

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**IN**

**SCIENZE DELL'ALIMENTAZIONE  
E DELLA NUTRIZIONE  
XXV CICLO**

**COORDINATORE: Prof. FRANCO CONTALDO**

**TESI DI DOTTORATO**

**MICROBIOTA INTESTINALE, ENTEROORMONI,  
ALCUNE CITOKINE PRO-INFIAMMATORIE IN  
DIFFERENTI CONDIZIONI NUTRIZIONALI  
(INFLUENZA SU ALCUNI PARAMETRI CLINICI,  
BIOCHIMICI E FUNZIONALI)**

**Tutore**

**Dottoranda**

**Ch.mo Prof.**

**Dr.ssa**

**Franco Contaldo**

**Concetta Del Piano**

**ANNO ACCADEMICO 2012-2013**

## **INDICE**

### **Cap. 1 – Introduzione**

- 1.1 - Caratterizzazione del microbiota intestinale
- 1.2 - Funzioni del microbiota
- 1.3 - Interazioni metaboliche del microbiota
- 1.4 - Microbiota ed infiammazione
- 1.5 - Microbiota in differenti condizioni nutrizionali: obesità, anoressia, sindrome da intestino corto, chirurgia bariatrica .
- 1.6 - Enterormoni ed adipocitokine in differenti condizioni nutrizionali
- 1.7 - Microbiota ed epatosteatosi in differenti condizioni nutrizionali

### **Cap. 2 – Scopo dello Studio**

### **Cap. 3 – Pazienti e metodi**

- 3.1 - Pazienti
- 3.2 - Parametri antropometrici
- 3.3 - Calorimetria indiretta
- 3.4 - Bioimpedenziometria
- 3.5 - Questionario sulle abitudini alimentari
- 3.6 - Ecografia epatica
- 3.7 - Indagini di laboratorio
- 3.8 - Raccolta campioni di feci
- 3.9 - Determinazione acidi grassi a catena corta fecali (SCFA)

### **Cap.4 – Analisi statistica**

### **Cap. 5 – Risultati**

### **Cap. 6 – Discussione**

### **Cap.7 - Conclusioni**

### **Cap. 8 – Tabelle e figure**

### **Cap. 9 – Bibliografia**

## **Introduzione**

### **1.1 Caratterizzazione del microbiota**

L'intestino umano rappresenta un ecosistema in cui trilioni di batteri convivono ed interagiscono con l'organismo ospite, rappresentando un "organo metabolico" capace di influenzare la regolazione di molte funzioni sistemiche, contribuire allo stato di salute, avere un ruolo in molte malattie gastrointestinali (colon irritabile, malattie infiammatorie croniche, diverticolite, cancro del colon) e sistemiche (allergie, obesità, diabete tipo 2, aterosclerosi) (1-3).

Il tratto gastrointestinale ospita tra 500 e 1000 differenti specie di batteri che mantengono in condizioni fisiologiche, una relazione simbiotica con l'ospite. Il numero di cellule batteriche è 10 volte superiore al numero delle cellule eucariotiche umane (4).

Le nuove tecnologie genetiche di studio della flora batterica, hanno permesso di identificare e studiare il "metaboloma", cioè il complesso superorganismo costituito dal genoma di microbiota ed ospite, e la sua influenza sullo stato di salute e di malattia.

La mancanza di adeguate tecniche di laboratorio ha per molto tempo condizionato lo studio del microbiota intestinale, essendo le classiche metodiche colturali inadeguate essendo gran parte della flora costituita da germi Anaerobi.

Lo sviluppo delle tecniche basate sul sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale ha facilitato l'identificazione e la classificazione dei batteri. Il microbioma, cioè il genoma batterico complessivo è 100 volte maggiore rispetto al genoma umano ed è principalmente rappresentato da Anaerobi. I batteri dominanti nell'uomo adulto appartengono a tre gruppi prevalenti: i Firmicuti gram positivi, i Bacteroideti gram negativi e gli Actinobatteri gram positivi. Questi ultimi vengono spesso sottostimati nell'analisi dell'RNA 16S, pertanto per la loro identificazione è indispensabile la FISH (fluorescent in situ hybridization).

Ai Firmicuti appartengono 200 generi tra cui i Lattobacilli, i Mycoplasmi, i Bacilli e i Clostridi. Ai Bacteroideti appartengono 20 generi.

Attualmente si può osservare che la concentrazione dei microrganismi è molto alta nella cavità orale, ove consiste principalmente di anaerobi come Prevotella, Peptostreptococchi, Bacteroidi, Fusobacterium ed

Eubacterium. La popolazione batterica è scarsa nello stomaco a causa del pH estremamente acido dell'ambiente gastrico ed è rappresentata soprattutto da Lattobacilli, Streptococchi e Lieviti che risiedono nello strato di mucosa che riveste l'epitelio gastrico.

Anche il duodeno ha una bassa popolazione microbica a causa del veloce tempo di transito e della secrezione di fluidi biliari e pancreatici che uccidono la maggior parte di batteri ingeriti, e per l'effetto dell'attività motoria propulsiva che impedisce la colonizzazione stabile del lume.

Si osserva un progressivo aumento nel numero delle specie dal digiuno all'ileo (da  $10^4$  a  $10^7$ ), cominciando ad aumentare i gram negativi e gli anaerobi obbligati.

