboxylase
ko00500	Starch and sucrose	K02438	0,00039481	**	glycogen operon protein
ko00500	Starch and sucrose	K01193	0,00379138	**	beta-fructofuranosidase
ko00500	Starch and sucrose	K01182	0,00425048	**	oligo-1,6-glucosidase
ko00500	Starch and sucrose	K05341	0,037838	*	amylsucrase
ko00500	Starch and sucrose	K00700	0,04669766	*	1,4-alpha-glucan branching enzyme
ko00500	Starch and sucrose	K00688	0,02598097	*	starch phosphorylase
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02113	0,02235863	*	F-type H+-transporting ATPase subunit delta
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02115	0,01430048	*	F-type H+-transporting ATPase subunit gamma
ko00190	Oxidative phosphorylation	K00937	0,00502365	**	polyphosphate kinase
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02110	0,00911404	**	F-type H+-transporting ATPase subunit c
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02112	0,01275882	*	F-type H+-transporting ATPase subunit beta
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02114	0,02508245	*	F-type H+-transporting ATPase subunit epsilon
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02109	0,01901011	*	F-type H+-transporting ATPase subunit b
ko00190	Oxidative phosphorylation	K02111	0,01769278	*	F-type H+-transporting ATPase subunit alpha

sign. level: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 . The statistical significance is test with DESeq2 package and the pvalue was adjusted with the FDR approach obtaining the padj.

Table 6 Enriched (a) and depleted (b) pathways pre-sleeve gastrectomy vs 18 months after sleeve gastrectomy

a

Pathway ID	Pathway metabolico	KO ID	padj	sign. level	Titolo KO
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K01679	0,01305582	*	fumarate hydratase, class II
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00382	0,02850265	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00245	0,02147767	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00164	0,02665915	*	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00247	0,03875702	*	fumarate reductase subunit D
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00162	0,00232533	**	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00627	0,00428133	**	pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K01596	0,00671259	**	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00161	0,00065801	**	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K01682	0,01330335	*	aconitate hydratase 2 / 2-methylisocitrate dehydratase
ko02010	ABC transporters	K01996	0,03056525	*	branched-chain amino acid transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K02193	0,04598249	*	heme exporter protein A
ko02010	ABC transporters	K02041	0,01953082	*	phosphonate transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K02044	0,01576343	*	phosphonate transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10558	0,03921376	*	AI-2 transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K15600	0,04439892	*	putative hydroxymethylpyrimidine transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K02042	0,01192232	*	phosphonate transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K07323	0,02925869	*	putative toluene tolerance protein
ko02010	ABC transporters	K10556	0,01110389	*	AI-2 transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K10557	0,00985761	**	AI-2 transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K11075	0,0492533	*	putrescine transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K10549	0,02925869	*	D-allose transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10109	0,0402983	*	maltose/maltodextrin transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K13893	0,03444764	*	microcin C transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K13894	0,03209942	*	microcin C transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K10227	0,02868117	*	sorbitol/mannitol transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10111	0,02756993	*	multiple sugar transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10550	0,01254971	*	D-allose transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K11076	0,01305582	*	putrescine transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10551	0,00992644	**	D-allose transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K11074	0,01108395	*	putrescine transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K11073	0,00992956	**	putrescine transport system substrate-binding protein

ko02010	ABC transporters	K10108	0,00907738	**	maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10110	0,00874056	**	maltose/maltodextrin transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K05685	0,00204297	**	macrolide transport system ATP-binding/permease protein
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00382	0,02850265	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K02437	0,02663981	*	glycine cleavage system H protein
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00050	0,03632938	*	hydroxypyruvate reductase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K01816	0,02692532	*	hydroxypyruvate isomerase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00605	0,00280554	**	aminomethyltransferase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K04835	0,01595205	*	methylaspartate ammonia-lyase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K11473	0,00370679	**	glycolate oxidase iron-sulfur subunit
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00282	2,38E-05	**	glycine dehydrogenase subunit 1
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00283	1,15E-05	**	glycine dehydrogenase subunit 2
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K01682	0,01330335	*	aconitate hydratase 2 / 2-methylisocitrate dehydratase
ko01200	Carbon metabolism	K01679	0,01305582	*	fumarate hydratase, class II
ko01200	Carbon metabolism	K00382	0,02850265	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko01200	Carbon metabolism	K14534	0,02002835	*	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase / vinylacetyl-CoA-Delta-isomerase
ko01200	Carbon metabolism	K03738	0,03143403	*	aldehyde:ferredoxin oxidoreductase
ko01200	Carbon metabolism	K00605	0,00280554	**	aminomethyltransferase
ko01200	Carbon metabolism	K00245	0,02147767	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko01200	Carbon metabolism	K11261	0,019461	*	formylmethanofuran dehydrogenase subunit E
ko01200	Carbon metabolism	K16176	0,02909488	*	methylamine---corrinoid protein Co-methyltransferase
ko01200	Carbon metabolism	K00164	0,02665915	*	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
ko01200	Carbon metabolism	K00247	0,03875702	*	fumarate reductase subunit D
ko01200	Carbon metabolism	K00162	0,00232533	**	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
ko01200	Carbon metabolism	K00627	0,00428133	**	pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)
ko01200	Carbon metabolism	K04835	0,01595205	*	methylaspartate ammonia-lyase
ko01200	Carbon metabolism	K00161	0,00065801	**	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
ko01200	Carbon metabolism	K00282	2,38E-05	**	glycine dehydrogenase subunit 1
ko01200	Carbon metabolism	K00283	1,15E-05	**	glycine dehydrogenase subunit 2
ko01200	Carbon metabolism	K01682	0,01330335	*	aconitate hydratase 2 / 2-methylisocitrate dehydratase
ko01200	Carbon metabolism	K11529	0,01308273	*	glycerate 2-kinase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00382	0,02850265	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K02437	0,02663981	*	glycine cleavage system H protein
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00050	0,03632938	*	hydroxypyruvate reductase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00605	0,00280554	**	aminomethyltransferase

ko00260	Glycine, serine and threonine	K01753	0,00795191	**	D-serine dehydratase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00282	2,38E-05	**	glycine dehydrogenase subunit 1
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00283	1,15E-05	**	glycine dehydrogenase subunit 2
ko00260	Glycine, serine and threonine	K11529	0,01308273	*	glycerate 2-kinase
ko00260	Glycine, serine and threonine	K00302	0,00175054	**	sarcosine oxidase, subunit alpha
ko02020	Two-component system	K01910	0,04560167	*	[citrate (pro-3S)-lyase] ligase
ko02020	Two-component system	K07652	0,02768722	*	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase VicK
ko02020	Two-component system	K07708	0,03307075	*	two-component system, NtrC family, nitrogen regulation sensor histidine kinase
ko02020	Two-component system	K00245	0,02147767	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko02020	Two-component system	K08357	0,04461878	*	tetrathionate reductase subunit A
ko02020	Two-component system	K15739	0,0183016	*	D-alanine---(R)-lactate ligase
ko02020	Two-component system	K11691	0,00952115	**	two-component system, CitB family, sensor histidine kinase DctS
ko02020	Two-component system	K07642	0,03057963	*	two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase BaeS
ko02020	Two-component system	K07799	0,04625687	*	putative multidrug efflux transporter MdtA
ko02020	Two-component system	K07788	0,04739172	*	RND superfamily, multidrug transport protein MdtB
ko02020	Two-component system	K13924	0,02925869	*	two-component system, chemotaxis family, CheB/CheR fusion protein
ko02020	Two-component system	K00247	0,03875702	*	fumarate reductase subunit D
ko02020	Two-component system	K01034	0,00894987	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit
ko02020	Two-component system	K07789	0,03588071	*	RND superfamily, multidrug transport protein MdtC
ko02020	Two-component system	K01035	0,00671259	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase beta subunit
ko02020	Two-component system	K03776	0,03393245	*	aerotaxis receptor
ko02020	Two-component system	K07715	0,01833055	*	two-component system, NtrC family, response regulator GlrR
ko02020	Two-component system	K09476	0,01091283	*	outer membrane pore protein F
ko02020	Two-component system	K06080	0,01062674	*	RcsF protein
ko02020	Two-component system	K02584	0,00428133	**	Nif-specific regulatory protein
ko00650	Butanoate metabolism	K00929	0,00998565	**	butyrate kinase
ko00650	Butanoate metabolism	K14534	0,02002835	*	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase / vinylacetyl-CoA-Delta-isomerase
ko00650	Butanoate metabolism	K00245	0,02147767	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko00650	Butanoate metabolism	K00247	0,03875702	*	fumarate reductase subunit D
ko00650	Butanoate metabolism	K01034	0,00894987	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit
ko00650	Butanoate metabolism	K01035	0,00671259	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase beta subunit
ko00650	Butanoate metabolism	K00019	0,00985761	**	3-hydroxybutyrate dehydrogenase
ko00650	Butanoate metabolism	K00135	0,00025599	**	succinate-semialdehyde dehydrogenase / glutarate-semialdehyde DH
ko00620	Pyruvate metabolism	K01679	0,01305582	*	fumarate hydratase, class II
ko00620	Pyruvate metabolism	K00382	0,02850265	*	dihydrolipoamide dehydrogenase

ko00620	Pyruvate metabolism	K00245	0,02147767	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko00620	Pyruvate metabolism	K00247	0,03875702	*	fumarate reductase subunit D
ko00620	Pyruvate metabolism	K00162	0,00232533	**	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
ko00620	Pyruvate metabolism	K00627	0,00428133	**	pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)
ko00620	Pyruvate metabolism	K01596	0,00671259	**	phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)
ko00620	Pyruvate metabolism	K00161	0,00065801	**	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
ko02040	Flagellar assembly	K02393	0,04461878	*	flagellar L-ring protein precursor FlgH
ko02040	Flagellar assembly	K02391	0,04213903	*	flagellar basal-body rod protein FlgF
ko02040	Flagellar assembly	K02399	0,02192776	*	flagella synthesis protein FlgN
ko02040	Flagellar assembly	K02386	0,02274961	*	flagella basal body P-ring formation protein FlgA
ko02040	Flagellar assembly	K02394	0,01307357	*	flagellar P-ring protein precursor FlgI
ko02030	Bacterial chemotaxis	K13924	0,02925869	*	two-component system, chemotaxis family, CheB/CheR fusion protein
ko02030	Bacterial chemotaxis	K03776	0,03393245	*	aerotaxis receptor
ko02030	Bacterial chemotaxis	K03414	0,00985761	**	chemotaxis protein CheZ
ko02030	Bacterial chemotaxis	K10108	0,00907738	**	maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein

b	Pathway ID	Pathway metabolico	KO ID	padj	sign. level	KO title
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00766	0,01244149	*	anthranilate phosphoribosyltransferase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01657	0,00180125	**	anthranilate synthase component I
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K14260	0,03774855	*	alanine-synthesizing transaminase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01609	0,00428133	**	indole-3-glycerol phosphate synthase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01817	0,01058136	*	phosphoribosylanthranilate isomerase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01696	0,01158606	*	tryptophan synthase beta chain
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01695	0,00433978	**	tryptophan synthase alpha chain
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00290	0,0069373	**	saccharopine dehydrogenase (NAD+, L-lysine forming)
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K02203	0,03143403	*	phosphoserine / homoserine phosphotransferase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01658	0,01192232	*	anthranilate synthase component II
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00891	0,00043406	**	shikimate kinase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01624	0,00180125	**	fructose-bisphosphate aldolase, class II
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01703	0,01192232	*	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00014	0,00231537	**	shikimate dehydrogenase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01689	0,00037304	**	enolase
	ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00266	0,04460746	*	glutamate synthase (NADPH/NADH) small chain

ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01687	0,01833055	*	dihydroxy-acid dehydratase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01814	0,01386928	*	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K03785	0,00952115	**	3-dehydroquininate dehydratase I
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00640	0,03539953	*	serine O-acetyltransferase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01652	0,02072802	*	acetolactate synthase I/II/III large subunit
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01940	0,01305582	*	argininosuccinate synthase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01755	0,03246416	*	argininosuccinate lyase
ko00051	Fructose and mannose	K03332	8,49E-06	**	fructan beta-fructosidase
ko00051	Fructose and mannose	K02768	0,00547492	**	PTS system, fructose-specific IIA component
ko00051	Fructose and mannose	K02769	0,00384017	**	PTS system, fructose-specific IIB component
ko00051	Fructose and mannose	K02798	0,04909804	*	PTS system, mannitol-specific IIA component
ko00051	Fructose and mannose	K02781	0,03539953	*	PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIA component
ko00051	Fructose and mannose	K05305	0,01494364	*	fucokinase
ko00051	Fructose and mannose	K02793	0,00928481	**	PTS system, mannose-specific IIA component
ko00051	Fructose and mannose	K04041	0,00117042	**	fructose-1,6-bisphosphatase III
ko00051	Fructose and mannose	K00882	0,01620067	*	1-phosphofructokinase
ko00051	Fructose and mannose	K01624	0,00180125	**	fructose-bisphosphate aldolase, class II
ko00051	Fructose and mannose	K02770	0,02692532	*	PTS system, fructose-specific IIC component
ko00051	Fructose and mannose	K00847	0,04373676	*	fructokinase
ko02060	Phosphotransferase system	K02768	0,00547492	**	PTS system, fructose-specific IIA component
ko02060	Phosphotransferase system	K02771	0,01473257	*	PTS system, fructose-specific IID component
ko02060	Phosphotransferase system	K02769	0,00384017	**	PTS system, fructose-specific IIB component
ko02060	Phosphotransferase system	K02798	0,04909804	*	PTS system, mannitol-specific IIA component
ko02060	Phosphotransferase system	K02765	8,86E-07	**	PTS system, D-glucosamine-specific IIC component
ko02060	Phosphotransferase system	K02781	0,03539953	*	PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIA component
ko02060	Phosphotransferase system	K02775	0,01850366	*	PTS system, galactitol-specific IIC component
ko02060	Phosphotransferase system	K02773	0,04625687	*	PTS system, galactitol-specific IIA component
ko02060	Phosphotransferase system	K02810	0,00860722	**	PTS system, sucrose-specific IIC component
ko02060	Phosphotransferase system	K02793	0,00928481	**	PTS system, mannose-specific IIA component
ko02060	Phosphotransferase system	K02770	0,02692532	*	PTS system, fructose-specific IIC component
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K00766	0,01244149	*	anthranilate phosphoribosyltransferase
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K01657	0,00180125	**	anthranilate synthase component I
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K01609	0,00428133	**	indole-3-glycerol phosphate synthase
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K01817	0,01058136	*	phosphoribosylanthranilate isomerase
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K01696	0,01158606	*	tryptophan synthase beta chain

ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K01695	0,00433978	**	tryptophan synthase alpha chain
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K01658	0,01192232	*	anthranilate synthase component II
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K00891	0,00043406	**	shikimate kinase
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K00014	0,00231537	**	shikimate dehydrogenase
ko00400	PHE, TYR, TRP biosynthesis	K03785	0,00952115	**	3-dehydroquinate dehydratase I
ko00052	Galactose metabolism	K01193	0,00175054	**	beta-fructofuranosidase
ko00052	Galactose metabolism	K08302	0,02756993	*	tagatose 1,6-diphosphate aldolase GatY/KbaY
ko00052	Galactose metabolism	K02775	0,01850366	*	PTS system, galactitol-specific IIC component
ko00052	Galactose metabolism	K02773	0,04625687	*	PTS system, galactitol-specific IIA component
ko00052	Galactose metabolism	K01854	0,00860722	**	UDP-galactopyranose mutase
ko00052	Galactose metabolism	K01182	0,01953082	*	oligo-1,6-glucosidase
ko00052	Galactose metabolism	K12308	0,02614371	*	beta-galactosidase
ko00052	Galactose metabolism	K01190	0,01458614	*	beta-galactosidase
ko00052	Galactose metabolism	K01785	0,03198403	*	aldose 1-epimerase
ko00920	Sulfur metabolism	K00395	0,00985761	**	adenylylsulfate reductase, subunit B
ko00920	Sulfur metabolism	K02045	0,00599584	**	sulfate transport system ATP-binding protein
ko00920	Sulfur metabolism	K00394	0,01305582	*	adenylylsulfate reductase, subunit A
ko00920	Sulfur metabolism	K02046	0,00459165	**	sulfate transport system permease protein
ko00920	Sulfur metabolism	K02047	0,01753527	*	sulfate transport system permease protein
ko00920	Sulfur metabolism	K02048	0,03539953	*	sulfate transport system substrate-binding protein
ko00920	Sulfur metabolism	K00956	0,00457021	**	sulfate adenylyltransferase subunit 1
ko00920	Sulfur metabolism	K00957	0,01775576	*	sulfate adenylyltransferase subunit 2
ko00920	Sulfur metabolism	K00640	0,03539953	*	serine O-acetyltransferase
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K14260	0,03774855	*	alanine-synthesizing transaminase
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K01703	0,01192232	*	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K01687	0,01833055	*	dihydroxy-acid dehydratase
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K01652	0,02072802	*	acetolactate synthase I/II/III large subunit
ko00061	Fatty acid biosynthesis	K01961	0,00459165	**	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
ko00061	Fatty acid biosynthesis	K02160	0,00247414	**	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
ko00061	Fatty acid biosynthesis	K01963	0,00077485	**	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta
ko00061	Fatty acid biosynthesis	K00645	0,0366897	*	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase
ko00061	Fatty acid biosynthesis	K02372	0,04262758	*	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase
ko00640	Propanoate metabolism	K01961	0,00459165	**	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
ko00640	Propanoate metabolism	K13922	0,0358323	*	propionaldehyde dehydrogenase
ko00640	Propanoate metabolism	K00005	0,00643307	**	glycerol dehydrogenase

ko00640	Propanoate metabolism	K02160	0,00247414	**	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
ko00640	Propanoate metabolism	K01963	0,00077485	**	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta
ko00640	Propanoate metabolism	K00048	0,02944689	*	lactaldehyde reductase
ko00640	Propanoate metabolism	K00656	0,00025599	**	formate C-acetyltransferase
ko00250	ALA, ASP, GLU metabolism	K14260	0,03774855	*	alanine-synthesizing transaminase
ko00250	ALA, ASP, GLU metabolism	K00278	0,00598617	**	L-aspartate oxidase
ko00250	ALA, ASP, GLU metabolism	K00266	0,04460746	*	glutamate synthase (NADPH/NADH) small chain
ko00250	ALA, ASP, GLU metabolism	K01940	0,01305582	*	argininosuccinate synthase
ko00250	ALA, ASP, GLU metabolism	K00764	0,04625687	*	amidophosphoribosyltransferase
ko00250	ALA, ASP, GLU metabolism	K01755	0,03246416	*	argininosuccinate lyase
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K01193	0,00175054	**	beta-fructofuranosidase
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K05341	0,00957173	**	amylsucrase
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K02810	0,00860722	**	PTS system, sucrose-specific IIC component
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K02438	0,02797027	*	glycogen operon protein
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K01182	0,01953082	*	oligo-1,6-glucosidase
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K00847	0,04373676	*	fructokinase
ko00500	Starch and sucrose metabolism	K00688	0,00302773	**	starch phosphorylase
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K02771	0,01473257	*	PTS system, fructose-specific IID component
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K02765	8,86E-07	**	PTS system, D-glucosamine-specific IIC component
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K05305	0,01494364	*	fucokinase
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K00983	0,0150002	*	N-acylneuraminate cytidyltransferase
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K01209	0,00204297	**	alpha-N-arabinofuranosidase
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K02793	0,00928481	**	PTS system, mannose-specific IIA component
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K01854	0,00860722	**	UDP-galactopyranose mutase
ko00520	Amino sugar and nucleotide sugar	K00847	0,04373676	*	fructokinase
ko00220	Arginine biosynthesis	K01430	0,00643307	**	urease subunit gamma
ko00220	Arginine biosynthesis	K01428	0,0009171	**	urease subunit alpha
ko00220	Arginine biosynthesis	K14260	0,03774855	*	alanine-synthesizing transaminase
ko00220	Arginine biosynthesis	K01940	0,01305582	*	argininosuccinate synthase
ko00220	Arginine biosynthesis	K01755	0,03246416	*	argininosuccinate lyase
ko00620	Pyruvate metabolism	K01961	0,00459165	**	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
ko00620	Pyruvate metabolism	K02160	0,00247414	**	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
ko00620	Pyruvate metabolism	K01963	0,00077485	**	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta
ko00620	Pyruvate metabolism	K01512	0,02672468	*	acylphosphatase
ko00620	Pyruvate metabolism	K00656	0,00025599	**	formate C-acetyltransferase

ko00620	Pyruvate metabolism	K01610	0,03262984	*	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)
ko00253	Tetracycline biosynthesis	K01961	0,00459165	**	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
ko00253	Tetracycline biosynthesis	K02160	0,00247414	**	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
ko00253	Tetracycline biosynthesis	K01963	0,00077485	**	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta
ko01212	Fatty acid metabolism	K01961	0,00459165	**	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
ko01212	Fatty acid metabolism	K02160	0,00247414	**	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein
ko01212	Fatty acid metabolism	K01963	0,00077485	**	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta
ko01212	Fatty acid metabolism	K00645	0,0366897	*	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase
ko01212	Fatty acid metabolism	K02372	0,04262758	*	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase
ko04122	Sulfur relay system	K03154	0,00044702	**	sulfur carrier protein
ko04122	Sulfur relay system	K03637	0,00709021	**	molybdenum cofactor biosynthesis protein C
ko04122	Sulfur relay system	K03639	0,00745681	**	molybdenum cofactor biosynthesis protein

sign. level: livello di significatività *<0.05, **<0.01, ***<0.001

The statistical significance is test with DESeq2 package and the pvalue was adjusted with the FDR approach obtaining the padj.