Il colon contiene un complesso e dinamico ecosistema microbico con  $10^{10}$ - $10^{12}$  cellule/grammo o millilitro di contenuto luminale, costituito in maggioranza da anaerobi, particolarmente abbondanti nel cieco e nel colon destro a causa della grande disponibilità di substrati e del favorevole ambiente per la crescita batterica (basso tempo di transito, disponibilità pronta di nutrienti, Ph favorevole etc.) (5-6).

Nel colon ci sono diverse centinaia di specie identificabili ed un numero significativo di specie che non possono essere

coltivate con metodi convenzionali. La maggior parte dei batteri del colon sono anaerobi non sporigeni (7-8). Successivamente alla colonizzazione, i batteri pionieri modulano l'espressione genica nelle cellule epiteliali dell'ospite; in questo modo creano un favorevole habitat per se stessi e prevengono la crescita di altri batteri introdotti successivamente nell'ecosistema .

Alla nascita l'intestino è essenzialmente sterile. La colonizzazione del tratto gastrointestinale inizia alla nascita con Bacteroidi e Bifidobatteri in caso di parto per via vaginale; in caso di nascita per parto cesareo, inizia con l'alimentazione. Il tipo di allattamento (al seno materno o artificiale) condiziona il tipo di flora batterica intestinale. Il primo anno di vita è fondamentale per l'attecchimento del microbiota, che si accresce e si seleziona tra il primo ed il quarto anno di età, evolvendosi poi fino all'età adulta in maniera variabile da individuo ad individuo (9-11).

Nei bambini tra 1 e 7 anni di età è presente un maggior numero di enterobatteri rispetto agli adulti, con una maggiore abbondanza di generi Bifidobacterium e Clostridium (12-13). Il microbiota intestinale adulto resta relativamente stabile nel tempo (14). In età geriatrica, sia il numero che le

differenze tra specie di *Bacteroides* si riduce ed aumentano i batteri del genere *Clostridium* (15).

Non è stato ancora definitivamente chiarito come l'ambiente e l'alimentazione possano influire sulla composizione del microbiota intestinale. Studi sul 16S rRNA hanno mostrato che nei bambini del Nord Europa vi è un maggior contenuto fecale di *Bifidoacteria*, mentre nelle feci di bambini del Sud Europa sono più rappresentati i *Bacteroideti* e di *Lattobacilli* (16). Una maggiore differenza è stata osservata tra bambini africani ed italiani, in quanto nelle feci dei bambini Africani di villaggi rurali sono presenti più *Bacteroidetes* ed *Actinobacteria* e meno *Firmicutes* e *Proteobacteria* dei bambini Italiani. Inoltre nelle feci dei bambini africani vi è maggiore quantità di SCFA (17). Uno studio di metagenomica su feci di individui provenienti da quattro nazioni di continenti diversi, ha permesso di identificare tre enterotipi non nazione- o continente- specifici. L'enterotipo I è ricco in *Bacteroidetes* e trae energia principalmente dalla fermentazione di carboidrati e proteine. L'enterotipo II è ricco in *Prevotella* e *Desulfovibrio*, che degradano le glicoproteine del muco presente sulla barriera mucosale

intestinale. L'enterotipo III è ricco in Ruminococcus e Akkermansia e degrada mucine (18).

Differenti abitudini alimentari contribuiscono alla diversità del microbiota intestinale, così come l'introduzione dell'amido nell'alimentazione umana spiega il polimorfismo dei geni dell'amilasi salivare (19). Lo studio sui bambini Africani ha messo in evidenza una maggiore presenza di Prevotella, Xylanibacter e Treponema, che possiedono enzimi per massimizzare l'estrazione di energia da xilani e cellulosa, presenti in gran quantità nella dieta povera in calorie ma ricca in fibre di questi bambini (17).

## **1.2 Funzioni del microbiota**

La flora intestinale svolge funzioni essenziali nella tutela della salute, avendo un ruolo metabolico, strutturale e protettivo.

L'analisi molecolare ha dimostrato che i batteri commensali modulano l'espressione di geni coinvolti in parecchie importanti funzioni intestinali ed extra intestinali, incluso il metabolismo xenobiotico, la maturazione intestinale post-natale, l'assorbimento dei nutrienti, la fortificazione della barriera mucosale.

La fermentazione di residui alimentari non digeribili e di muco endogeno prodotto dall'epitelio è la principale fonte di energia nel colon. L'endpoint metabolico è rappresentato dalla produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA: acetato, propionato, butirrato in rapporto 60:25:15). Nel cieco e colon destro la fermentazione è molto intensa con una elevata produzione di SCFA, produzione di un pH acido (range 5-6) e una rapida crescita batterica. Per contro, il substrato nel colon sinistro o distale è meno disponibile, il pH è quasi neutro e i processi putrefattivi diventano quantitativamente più importanti e l'attività della popolazione batterica è più bassa.

Gli SCFA hanno funzioni importanti nella fisiologia dell'ospite: 1) il butirrato è la principale fonte di energia per l'epitelio del colon; 2) l'acetato e il propionato sono metabolizzati dal fegato (propionato) o dai tessuti periferici, in particolare i muscoli (per l'acetato), e possono avere un ruolo come modulatori del metabolismo del glucosio e del colesterolo (20, 21,22).

I batteri che producono SCFA sembrano influenzare il ciclo degli enterociti nel colon; in particolare il butirrato inibisce la proliferazione cellulare, stimola la differenziazione nelle

linee cellulari neoplastiche epiteliali in vitro e promuove il ritorno da fenotipo neoplastico a non neoplastico (23-24).