Tabella 7 Enriched (a) and depleted (b) pathways pre-sleeve gastrectomy vs cross-sectional cohort 4 years after sleeve gastrectomy

a

Pathway ID	Pathway	KO ID	padj	sign. level	KO title
ko00650	Butanoate metabolism	K00634	0,03146474	*	phosphate butyryltransferase
ko00650	Butanoate metabolism	K01040	0,03511842	*	glutaconate CoA-transferase, subunit B
ko00650	Butanoate metabolism	K00929	0,0009229	**	butyrate kinase
ko00650	Butanoate metabolism	K00245	0,04561952	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko00650	Butanoate metabolism	K01039	0,00960486	**	glutaconate CoA-transferase, subunit A
ko00650	Butanoate metabolism	K01035	0,00180834	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase beta subunit
ko00650	Butanoate metabolism	K01034	0,00147578	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit
ko00650	Butanoate metabolism	K14534	3,64E-05	**	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase / vinylacetyl-CoA-Delta-isomerase
ko00633	Nitrotoluene degradation	K06281	0,02624775	*	hydrogenase large subunit
ko00633	Nitrotoluene degradation	K06282	0,01235731	*	hydrogenase small subunit
ko00633	Nitrotoluene degradation	K10679	0,00785626	**	nitroreductase / dihydropteridine reductase
ko00633	Nitrotoluene degradation	K03519	0,00487104	**	carbon-monoxide dehydrogenase medium subunit
ko01200	Carbon metabolism	K00382	0,04254247	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko01200	Carbon metabolism	K01679	0,03906028	*	fumarate hydratase, class II
ko01200	Carbon metabolism	K00245	0,04561952	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko01200	Carbon metabolism	K00605	0,00064781	**	aminomethyltransferase
ko01200	Carbon metabolism	K03738	0,0130572	*	aldehyde:ferredoxin oxidoreductase
ko01200	Carbon metabolism	K11261	0,02779358	*	formylmethanofuran dehydrogenase subunit E
ko01200	Carbon metabolism	K00283	0,00203507	**	glycine dehydrogenase subunit 2
ko01200	Carbon metabolism	K00282	0,00140757	**	glycine dehydrogenase subunit 1
ko01200	Carbon metabolism	K01623	0,01327446	*	fructose-bisphosphate aldolase, class I
ko01200	Carbon metabolism	K00164	0,01274561	*	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
ko01200	Carbon metabolism	K03519	0,00487104	**	carbon-monoxide dehydrogenase medium subunit
ko01200	Carbon metabolism	K14534	3,64E-05	**	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase / vinylacetyl-CoA-Delta-isomerase
ko02020	Two-component system	K07793	0,02624775	*	putative tricarboxylic transport membrane protein
ko02020	Two-component system	K00245	0,04561952	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko02020	Two-component system	K11691	0,00960486	**	two-component system, CitB family, sensor histidine kinase DctS
ko02020	Two-component system	K07795	0,03207202	*	putative tricarboxylic transport membrane protein
ko02020	Two-component system	K11688	0,01264937	*	C4-dicarboxylate-binding protein DctP
ko02020	Two-component system	K11103	0,02624775	*	aerobic C4-dicarboxylate transport protein
ko02020	Two-component system	K15739	0,01240342	*	D-alanine---(R)-lactate ligase
ko02020	Two-component system	K13924	0,02035946	*	two-component system, chemotaxis family, CheB/CheR fusion protein
ko02020	Two-component system	K01035	0,00180834	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase beta subunit

ko02020	Two-component system	K01034	0,00147578	**	acetate CoA/acetoacetate CoA-transferase alpha subunit
ko02020	Two-component system	K02584	0,00034598	**	Nif-specific regulatory protein
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00382	0,04254247	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00605	0,00064781	**	aminomethyltransferase
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00283	0,00203507	**	glycine dehydrogenase subunit 2
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K00282	0,00140757	**	glycine dehydrogenase subunit 1
ko00630	Glyoxylate and dicarboxylate	K11473	0,0039204	**	glycolate oxidase iron-sulfur subunit
ko00230	Purine	K01487	0,04880554	*	guanine deaminase
ko00230	Purine	K00087	0,004832	**	xanthine dehydrogenase molybdenum-binding subunit
ko00230	Purine	K13479	0,00253882	**	xanthine dehydrogenase FAD-binding subunit
ko00230	Purine	K01525	0,02405619	*	bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (symmetrical)
ko00230	Purine	K06928	0,00960486	**	nucleoside-triphosphatase THEP1
ko00230	Purine	K02083	0,00140757	**	allantoate deiminase
ko00230	Purine	K14977	0,0039204	**	ureidoglycine aminohydrolase
ko00230	Purine	K00839	0,00563293	**	aminotransferase
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00382	0,04254247	*	dihydrolipoamide dehydrogenase
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K01679	0,03906028	*	fumarate hydratase, class II
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00245	0,04561952	*	fumarate reductase iron-sulfur subunit
ko00020	Citrate cycle (TCA cycle)	K00164	0,01274561	*	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component

b

Pathway ID	Pathway metabolico	KO ID	padj	sign. level	KO title
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00766	0,0398473	*	anthranilate phosphoribosyltransferase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01624	2,07E-05	**	fructose-bisphosphate aldolase, class II
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K07173	0,04112057	*	S-ribosylhomocysteine lyase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K11755	0,02624775	*	phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase/phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00891	0,00856808	**	shikimate kinase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01703	0,01828324	*	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01653	0,02575093	*	acetolactate synthase I/III small subunit

ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01689	0,00942846	**	enolase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K00014	0,00960486	**	shikimate dehydrogenase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01652	0,00960486	**	acetolactate synthase I/II/III large subunit
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01814	0,03893917	*	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase
ko01230	Biosynthesis of amino acids	K01647	0,04870519	*	citrate synthase
ko00920	Sulfur	K00395	0,03167857	*	adenylylsulfate reductase, subunit B
ko00920	Sulfur	K02045	0,02709776	*	sulfate transport system ATP-binding protein
ko00920	Sulfur	K00394	0,03051771	*	adenylylsulfate reductase, subunit A
ko00920	Sulfur	K02048	0,02162665	*	sulfate transport system substrate-binding protein
ko00920	Sulfur	K02046	0,03612044	*	sulfate transport system permease protein
ko00920	Sulfur	K02047	0,04254247	*	sulfate transport system permease protein
ko00500	Starch and sucrose	K05343	0,01244793	*	maltose alpha-D-glucosyltransferase/ alpha-amylase
ko00500	Starch and sucrose	K00690	0,04645676	*	sucrose phosphorylase
ko00500	Starch and sucrose	K02438	0,02982954	*	glycogen operon protein
ko00500	Starch and sucrose	K01193	0,01828023	*	beta-fructofuranosidase
ko00500	Starch and sucrose	K01182	0,02505208	*	oligo-1,6-glucosidase
ko00500	Starch and sucrose	K00688	0,04880554	*	starch phosphorylase
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K01703	0,01828324	*	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K01653	0,02575093	*	acetolactate synthase I/III small subunit
ko00290	VAL, LEU, ILE biosynthesis	K01652	0,00960486	**	acetolactate synthase I/II/III large subunit
ko02010	ABC transporters	K11959	0,04158617	*	urea transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10546	0,03214505	*	putative multiple sugar transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10188	0,04254247	*	lactose/L-arabinose transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10547	0,04880554	*	putative multiple sugar transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K10190	0,04645676	*	lactose/L-arabinose transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K02045	0,02709776	*	sulfate transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K10548	0,04962245	*	putative multiple sugar transport system ATP-binding protein
ko02010	ABC transporters	K02048	0,02162665	*	sulfate transport system substrate-binding protein
ko02010	ABC transporters	K02046	0,03612044	*	sulfate transport system permease protein
ko02010	ABC transporters	K02047	0,04254247	*	sulfate transport system permease protein
ko00760	Nicotinate and nicotinamide	K01239	0,04645676	*	purine nucleosidase
ko00760	Nicotinate and nicotinamide	K03517	0,03146474	*	quinolinate synthase
ko00760	Nicotinate and nicotinamide	K03426	0,04880554	*	NAD+ diphosphatase
ko00760	Nicotinate and nicotinamide	K00767	0,0498618	*	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating)
ko00660	C5-Branched dibasic acid	K01703	0,01828324	*	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit

ko00660	C5-Branched dibasic acid	K01653	0,02575093	*	acetolactate synthase I/III small subunit
ko00660	C5-Branched dibasic acid	K01652	0,00960486	**	acetolactate synthase I/II/III large subunit
ko01210	2-Oxocarboxylic acid	K01703	0,01828324	*	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
ko01210	2-Oxocarboxylic acid	K01653	0,02575093	*	acetolactate synthase I/III small subunit
ko01210	2-Oxocarboxylic acid	K01652	0,00960486	**	acetolactate synthase I/II/III large subunit
ko01210	2-Oxocarboxylic acid	K01647	0,04870519	*	citrate synthase

sign. level: livello di significatività *<0.05, **<0.01, ***<0.001. The statistical significance is test with DESeq2 package and the pvalue was adjusted with the FDR approach obtaining the padj.

Table 8 Bile acids

			pre-SG	6M	18M	4Y	qval 6M vs pre	qval 18M vs pre	qval 4Y vs pre
Tauro-conjugated	Primary	TCA	15,62±32,86	7,14±7,17	7,14±39,31	16,81±60,51	3,40E-04	0,352	0,848
	Primary	TCDCA	30,79±58,38	25,79±18,95	25,79±31,13	30,48±96,53	2,50E-01	0,990	0,825
	Secondary	TDCA	11,67±27,91	13,27±13,72	13,27±36,77	17,00±33,93	7,90E-01	0,288	0,387
	Secondary	TUDCA	1,28±1,97	2,84±16,36	2,84±3,39	2,26±5,85	6,40E-03	0,990	0,413
	Secondary	TLCA	0,71±1,43	1,22±2,01	1,22±2,17	1,17±2,80	5,70E-02	0,352	0,290
Glyco-conjugated	Primary	GCA	87,23±233,71	46,39±39,83	46,39±122,3	78,83±184,01	1,60E-03	0,517	0,910
	Primary	GCDCA	260,83±377,64	203,07±178,68	203,07±201,36	353,49±613,65	6,30E-01	0,975	0,275
	Secondary	GDCA	82,51±172,32	80,60±121,33	80,60±180,82	154,32±234,11	8,50E-01	0,147	0,202
	Secondary	GUDCA	38,15±59,16	122,93±701,40	122,93±177,47	82,00±167,40	6,40E-03	0,782	0,275
	Secondary	GLCA	3,71±7,82	6,89±9,46	6,89±13,04	5,33±14,01	4,20E-02	0,162	0,335
Unconjugated	Primary	CA	65,48±187,67	49,15±93,18	49,15±83,28	73,88±200,39	8,10E-02	0,387	0,825
	Primary	CDCA	148,56±252,17	84,39±130,86	84,39±88,48	129,81±309,63	9,90E-03	0,068	0,825
	Secondary	DCA	155,61±141,72	121,47±100,22	130,88±142,83	141,80±85,44	6,30E-01	0,990	0,825
	Secondary	UDCA	26,50±54,42	48,87±335,22	17,38±38,71	23,07±66,84	6,60E-02	0,885	0,825
	Secondary	LCA	7,05±4,59	8,27±12,10	8,53±6,14	7,55±4,20	2,60E-02	0,534	0,650
	Secondary	HCA	4,11±4,09	8,685±8,11	8,99±10,24	9,43±11,55	9,00E-04	0,056	0,132
	Secondary	HDCA	1,77±2,91	6,07±111,51	5,15±5,55	7,64±5,12	9,90E-05	0,010	<0,001
	Secondary	iso.UDCA	72,13±138,72	131,08±378,05	61,99±150,85	75,94±146,31	7,70E-02	0,479	0,998
		Total BA	1344,51±1077,60	1538,86±1445,82	1152,77±705,44	1492,60±1443,80	3,50E-01	0,880	0,387
		C4	36,80±53,31	16,69±29,47	17,27±23,12	35,65±24,29	3,20E-04	0,001	0,275

Data are express as mean±standard deviation

Pre-SG: before sleeve gastrectomy; 6M: 6 months post-sleeve gastrectomy; 18M: 18 months post-sleeve gastrectomy; 4Y: cross-sectional cohort of patients 4Y after sleeve gastrectomy.

The statistical significance is test with ANOVA and the pvalue was adjusted with the FDR approach obtaining the qvalue.

Tabella 9 Bile acids area under curve during the meal test before and 6 months after sleeve gastrectomy

			pre-SG	6M	↑↓ pre-SG vs 6M	p
Tauro-conjugated	Primary	TCA	5771±6472	3605±3130	↓	0,078
	Primary	TCDCa	10730±9428	12306±9988	↑	0,295
	Secondary	TDCA	4718±5786	8538±12831	↑	0,039
	Secondary	TUDCA	1080±4006	4636±9062	↑	0,008
	Secondary	TLCA	375,2±335,7	1651±3979	↑	0,065
Glyco-conjugated	Primary	GCA	27423±29631	23205±23548	↓	0,144
	Primary	GCDCA	81665±65515	1766±1199	↓	<0,001
	Secondary	GDCA	28851±28455	54662±57016	↑	0,005
	Secondary	GUDCA	14576±21603	106665±143886	↑	<0,001
	Secondary	GLCA	1721±1605	7822±14947	↑	0,017
Unconjugated	Primary	CA	12903±14454	5834±5966	↓	0,010
	Primary	CDCA	22090±17754	21882±22017	↓	0,944
	Secondary	DCA	20163±16030	30699±24211	↑	0,006
	Secondary	UDCA	6025±8801	32254±48109	↑	0,002
	Secondary	LCA	942±545	2359±2149	↑	<0,001
	Secondary	HCA	564±421	1179±795	↑	<0,001
	Secondary	HDCA	397±353	2977±5642	↑	0,021
	Secondary	iso.UDCA	23130±60186	39858±54307	↑	0,111
		Total primary BA	160582±109410	170828±113829	↑	0,522
		Total secondary BA	102043±92835	328858±392137	↑	0,001
		Total BA	251752±177254	374799±177626	↑	<0,001
		C4	8634±5909	4301±4245	↓	<0,001
		FGF19	12,50±6,97	20,13±14,85	↑	0,030

Pre-SG: before sleeve gastrectomy; 6M: 6 months post-sleeve gastrectomy. Data are expressed as mean±standard deviation. The areas under curve are calculated with the trapezoidal rule. The statistical significance is tested with Student's t-test

FIGURE

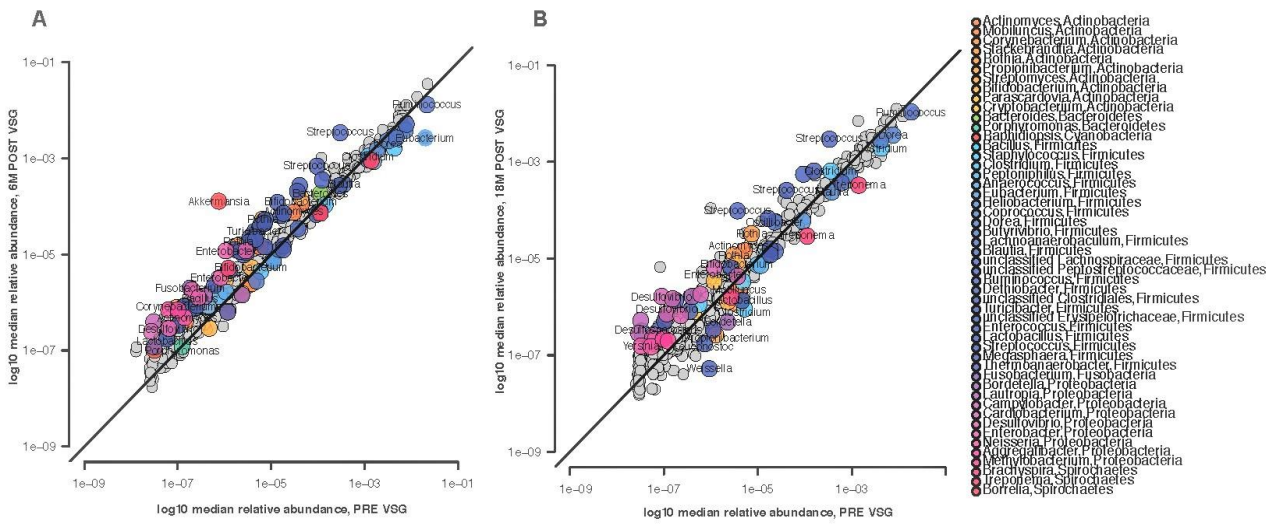


Figure 1A-B. The composition and genetic content of the human gut microbiota is altered after SG surgery. (A-B) Scatter plot of median species abundance in SG patients (A) 6 months (n=36) and (B) 18 months (n=23) after surgery compared to baseline. The different colors indicate genus affiliation of the differentially abundant species ($p < 0.05$).

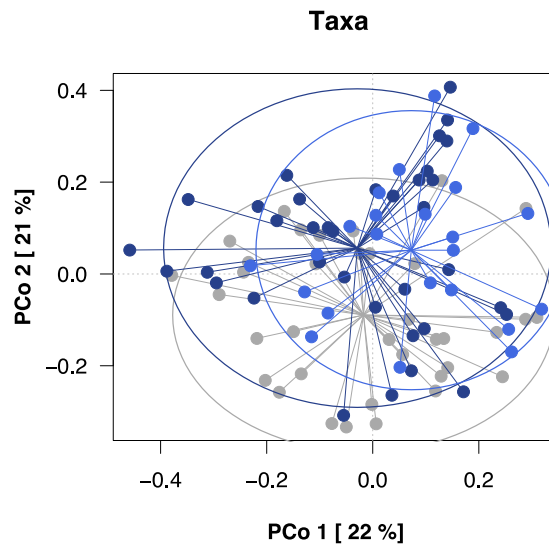
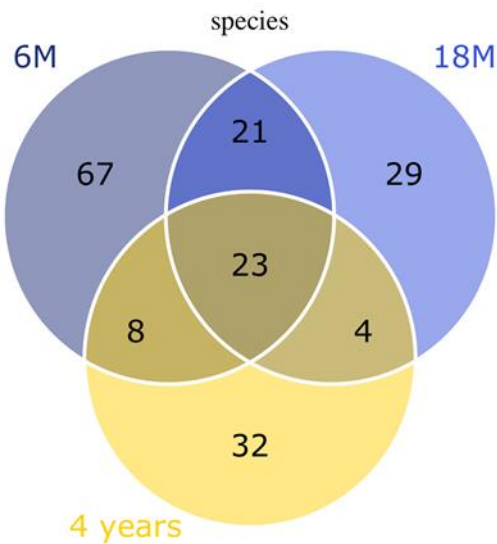


Figure 2A-B. (A) Number of genomes significantly altered after SG at the different time points compared to baseline. (B) Principal coordinate analysis based on Bray-Curtis for the 152 microbial genomes significantly altered in the 6M and 18M samples compared to baseline.