La putrefazione invece, è il metabolismo anaerobico di peptidi e proteine (elastina e collagene da fonti alimentari, enzimi pancreatici, cellule epiteliali esfoliate e batteri lisati, ecc); anch' essa produce SCFA ma, al tempo stesso, genera sostanze potenzialmente tossiche tra cui: ammoniaca, ammine, fenoli, tioli, e indoli (25).

La 7-deidrossilasi batterica partecipa nel colon alla deconiugazione di sali biliari, formando acidi biliari, primari e secondari, e in parte partecipa al loro riassorbimento enteroepatico (26).

I microorganismi del colon svolgono anche un ruolo nella sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, PP, H, acido pantotenico e folico) e nell'assorbimento di calcio, magnesio e ferro, questo ruolo è ulteriormente migliorato dalla presenza di SCFA (27).

I batteri residenti sono una linea fondamentale di resistenza alla colonizzazione da parte di microbi esogeni. Essi regolano attivamente la produzione di nutrienti da parte dell'ospite tramite un meccanismo di feedback negativo, al fine di

prevenire la disponibilità di nutrienti per potenziali patogeni (28,29).

Inoltre, competono per i siti di attacco sull'orletto a spazzola delle cellule epiteliali intestinali così da inibire la crescita di loro concorrenti patogeni, attraverso la produzione di sostanze antimicrobiche chiamate batteriocine (30,31).

La mucosa intestinale rappresenta l'interfaccia principale tra il sistema immunitario e l'ambiente esterno, e la collaborazione tra l'ospite e i batteri sembra giocare un ruolo nello sviluppo del sistema immunitario. Infatti, le placche di Peyer si sviluppano solo quando gli animali germ-free sono esposti ai batteri e risultano più abbondanti nell'ileo dove il numero dei batteri è più elevato (32).

Ad esempio, topi Germ-free hanno un sistema linfatico non ben sviluppato, con poche placche di Peyer e follicoli linfoidi isolati (19,20). Inoltre, le cellule dendritiche intestinali sono meno presenti negli animali Germ-free, e ci sono prove a favore di un ruolo del microbiota nello sviluppo dei linfociti B (33,34).

Inoltre, segnali dai batteri intestinali appaiono importanti per lo sviluppo della regolazione dei linfociti T helper di tipo 1 e 2 (35,36,37).

La prima molecola di un microrganismo commensale che ha dimostrato influenza benefica sulla risposta immunitaria è stato il polisaccaride capsulare A, prodotto dal *Bacteroides fragilis* (38). Acidi grassi a catena corta, come il butirrato, possono anche esercitare effetti immunomodulatori potenti sopprimendo l'attivazione del fattore nucleare  $\kappa$ B e/o agendo sui recettori accoppiati a G-protein come dimostrato dall'acetato (39,40). Vi è quindi una relazione dinamica tra sistema immunitario e microbiota. La mucosa intestinale segnala una minaccia al sistema immunitario innato, attraverso recettori di ricognizione come i recettori Toll-like. Tali recettori riconoscono e legano macromolecole microbiche specifiche, che includono lipopolisaccaride, flagellina, peptidoglicano, e peptidi N-formylati. Nella mucosa intestinale l'attivazione dei recettori di ricognizione inizia la via del fattore nucleare  $\kappa$ B, quella delle protein chinasi e delle caspasi, attivando una cascata di segnali. Questo conduce alla produzione e al rilascio di peptidi protettivi, citochine, chemochine, e fagociti. Tutto ciò ha come risultato una risposta protettiva da parte dei batteri commensali, una risposta infiammatoria ad organismi patogeni, o l'innescamento di apoptosi. Pertanto, i batteri

commensali del tratto gastrointestinale svolgono un ruolo attivo nello sviluppo e omeostasi del sistema immunitario. Inoltre, mentre i batteri potenzialmente patogeni hanno un aspetto monomorfo, gli organismi commensali sono in grado di cambiare continuamente la loro antigenicità di superficie, sfuggendo così continuamente all'immuno-sorveglianza dell'ospite e contribuendo al mantenimento di una nicchia ecologica predominante nel tratto intestinale (41).

### **1.3 Funzioni metaboliche del microbiota**

La flora intestinale sembra essere un fattore ambientale capace di influenzare il metabolismo e l'omeostasi energetica dell'ospite, essendo anche coinvolta nel controllo del peso corporeo attraverso l'estrazione di una quota supplementare di calorie dagli alimenti ingeriti. Gli esperimenti del gruppo di Gordon alla base di tale considerazione, sono partiti dalla scoperta che topi germ-free (axenici), sono più magri (40% di grasso corporeo in meno e 47% di grasso gonadico in meno) rispetto ai topi che vivono con flora intestinale normale (convenzionalizzati), anche se

questi ultimi hanno mangiato circa il 30% in meno rispetto ai topi axenici. La convenzionalizzazione di topi axenici con batteri provenienti dal cieco di topi magri, induce un drammatico aumento di peso corporeo (massa grassa corporea totale) entro due settimane, senza che vi sia stato un aumento nell'assunzione del cibo (42).

Questo aumento della massa grassa è ancora più evidente quando la comunità microbica intestinale deriva da topi geneticamente obesi (ob-ob) (43).

Questi risultati sono verosimilmente dovuti alle differenze nel microbioma e/o nei metaboliti da esso derivati dei topi magri o obesi.

A questo proposito, Ley et al. hanno dimostrato che i topi obesi presentano un maggior rapporto Firmicutes/Bacteroidetes nel microbiota del cieco rispetto a quello di topi magri (44).

Per spiegare ciò, sono stati proposti vari meccanismi Fig. 1 e Fig. 2

Il primo percorso suggerito dai ricercatori è che la convenzionalizzazione del microbiota intestinale raddoppia la densità di capillari a livello dell'epitelio dei villi del piccolo

intestino, contribuendo a raddoppiare l'assorbimento intestinale dei monosaccaridi (45).

Il secondo meccanismo è legato alla estrazione di energia dai componenti alimentari (polisaccaridi della fibra) non digeribili da parte degli enzimi umani, che vengono processati dagli enzimi batterici con produzione di monosaccaridi (successivamente assorbiti) e di acidi grassi a catena corta (SCFA) (attraverso la fermentazione); questi ultimi partecipano alla lipogenesi epatica de novo attraverso l'espressione di alcuni enzimi chiave come acetil-CoA carbossilasi (ACC) e acido grasso sintasi (FAS). Sia ACC che FAS sono controllati da due fattori nucleari: la proteina legante l'elemento responsivo ai carboidrati (ChREBP) e la proteina legante l'elemento responsivo agli steroli (SREBP-1) (46). La convenzionalizzazione di topi axenici promuove l'espressione epatica di mRNA per ChREBP e SREBP-1 inducendo la lipogenesi epatica de novo (42).

Inoltre il microbiota intestinale promuove il deposito di grasso anche attraverso un meccanismo che collega i trigliceridi circolanti alla soppressione dell'espressione intestinale di un inibitore della lipoprotein-lipasi (LPL) che è il FIAF, fattore adiposo indotto dal digiuno. Il FIAF

normalmente inibisce l'attività della LPL, riducendo in tal modo il rilascio degli acidi grassi dai trigliceridi circolanti. Dopo la colonizzazione intestinale con microbiota, l'espressione del FIAF si riduce, con conseguente maggiore attività della LPL e maggiore deposito di grasso (42). In accordo con questa ipotesi, topi carenti in FIAF sono resistenti all'aumento di peso, avvalorando il ruolo di tale fattore nella regolazione della lipogenesi. Tuttavia, uno studio recente ha suggerito che il FIAF non può essere il meccanismo fondamentale che lega il microbiota allo sviluppo di massa grassa, in quanto topi axenici tenuti a dieta ricca di grassi mostrano una maggiore espressione intestinale dell' mRNA per il FIAF, senza che vi siano grandi variazioni del FIAF circolante, rispetto ai topi conventionalizzati (47).

Un terzo percorso esplora ulteriormente i meccanismi relativi alla resistenza all'obesità dei topi axenici tenuti a dieta ricca di grassi. I topi germ free presentano due fattori che aumentano l'ossidazione degli acidi grassi: 1) il FIAF stimola la produzione del peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), che aumenta l'espressione dei geni che codificano per gli enzimi dell'ossidazione mitocondriale; 2) è aumentata l'attività della AMPKinasi, che monitora lo stato

energetico cellulare, regolando l'accumulo o meno di energia (43).

Un quarto percorso coinvolge gli SCFA. Topi knockout per il recettore 41 accoppiato a G protein (GPR41), colonizzati con una comunità microbica fermentativa, resistono all'aumento di peso rispetto a topi con fenotipo convenzionale (48). Gli SCFA agiscono come molecole di segnalazione e sono ligandi specifici per almeno due recettori accoppiati a G protein, il recettore GPR41 e GPR43 (51). In accordo con il potenziale ruolo di questi recettori accoppiati a G protein (GPR) per lo sviluppo della massa grassa, un recente studio ha dimostrato che topi knockout per GPR43 sono resistenti all'obesità indotta dalla dieta (50). Pertanto, questa serie di esperimenti sostiene fortemente l'idea che specifici metaboliti provenienti dall'intestino (ad es gli SCFA) possano agire come substrati energetici e come regolatori metabolici.

L'iniziale idea che la flora intestinale contribuisca alla estrazione di energia dalla dieta attraverso una maggiore produzione di SCFA è stata però messa in discussione da alcuni risultati. Per esempio, non è chiaro se la maggiore quantità di SCFA presenti nelle feci di animali o soggetti obesi contribuisca direttamente allo sviluppo della massa

grassa e all' aumento del peso corporeo (43,51,52). Infatti in contrasto con gli esperimenti fatti con dieta normale, i topi axenici nutriti con dieta occidentale, ricca di grassi, sono resistenti all'obesità indotta dalla dieta, mentre l'assunzione di energia ed il contenuto energetico nelle feci sono equivalenti tra topi axenici e i topi conventionalizzati. Inoltre, i risultati indicano che una dieta arricchita con specifici carboidrati non digeribili (prebiotici), porta ad una maggiore produzione intestinale di SCFA e riduce l'aumento di peso corporeo, la massa grassa e l'eventuale sviluppo e gravità del diabete (54-57).