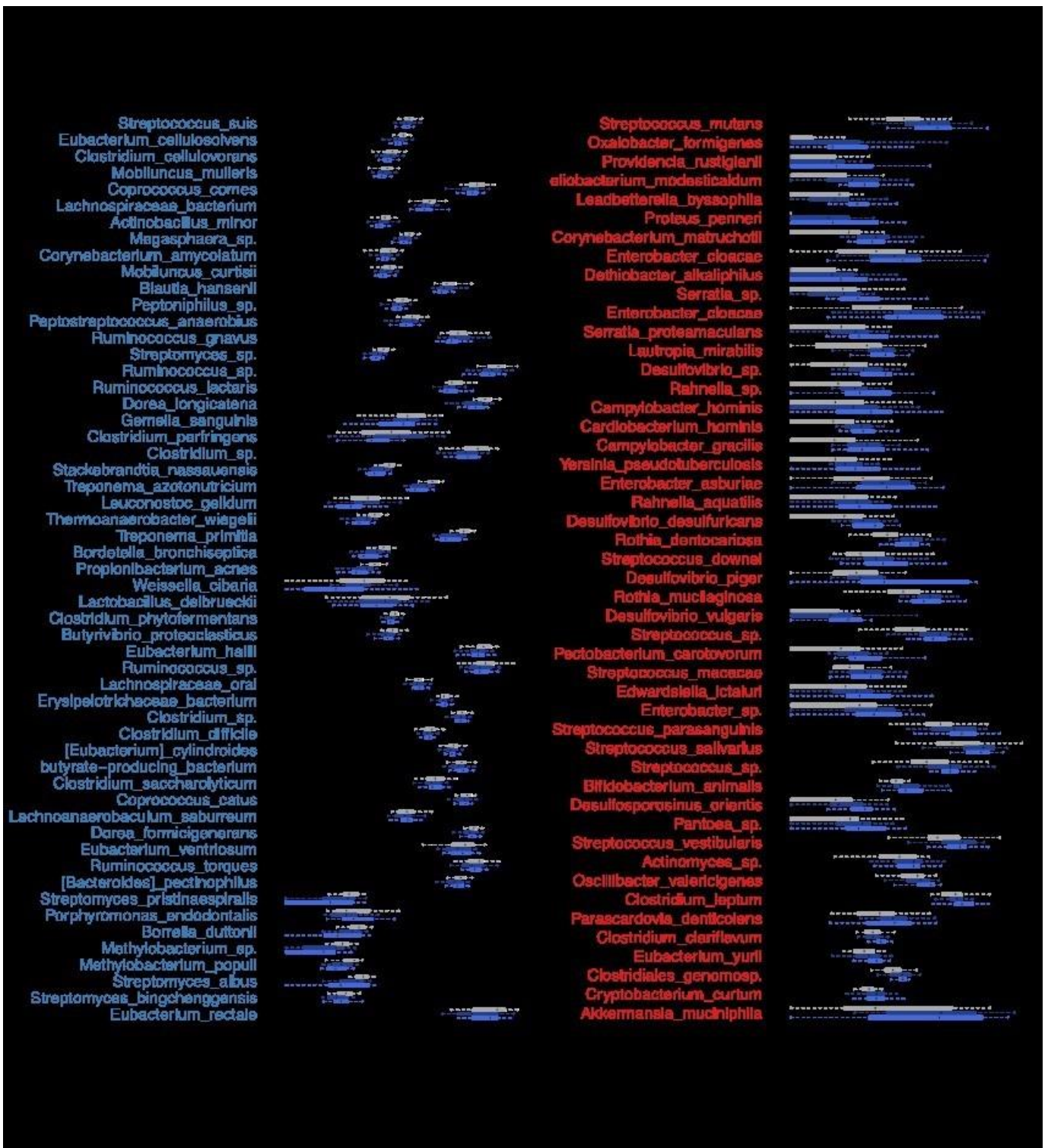


Figure 3 Box plots showing the relative abundance of genomes significantly shifted by SG in the 6M and 18M samples (n=152) in the longitudinal cohort. Taxa in blue were enriched and those in red were enriched in the post-surgery samples (Wald-test, $p < 0.05$). Boxes represent interquartile ranges (IQRs) between the first and third quartiles, and lines inside the boxes represent the median; whiskers indicate the lowest and highest values within 1.5 times the IQR from the first or third quartiles. Data point beyond whiskers are represented as individual values.

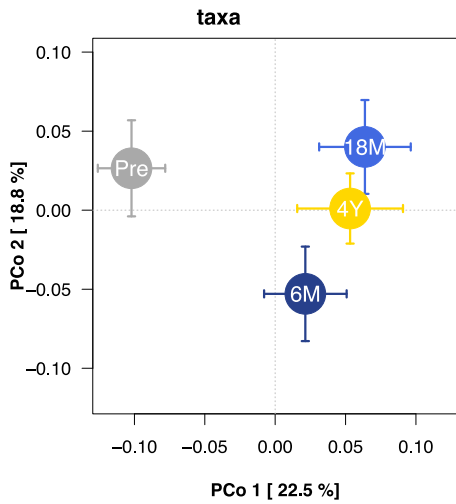


Figure 4 Principal coordinate analysis based on Bray-Curtis dissimilarity calculated for the 152 genomes significantly changed in the 6M and 18M samples compared to baseline

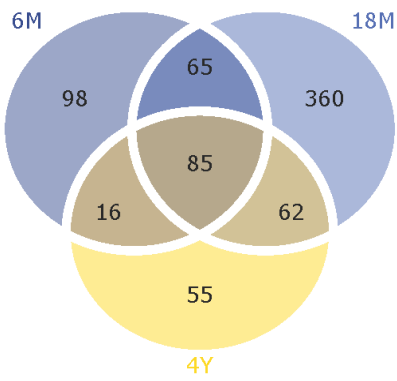


Figure 5 Venn diagram indicating the number of gene functions significantly altered at 6M, 18M and 4Y after SG

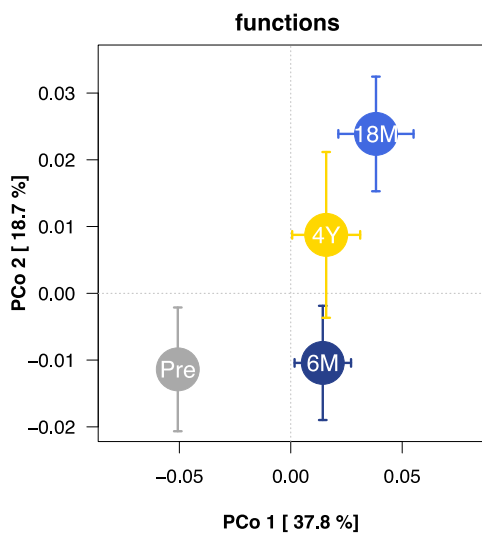


Figure 6 Principal coordinate analysis based on Bray-Curtis dissimilarity calculated for the 686 gene functions significantly changed in the 6M and 18M samples compared to baseline.

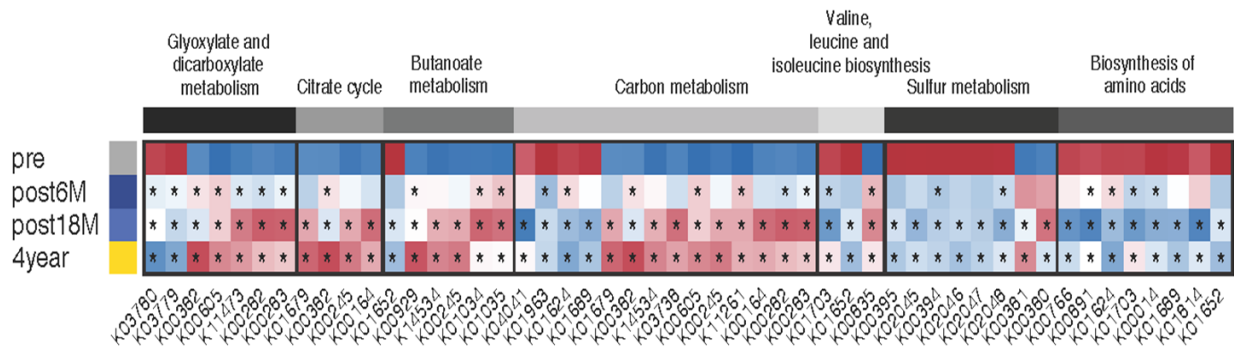


Figura 7 Heat map showing the pathways and gene functions significantly altered by SG. Pathways were identified for the 686 gene functions significantly changed in the 6M and 18M samples compared to baseline. Stars indicate significant changes.