Nell'uomo cambiamenti specifici nella composizione del microbiota intestinale mediante prebiotici, possono fortemente promuovere la produzione di SCFA (58). L'uso di prebiotici che aumentano la produzione di SCFA induce variazioni nel comportamento alimentare, legate alla modulazione della produzione e secrezione di peptidi intestinali (ad es., glucagone-like peptide-1 (GLP-1), peptide YY e grelina). Per esempio, in soggetti sani, la somministrazione di fruttani tipo inulina (da 18 a 20 g/die) aumenta la fermentazione da parte del microbiota intestinale (59), associata ad aumento dei livelli plasmatici di GLP-1 e di

peptide-YY. La fermentazione di prebiotici da parte della flora intestinale è stata correlata a diminuzione della fame e ad aumento del senso di sazietà (56,59). È importante sottolineare che, nei pazienti obesi, cambiamenti indotti da prebiotici sulla flora batterica intestinale, possono ridurre la grelina circolante ed aumentare il peptide-YY (60). Tuttavia, alcuni lavori riportano che una singola bassa dose di prebiotici (<8 g / die), non riesce ad influenzare l'appetito (61) e quindi influenzare i livelli di enteroormoni. Uno studio recente ha dimostrato che una singola dose di prebiotici (inulina) aumentava significativamente i livelli plasmatici postprandiali di GLP-1 e diminuiva i livelli plasmatici di grelina (62). Questa scoperta contraddice l'idea precedente che sia necessaria una persistente e prolungata modulazione del microbiota intestinale per sortire un effetto sulla funzione endocrina intestinale.

Per quanto riguarda i meccanismi coinvolti nella secrezione endogena di peptidi intestinali, è stato proposto che gli SCFA entrano in gioco in seguito alla fermentazione espletata dal microbiota. Per esempio, alcuni autori hanno proposto che l'acetato ha un ruolo in questa importante regolazione, in quanto hanno scoperto che la modulazione di SCFA

plasmatici è legata alle variazioni di peptidi intestinali coinvolti nella regolazione dell'appetito, ma anche alla diminuzione dei marker infiammatori nei soggetti insulino-resistenti (63).

La complessità della flora batterica intestinale è stata studiata per individuare eventuali specie specifiche in rapporto al differente stato di nutrizione. Tuttavia nonostante siano stati effettuati studi osservazionali in individui obesi (64) o anoressici (65), esistono risultati contrastanti. La somministrazione di inulina ad es. ha dimostrato di aumentare il *Faecobacterium prausnitzii* in volontari sani (66), e questi batteri hanno dimostrato a loro volta di ridurre l'infiammazione e il diabete in soggetti obesi (67). Invece, il genere *Lactobacillus* spp, appartenente al phylum Firmicutes, pare sia collegato all'obesità (65,68-72). Fino ad oggi, il dibattito rimane irrisolto, ma è probabile che alcune specie siano protettive contro l'obesità, mentre altre specie siano associate a un aumento di peso. Una analogia molto semplice potrebbe essere quella proposta con i ceppi commensali di *Escherichia coli*, che potrebbero essere considerati come potenziali patogeni, mentre un altro ceppo specifico, *E. coli*

Nissle 1917 è noto per avere un impatto positivo sulla infiammazione intestinale .

#### **1.4 Microbiota intestinale ed infiammazione**

L'estrazione di energia dalla dieta da parte del microbiota porta ad accumulo di grasso e a disordini metabolici , ma non è noto il meccanismo attraverso cui avviene l'interazione tra i batteri intestinali, le malattie metaboliche correlate all'obesità e l'insorgenza di infiammazione di basso grado. L'infiltrazione dei macrofagi negli organi (tessuto adiposo, muscoli e fegato) potrebbe promuovere la secrezione di fattori pro-infiammatori (73-76), tuttavia l'esatto ruolo di essi e la fonte e il tipo di fattori scatenanti che attivano il sistema immunitario rimangono oggetto di dibattito (77).

Alcuni fattori infiammatori (ad esempio, interleuchina-1(IL-1), fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ), proteina-1 chemiotattica monocitaria FMCP-11, ossido nitrico sintasi inducibile iNOS, interleuchina-6 (IL-6 ) sono legati allo sviluppo di insulino- resistenza, pertanto è fondamentale trovare i meccanismi attraverso i quali ciò si verifica.

Per esempio , la c-Jun N-terminal chinasi (JNK), il fattore di trascrizione nucleare KB (NF-KB) e la mitogeno-attivata

proteina chinasi (MAPK) controllano specifiche vie molecolari che giocano un ruolo cruciale nello sviluppo di infiammazione e insulino-resistenza.

La dieta ricca di grassi ha effetto pro-infiammatorio legato agli acidi grassi (per esempio dell'acido palmitico) che si ritiene possa innescare la risposta infiammatoria agendo tramite i recettori per il lipopolisaccaride (LPS), i Toll-like receptor-4 (TLR-4) presenti su adipociti e macrofagi, che contribuiscono alla infiammazione del tessuto adiposo nell'obesità (78,79). Tuttavia, il collegamento diretto tra acidi grassi e TLR4 è stato contestato (80), mentre sembra che il *primum movens* che lega la dieta all'infiammazione sia rappresentato dal lipopolisaccaride dei batteri gram negativi (81,82). Infatti un eccesso di grasso nella dieta non solo aumenta l'esposizione sistemica ad acidi grassi liberi pro-infiammatori ma facilita lo sviluppo di endotossemia metabolica per aumento dei livelli plasmatici di LPS (81). Il LPS può influenzare sia il metabolismo che il sistema immunitario, fornendo quindi la base all'ipotesi che il microbiota rappresenti una connessione funzionale tra vie metaboliche, immunità ed infiammazione (76).