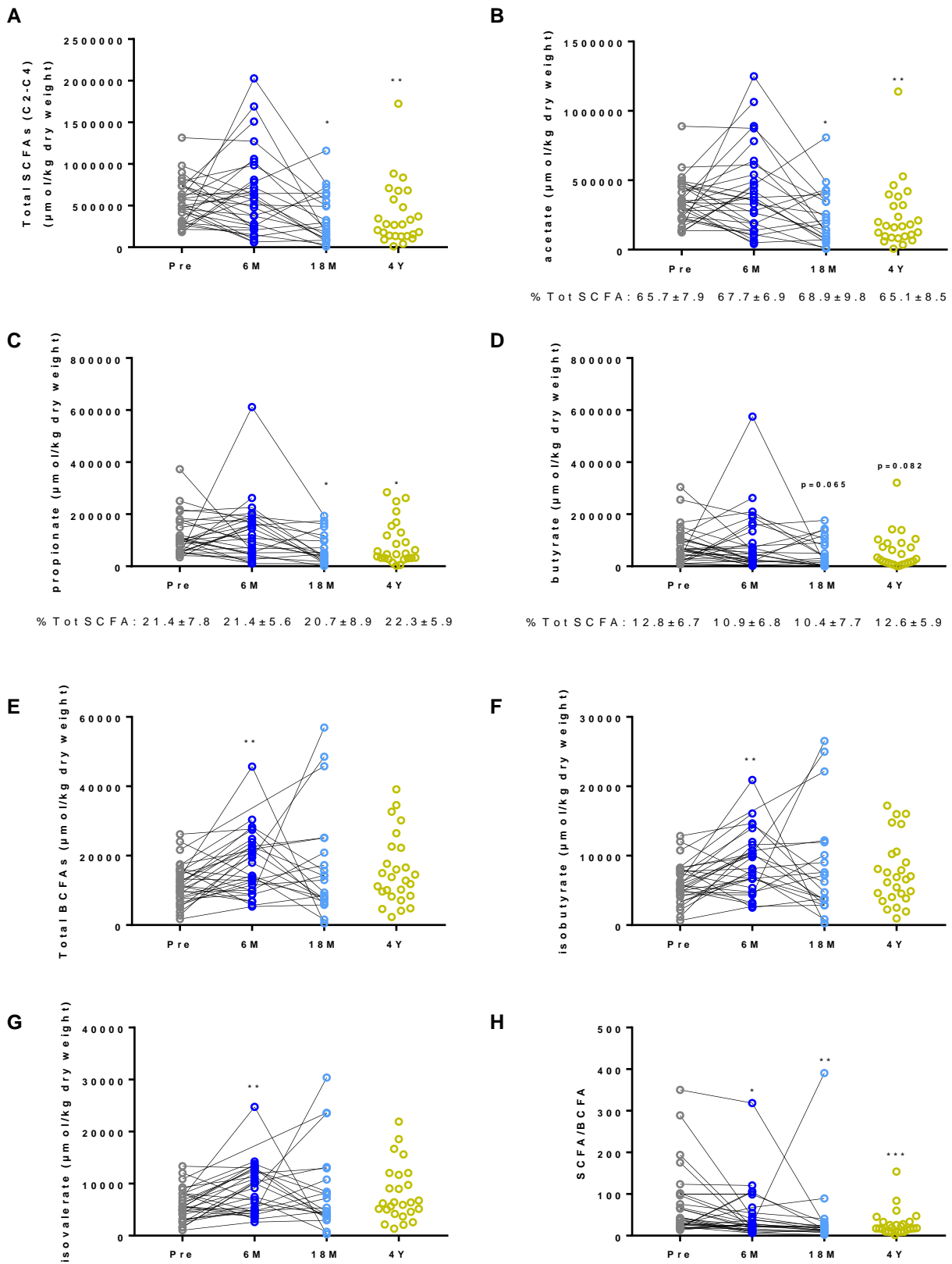


Figura 8 A-H Livelli fecali di SCFAs e BCFA

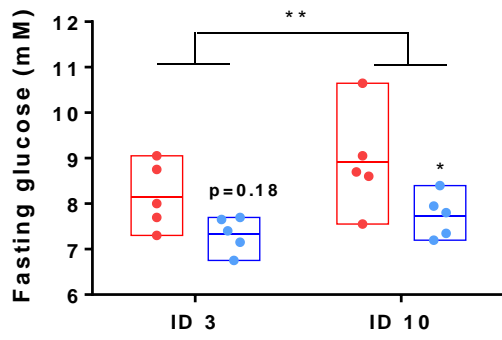
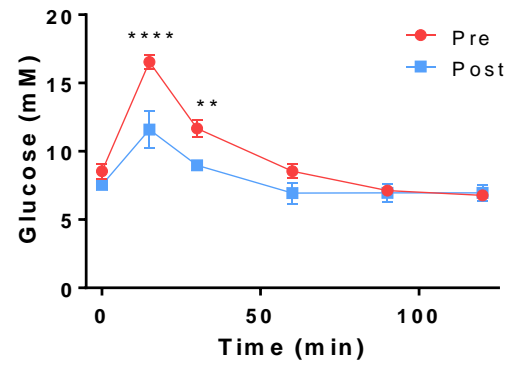
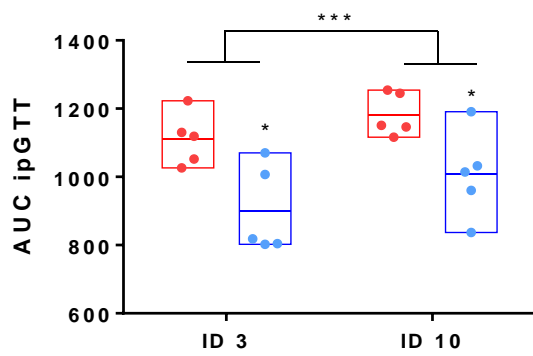
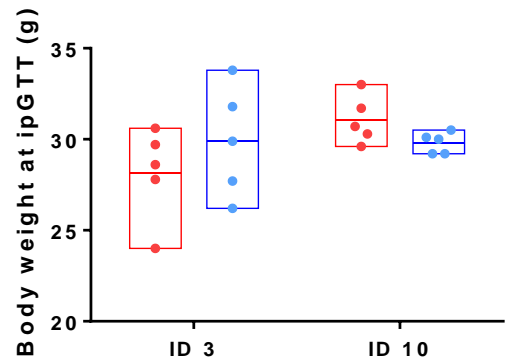
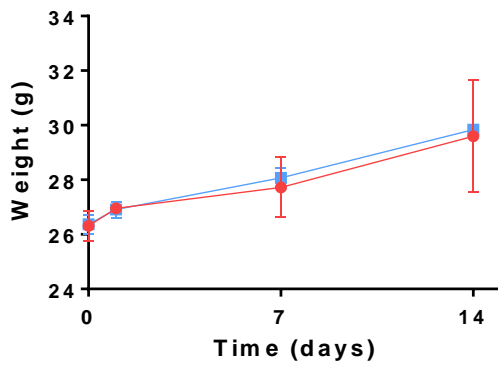
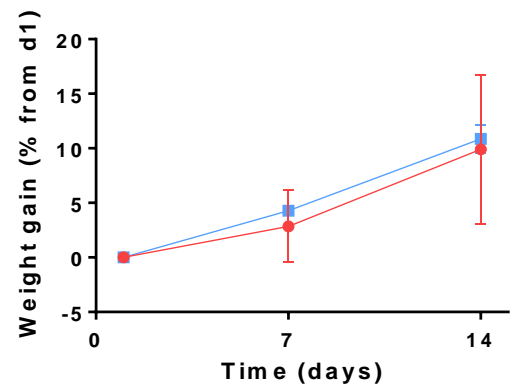
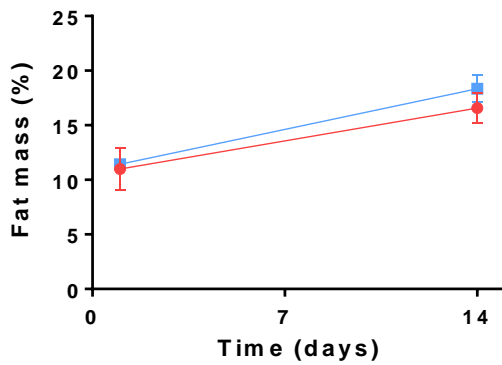
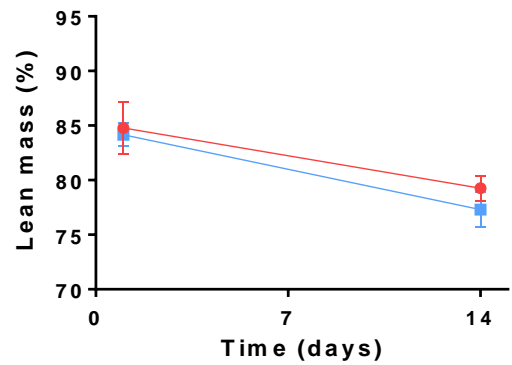
A**B****C****D****E****F****G****H**

Figure 9A-H The surgically-altered human gut microbiota influences glucose tolerance in transplanted mice. (A) Fasting blood glucose levels before intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (** $p < 0.01$ for mice colonized with human microbiota from baseline and 18 months follow-up). (B) Blood glucose levels during ipGTT (***) $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$, for mice colonized with microbiota from baseline and 18 months follow-up). (C) Area under the curve (AUC) calculated from data displayed in B (***) $p < 0.001$ for mice colonized with microbiota from baseline and 18 months follow-up). (D) Body weight at the time of ipGTT. (E) Body weight, (F) weight gain (expressed as percentage of body weight one day after colonization), (G) fat mass and (H) lean mass during the two-week colonization period. 4-5 mice were colonized per donor microbiota for a total of 2 donors (ID 3 and ID 10). Pre, microbiota transplantations with fecal samples before surgery; Post, microbiota transplantations with fecal 18M fecal samples. The lines in the bar plots indicate mean values of measured parameters, with dots showing measurements from individual mice. For the curves in panels B, E, F, G and H mean values are shown. The statistical significance of differences between groups was tested by Mixed ANOVA (curves in panels B, E, F, G and H) and two-way ANOVA (bar plots in panels A, C, and D).