Una serie di esperimenti ha dimostrato che i batteri intestinali possono avviare i processi infiammatori associati a obesità e resistenza all'insulina modulando i livelli plasmatici di LPS. Nel primo esperimento si mostra come una dieta ricca in grassi modifica in questi topi il microbiota intestinale, rispetto a topi nutriti con dieta normale. La dieta ricca di grassi aumenta i livelli plasmatici di LPS (endotossiemia metabolica) di due o tre volte, e induce marcata riduzione di *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* e *Eubacterium* rettale e *Clostridium* coccoides (81). Uno studio su topi privi del co-recettore CD14 del Toll-like (TLR receptor 4-4) ha mostrato che dopo quattro settimane di dieta ad alto tenore di grassi topi privi di co-recettore CD14, non mostrano aumento di peso né resistenza all'insulina, rispetto a topi normali, che invece mostrano il contrario (81). L'infusione cronica sottocutanea di LPS, che imita l'endotossiemia metabolica, induce infiammazione e resistenza insulinica e aumenta la massa sottocutanea e viscerale di circa il 30% e 40%, rispettivamente (81,83). Il ruolo del LPS del microbiota intestinale come fattore scatenante l'infiammazione di basso grado, il diabete di tipo 2 e la resistenza all'insulina è stato successivamente studiato in topi geneticamente obesi e

nutrizionalmente attraverso la modulazione specifica della composizione della flora intestinale utilizzando diete specifiche ed antibiotici (84). In primo luogo, la modifica della flora batterica intestinale con un trattamento antibiotico (polimixina B) protegge dallo sviluppo di massa grassa, dall'intolleranza al glucosio, dall'insulino-resistenza ed infiammazione, nonostante la somministrazione di una dieta ricca in grassi. Questa serie di studi suggerisce fortemente che una dieta ricca di grassi potrebbe non essere l'unica causa di obesità. Successivamente in topi obesi ob/ob ma privi del co-recettore CD14 per il LPS, tenuti a dieta ricca in grassi, si evidenzia protezione dall'obesità, dall'infiammazione e dalla resistenza insulinica. (84).

La relazione tra una dieta ricca di grassi, l'obesità, il diabete di tipo 2 e LPS è stata successivamente confermata nell'uomo. Negli ultimi anni numerosi studi hanno confermato il concetto di endotossemia metabolica indotta da dieta ricca di grassi negli esseri umani sani e obesi. In soggetti sani, un pasto ricco di grassi induce un'endotossemia metabolica con LPS che aumenta fino a concentrazioni sufficienti per indurre un certo grado di infiammazione (80,85). Inoltre, l'endotossemia metabolica

potrebbe essere il fattore correlato al microbiota coinvolto nello sviluppo del diabete di tipo 2 e l'obesità nell'uomo (86). Complessivamente, queste ricerche rafforzano il ruolo dell'assunzione dei grassi (e del loro assorbimento) nello sviluppo di endotossemia metabolica e di infiammazione (Fig.3).

E' stato dimostrato che l'endotossiemia metabolica aumenta i valori di TNF-alfa, di IL-6 e la resistenza all'insulina in volontari sani (87,88).

Variazioni nell'endotossiemia metabolica in obesi diabetici tipo 2 sono inversamente correlate con multipli parametri plasmatici (cioè, trigliceridi, colesterolo, glucosio e insulina) (89). Infine, la relazione tra una dieta ricca di grassi e endotossiemia metabolica è stata confermata in diversi studi indipendenti (90,91).

Sebbene molti dati supportino il ruolo di un meccanismo dipendente da LPS-TLR-4/CD14 nell'attivazione dell'infiammazione e dell'insulino resistenza, altri TLR potrebbero essere coinvolti. Recentemente, diversi studi indipendenti hanno indagano il ruolo dei TLR-2 (83,92). TLR-2 riconosce un gran numero di molecole contenenti lipidi incluso il lipopeptide batterico; l'espressione e

l'induzione di TLR-2 sono direttamente sotto il controllo di LPS, ma TLR-2 può anche essere indotto da TNF- $\alpha$  e CD14 (93). L'up-regolazione di TLR-2 in presenza di bassi, ma clinicamente rilevanti livelli di prodotti microbici, rappresenta un importante meccanismo mediante il quale il sistema immunitario aumenta la sua risposta alle infezioni recenti (ad esempio, LPS) (94). Pertanto, l'endotossiemia metabolica stimola l'attivazione del TLR-2, amplificando in tal modo la risposta infiammatoria stimolata da LPS/TLR-4/CD14. Inoltre, diversi studi hanno proposto che gli acidi grassi saturi possono promuovere infiammazione di basso grado ed insulino-resistenza attraverso un meccanismo TLR-4 dipendente (78,79).

Gli acidi grassi sono coinvolti nella stimolazione del sistema immunitario, ma probabilmente è il LPS, che inizia la stimolazione del complesso TLR-4/CD14 e successivamente stimola TLR-2. Diverse osservazioni supportano queste ipotesi:

- 1) la modifica della flora intestinale con antibiotici protegge i topi dall'obesità indotta dalla dieta e da disturbi metabolici, anche in presenza di recettori TLR-4/2 funzionanti (84);

2) topi knock-out per CD14 non sviluppano insulino-resistenza ed infiammazione, indotta da una dieta ricca in grassi, anche se i TLR-4 e TLR-2 recettori sono pienamente espressi (82). Tuttavia, va detto che CD14 è necessario per una funzionalità adeguata sia di TLR-2 che di TLR-4;

3) i topi axenici alimentati con una dieta ricca di grassi sono resistenti allo sviluppo di infiammazione e insulino-resistenza, anche se essi ingeriscono completamente e assorbono il grasso ingerito (47).

Nel loro insieme, questi esperimenti suggeriscono che una cascata di segnali attivati da un meccanismo LPS/TLR-4/CD14-dipendente, a sua volta attiva l'espressione di TLR-2 per attivare la risposta infiammatoria del sistema immunitario innato.

Recenti studi hanno ipotizzato che lo stato di infiammazione di basso grado presente nell'obesità possa essere influenzato dalla variazione del controllo sulla barriera intestinale, derivante dall'interazione tra microbiota ed ospite (95,96).

La endotossinemia metabolica può derivare da molteplici meccanismi, tra cui l'aumento della produzione di endotossine al variare del microbiota intestinale (82). In condizioni fisiologiche, l'epitelio intestinale agisce come una

barriera efficace e continua che impedisce la traslocazione batterica. Tuttavia, varie situazioni esogene e/o endogene sono associate ad alterazione della funzione protettiva. Tra i fattori riconosciuti specificamente che portano ad un'aumentata permeabilità intestinale (e quindi a promuovere endotossemia metabolica), vi sono lo stress da immobilizzazione (97), il consumo di alcol e le radiazioni. Inoltre, cambiamenti nella distribuzione e localizzazione della zonula Occludens 1 (ZO-1) e dell'Occludina (due proteine delle tight junctions) nel tessuto intestinale, sono associati ad aumentata permeabilità intestinale in roditori obesi e diabetici (84,95,96).

Vari meccanismi sembrano collegare i cambiamenti del microbioma intestinale nell'obesità con variazioni della funzione della barriera intestinale. L'utilizzo di prebiotici che modificano la flora batterica intestinale di topi geneticamente obesi è associata ad un miglioramento significativo della permeabilità intestinale misurata in vivo, per aumentata espressione di mRNA delle proteine delle giunzioni strette.

Una barriera intestinale migliore è stata correlata a ridotti livelli plasmatici portalici di LPS e a diminuzione di citochine epatiche e circolanti (98). Inoltre l'abbassamento

dell'infiammazione sistemica con prebiotici è correlato in modo significativo ad una riduzione marcata dello stress ossidativo ed infiammatorio nel tessuto epatico.

Questi dati hanno fortemente suggerito che la modulazione della flora intestinale nei topi obesi con prebiotici potrebbe agire favorevolmente a migliorare la barriera intestinale ma i meccanismi sono ancora da chiarire. Cambiamenti indotti nella flora intestinale da prebiotici, promuovono la sintesi di GLP-1 (mRNA proglucagone e GLP-1 peptide) nel colon prossimale attraverso un meccanismo legato alla differenziazione delle cellule precursori in cellule enteroendocrine ( 81). GLP-1 è prodotto e secreto dalle cellule L e la produzione endogena di GLP-1 aumenta in seguito a cambiamenti indotti nella flora intestinale da prebiotici, come anche la produzione di GLP2. Un antagonista del recettore di GLP-2 blocca completamente i benefici indotti dai prebiotici (riduzione della endotossemia metabolica, dell'infiammazione epatica e dei marcatori di stress ossidativo). Pertanto variazioni del microbiota, possono ridurre la permeabilità intestinale tramite un meccanismo GLP-2-dipendente.

Dal momento che i miglioramenti nella permeabilità intestinale avvengono nell'ileo e nel digiuno, mentre le variazioni del microbiota che inducono secrezione di GLP2 avvengono nel colon, è probabile che la produzione di GLP-2 possa agire attraverso un meccanismo autocrino o paracrino non solo sul colon ma anche sulla parte superiore dell'intestino come il digiuno (98). Inoltre, è stato precedentemente trovato che i prebiotici aumentano l'altezza dei villi, la profondità delle cripte ed aumentano lo spessore dello strato della mucosa del digiuno e del colon (99). Ancora, non si può escludere l'impatto dei prebiotici sulla comunità microbica che si trova nella prima parte dell'intestino, anche se questa ipotesi resta da confermare.

Il sistema degli endocannabinoidi (eBC) è un ulteriore meccanismo che interagisce con il microbiota intestinale nello sviluppo di obesità. Tale osservazione scaturisce dalle seguenti osservazioni:

- 1) la massiccia espansione del tessuto adiposo nell'obesità è caratterizzata da infiammazione di basso grado, eventualmente controllata dal microbiota intestinale (via LPS);

- 2) l'obesità è caratterizzata da una maggiore reattività del sistema eBC (vi è alterata espressione del recettore 1 per endocannabinoidi ed aumento nel plasma e nel tessuto adiposo dei livelli di eBC) (86,100);
- 3) il LPS stimola la sintesi di eBC (in vivo e in vitro) (101);
- 4) Il blocco del recettore CB-1 (geneticamente o farmacologicamente) protegge dall'obesità, dalla steatosi e dall' infiammazione di basso grado con meccanismi non ancora conosciuti (102).

Il recettore CB-1 controlla la funzione della barriera intestinale. Per esempio, bloccando il recettore CB1 nei topi obesi si riduce la permeabilità intestinale attraverso una migliore distribuzione e localizzazione della proteina di giunzione (ZO-1 e Occludina). L'attivazione di CB-1 aumenta la permeabilità intestinale in vivo e in vitro (96,102). CB-1 controlla la permeabilità intestinale attraverso l'interazione con il microbiota intestinale e nello stesso tempo tale interazione partecipa alla regolazione dell'adipogenesi (96).

La variazione della flora intestinale con prebiotici favorisce la normalizzazione della risposta del sistema eCB sia nell'intestino che nel tessuto adiposo. Questi effetti sono

fortemente associati ad una diminuzione della permeabilità intestinale, dell'endotossiemia metabolica e dello sviluppo di massa grassa.