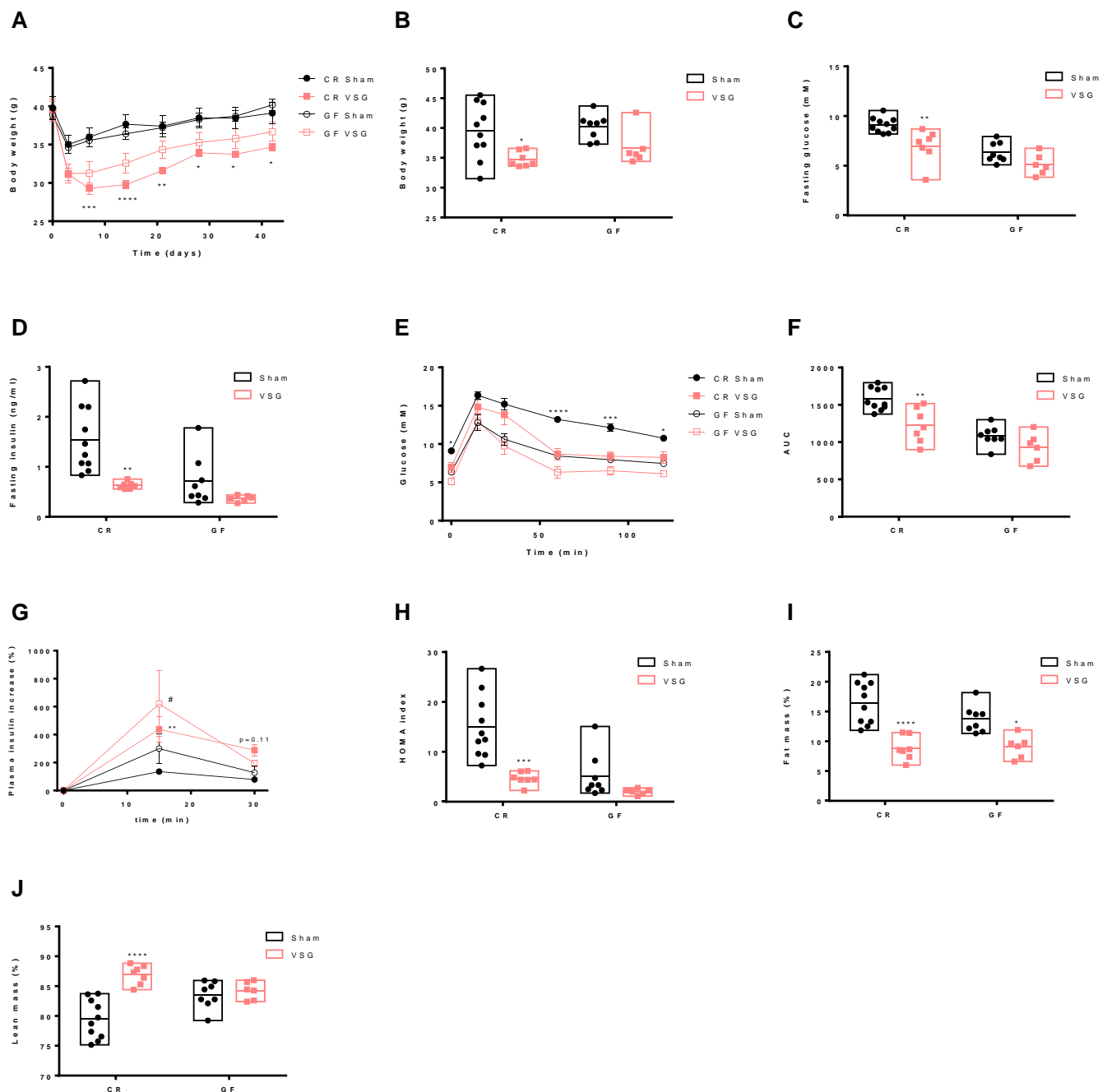


Figure 10A-H Results of SG and sham surgery in conventionally raised and germ-free mice. (A) Body weight over a six-week period and (B) at the end of the experiment at the time of the oral glucose tolerance test. (C) Fasting blood glucose and (D) fasting insulin levels before oral glucose administration. (E) Blood glucose levels during the oral glucose tolerance test. (F) Area under the curve (AUC) based on data displayed in E. (G) Glucose-stimulated insulin release expressed as a percentage of the basal insulin levels. (H) HOMA index calculated from the fasting glucose and insulin levels displayed in C and D, respectively. (I) Fat mass and (J) lean mass at the end of experiment 42 days after surgery. CR, conventionally raised mice (sham, n=10; SG, n=7); germ-free, germ-free mice (sham, n=8; SG, n=6). The lines in the bar plots indicate mean values of measured parameters, with dots showing measurements from individual mice. For the curves in panels A, E and G mean values are shown. The statistical significance of differences between groups was tested by Mixed ANOVA (curves in panels A, E and G) and two-way ANOVA (bar plots in panels B, C, D, F, H, I and J). **** p < 0.0001; *** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05 for the comparison of sham and SG mice in the CR group. # p < 0.05 for the comparison of sham and SG mice in the germ-free group.

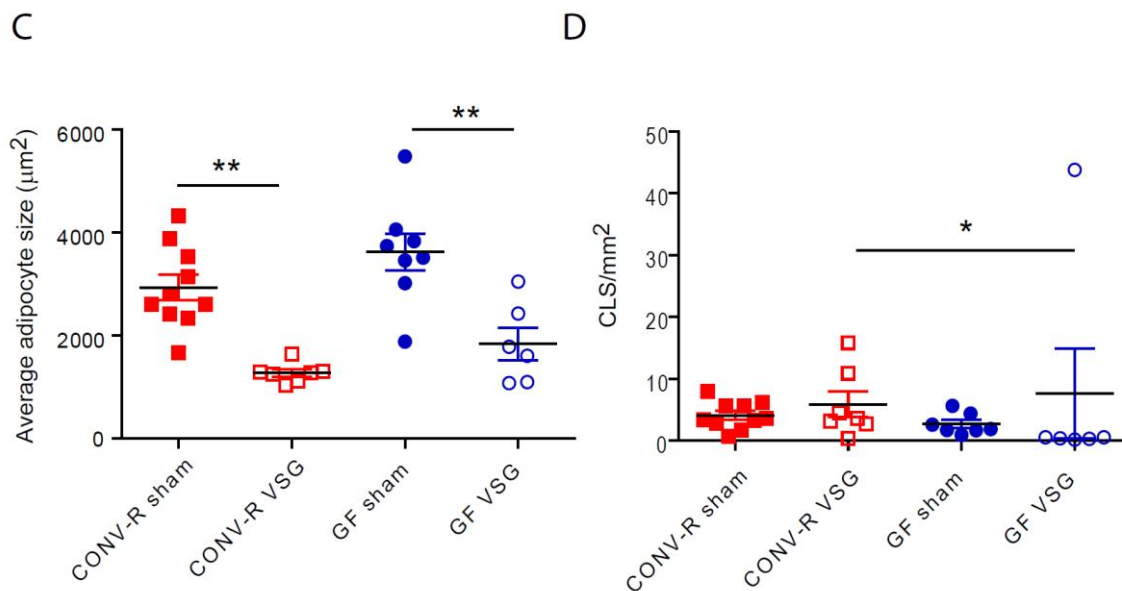
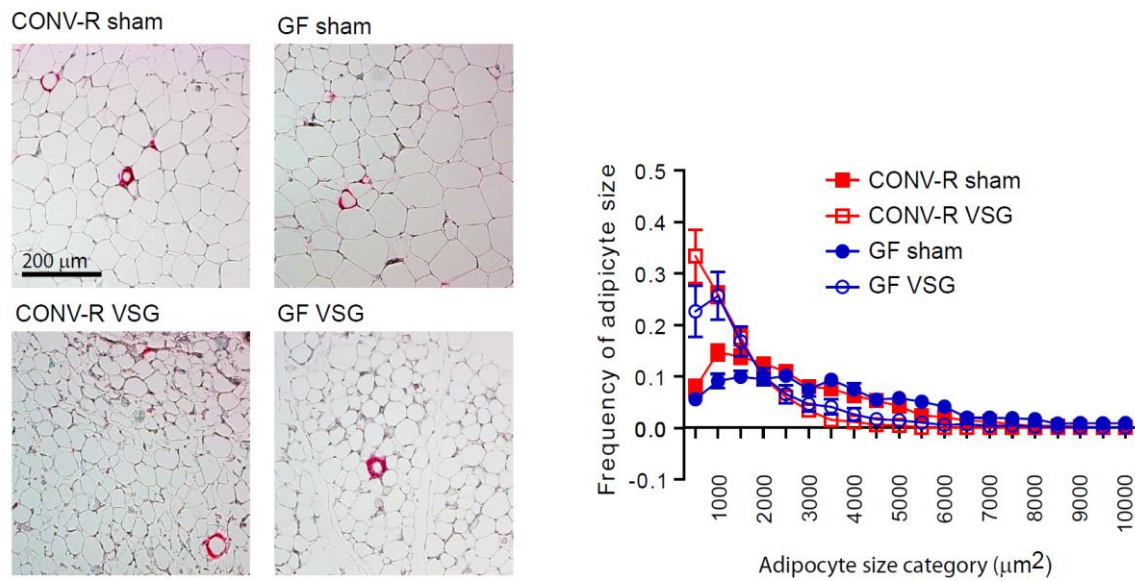


Figure 11 A-D Adipocyte size and presence of crown-like structures (CLS) in epididymal white adipose tissue of CONV-R and GF mice after VSG or sham surgery. (A) Representative Mac-2 immunostaining. Scale bars, 200 μm . (B) Distribution of adipocyte sizes ($n = 6-10$ mice per group). (C) Average adipocyte size ($n = 6-10$ mice per group). (D) Quantification of CLS ($n = 6-10$ mice per group). The statistical significance of differences between groups was tested by two-way ANOVA (Panel C and D). Mean values \pm SEM are plotted; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

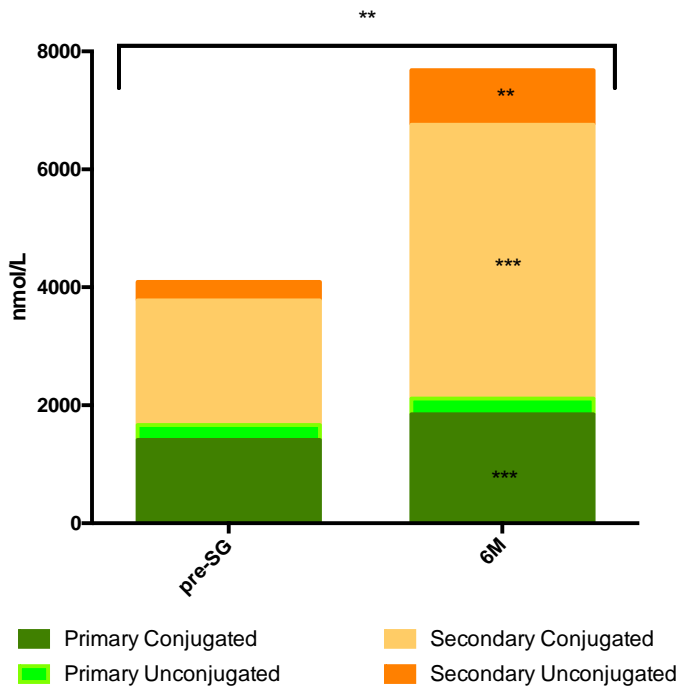


Figura 12 Mean values of conjugated, unconjugated, primary and secondary bile acids measured at the 90-minute time point during the meal test in the longitudinal cohort before (pre-SG) and 6 months after SG (6M).

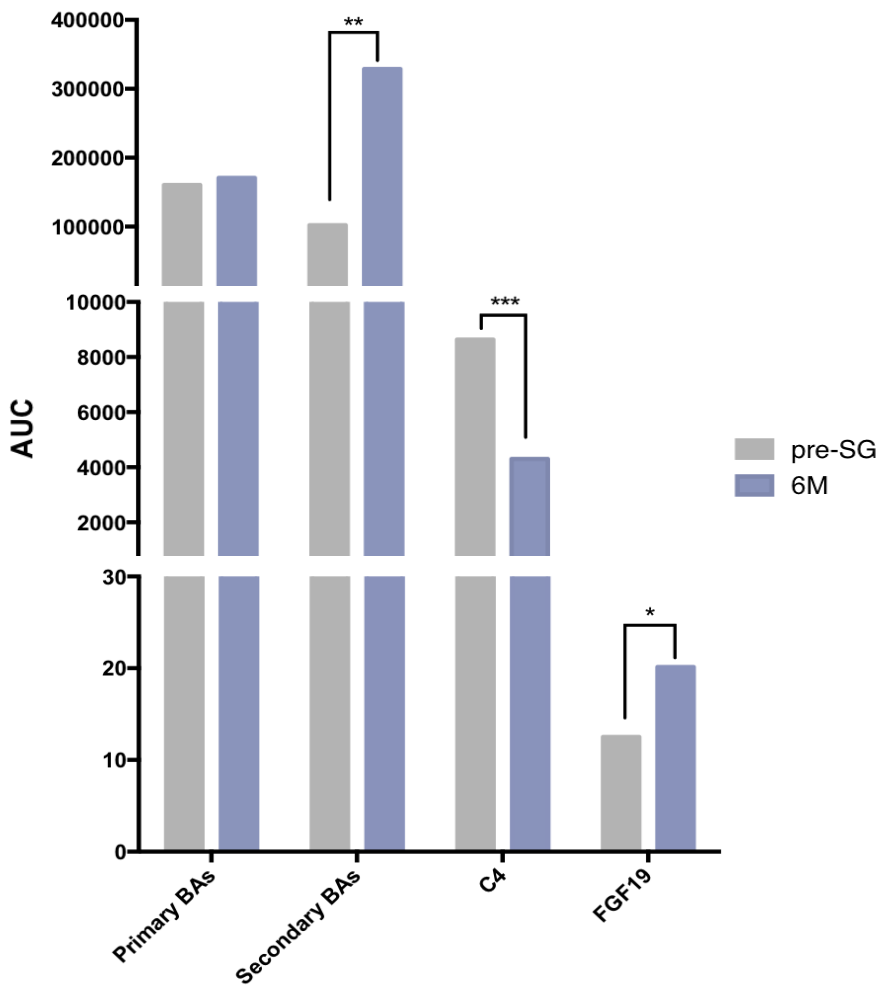


Figure 13 AUC during the meal test before sleeve-gastrectomy (pre-SG) and after 6 six months (6M) for primary bile acids, secondary bile acids, C4 and FGF19

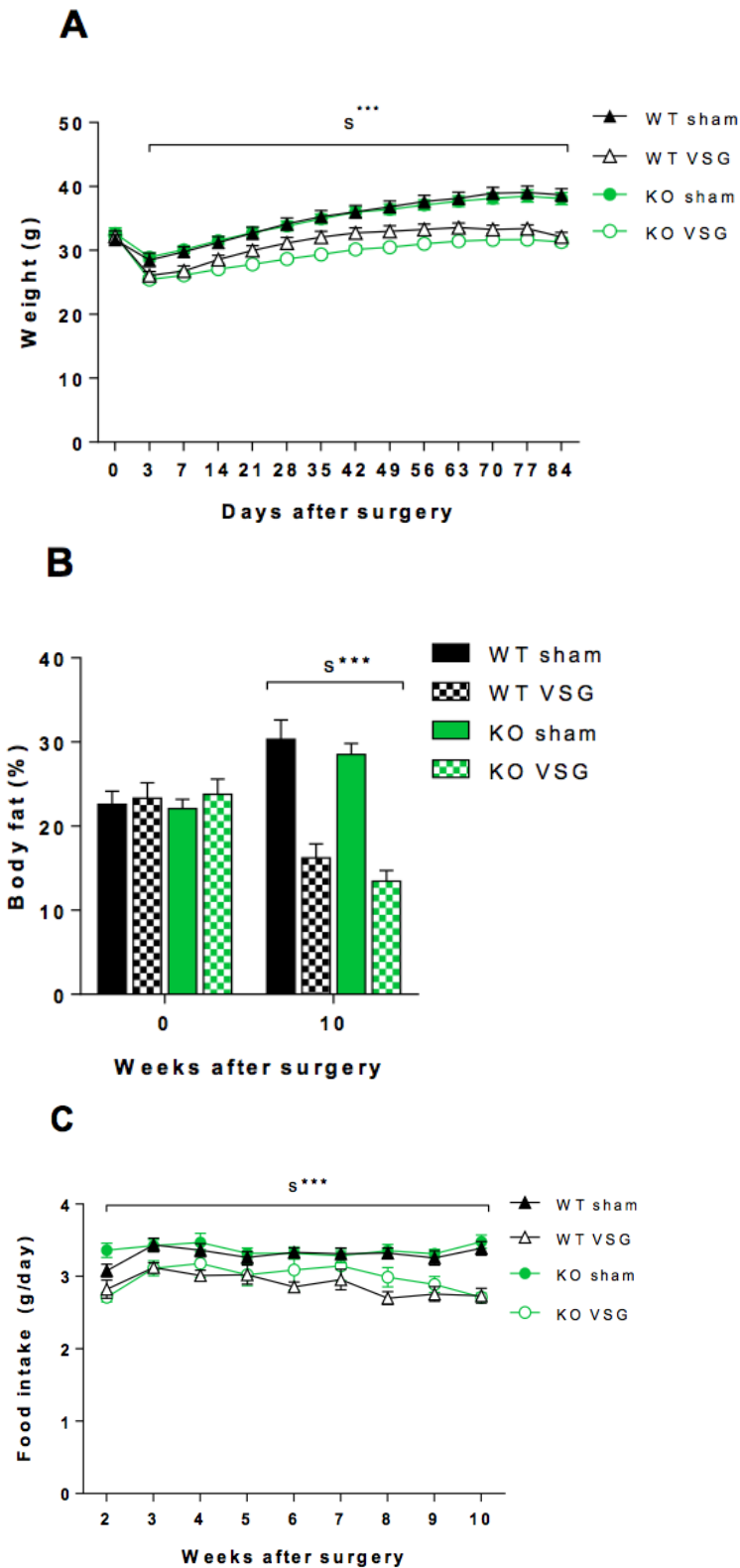


Figure 14A-C: VSG induces similar weight loss and body fat reduction in *Ins15* WT and KO mice. (A) Body weight, (B) body fat and (C) food intake in WT and KO mice at the indicated times after sham or VSG surgery. s*** indicates $P < 0.001$ for effect of surgery; mixed ANOVA for A and C, two-way ANOVA for B ($n = 8-15$ /group).

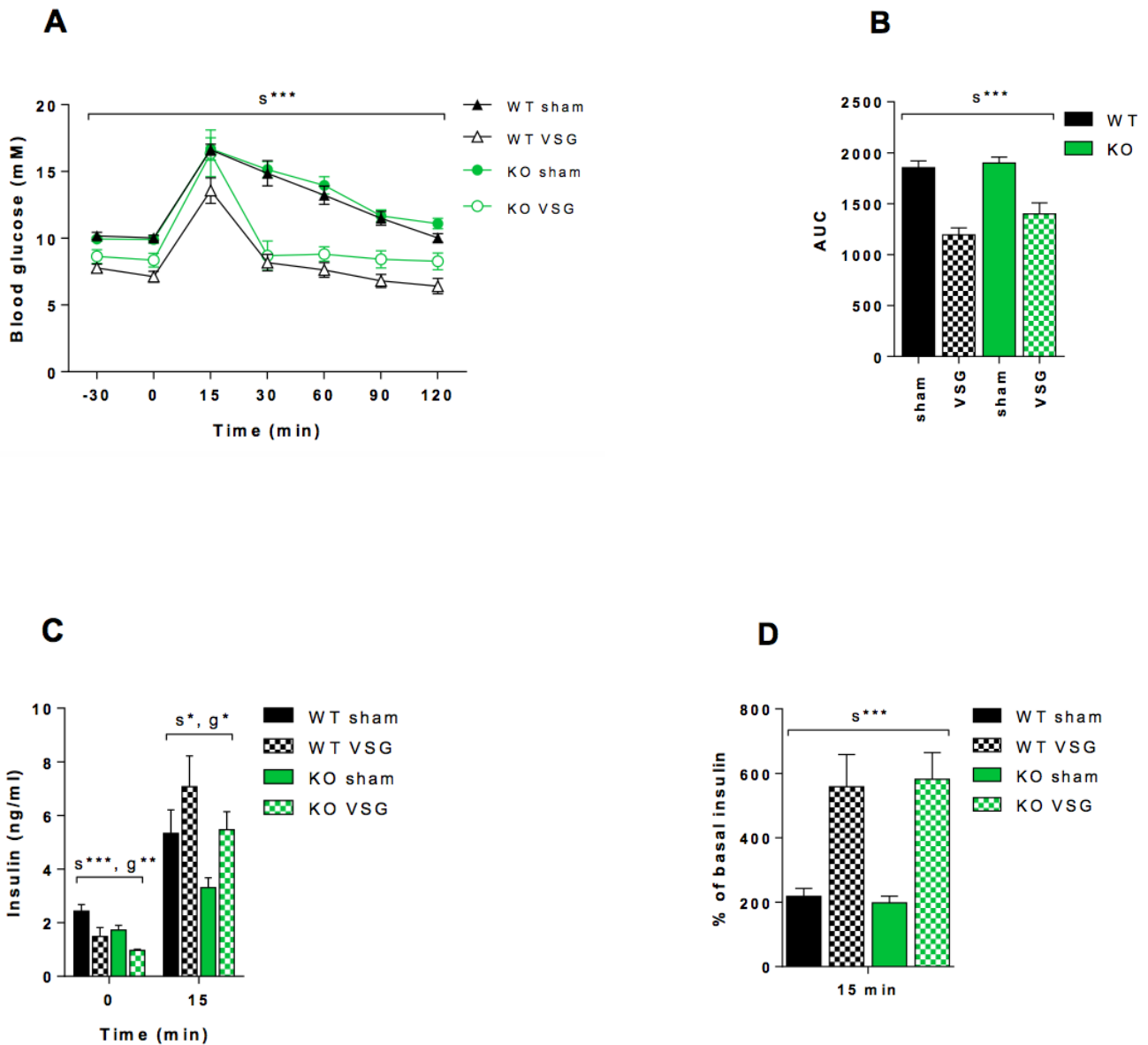


Figure 15 A-D VSG improves oral glucose tolerance in both *Ins1/5* WT and KO mice. (A) Blood glucose levels during an oral glucose tolerance test and (B) area under the curve (AUC) on data from A in WT and KO mice after sham or VSG surgery. (C) Serum insulin levels at 0 min (basal) and 15 min after glucose gavage and (D) as a % of basal insulin at 15 min after glucose gavage. s^* and s^{*} indicate $P < 0.05$ and $P < 0.001$ for effect of surgery, respectively; g^* and g^{**} indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$ for effect of genotype, respectively; mixed ANOVA for A, two-way ANOVA for B-D ($n = 8-15$ /group).**

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare va a mio padre e mia madre che mi hanno trasmesso la passione per la conoscenza e a mio marito mi ha sempre supportato e sopportato in questo percorso.

Ringrazio Antonio Molinaro con cui da dodici anni condivido non solo il mio percorso di studi ma anche una profonda amicizia.

Ringrazio i miei colleghi e amici Lucia e Edoardo che sono sempre al mio fianco anche quando sono fisicamente lontani

Ringrazio Monica Mischitelli con cui ho il piacere e ma soprattutto l'onore di condividere il laboratorio

Ringrazio anche il Prof. Stefano Ginanni Corradini che mi ha insegnato giorno dopo giorno a diventare un medico e una ricercatrice migliore.