Tuttavia, va notato che, anche se esistono forti correlazioni tra la composizione della flora intestinale ed elementi controllo della funzione della barriera intestinale (es., GLP-2 ed il sistema endocannabinoide), resta da chiarire il coinvolgimento diretto dei batteri intestinali specifici e/o dei metaboliti microbici.

### **1.5 Microbiota in differenti condizioni nutrizionali: obesità, anoressia, sindrome da intestino corto, chirurgia bariatrica .**

#### **Obesità**

L'obesità è una malattia cronica multifattoriale complessa.

Per classificarne la gravità, viene comunemente utilizzato l'Indice di Massa Corporea (IMC). Tale parametro si ottiene dividendo il peso in Kg per il quadrato dell'altezza espressa in metri. In relazione all'IMC, la WHO, distingue gli individui in: Sottopeso (BMI <18.5 kg/m<sup>2</sup>); Normopeso (18.5

< BMI < 24.9); Sovrappeso (25 < BMI < 29.9); Obesità di I grado o moderata (30 < BMI < 34.9); Obesità di II grado o severa (35 < BMI < 40); Obesità di III grado (BMI >40).

Attualmente in Europa il 17% degli abitanti è affetto da obesità (BMI >30 kg/m<sup>2</sup>)(104), mentre negli USA circa i due terzi della popolazione adulta è in sovrappeso, la metà è francamente obesa (105-6)

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha coniato il termine "Globesity" (global-obesity) per definire la diffusione su scala planetaria del problema. Anche in Italia (dati ISTAT 2002) la percentuale di persone in sovrappeso è elevata (35-40% della popolazione adulta) ed il 9% della popolazione risulta obesa.

L'accumulo eccessivo di grasso degli individui obesi è frutto della mancata omeostasi energetica dell'organismo, legata al difficile bilanciamento tra fattori ambientali, comportamentali, psicologici, genetici e neuroormonali ( 107). L'obesità, in una visione dinamica del problema, può essere considerata come la deviazione patologica dalla fisiologica evoluzione della massa grassa durante la vita (crescita, pubertà, menopausa, invecchiamento) (108). Sicuramente l'alimentazione e l'attività fisica rappresentano i principali fattori condizionanti il bilancio energetico, ma il tessuto adiposo non rappresenta un

sito passivo di accumulo di energia, potendo dialogare con cervello ed organi periferici attraverso numerosi segnali. Pertanto, i fattori ritenuti influenti sul problema obesità sono molteplici.

L'obesità genetica multifattoriale è il risultato dell'azione indipendente di numerosi singoli geni diversi; ma fattori genetici da soli non spiegano il significativo aumento di prevalenza dell'obesità. Le sindromi genetiche legate a patologie di un singolo gene associate ad obesità sono molto numerose ma poco frequenti (S. di Prader Willi, “Sindrome di Laurence-Moon-Bardet-Bied, etc.) .

I fattori ambientali e comportamentali che incidono sul determinismo del fenotipo obeso sono diversi ed agiscono direttamente oppure attraverso la modulazione dell'espressione dei diversi geni coinvolti nell'obesità (ad es. il grado di metilazione del DNA, che ne condiziona l'espressione, è influenzato da eventi epigenetici legati ai fattori ambientali attivi in età perinatale) (109 ). I fattori ambientali sono: fattori economici e sociali come la disponibilità di cibo e lo status sociale che varia tra i diversi contesti etnici, differenti segnali visivi ed olfattivi, abitudini alimentari e presenza di eventuali disordini del comportamento

alimentare, perdita di sonno, variazioni ormonali, presenza di inquinanti ambientali come derivati della diossina e bisfenili (110 ); questi ultimi agiscono come fattori perturbanti il sistema endocrino-metabolico e sono correlati anche ad un peggioramento dell'assetto lipidico ed epatico.

Negli ultimi anni inoltre ha assunto sempre maggiore importanza il microbiota intestinale per le sue interferenze con il metabolismo dell'individuo ospite (111). Numerosi autori hanno evidenziato differenze nella composizione del microbiota intestinale degli individui obesi rispetto ai magri. I tre "phyla" più rappresentati nella flora batterica intestinale sono i Bacteroidetes, i Firmicutes e gli Archaea. Alcuni autori hanno riferito una riduzione della proporzione dei Bacteroidetes negli obesi rispetto ai soggetti magri ed agli anoressici ( 112 ) per una riduzione della concentrazione assoluta dei Bacteroidetes negli obesi ( 113) . Dall'analisi del 16S-rRNA di 154 individui obesi è emersa una riduzione della variabilità delle specie presenti nella flora intestinale, con riduzione dei Bacteroidetes ed aumento invece dei Bifidobacteria del phylum Actinobacteria ( 114 ) In questo studio, molti geni appartenenti ai Bifidobacteria, che correlano positivamente con l'obesità, sono coinvolti nel

metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e degli aminoacidi confermando l'ipotesi di un diretto coinvolgimento del microbiota nel metabolismo dell'ospite. Tali dati non trovano conferma in un lavoro in cui, al contrario, i Bacteroidetes risultano aumentati negli obesi e nei soggetti in sovrappeso, mentre i Ruminococchi dei Firmicutes risultano ridotti (115). Il sequenziamento del 16SrDNA in obesi gravi, controlli normopeso e pazienti operati di by-pass gastrico, ha mostrato negli obesi, un aumento delle Prevotellacee, sottogruppo dei Bacteroidetes, ed un aumento delle Coriobacteriaceae del phylum degli Actinobacteria (116). Tuttavia altri lavori basati su identificazione tramite coltura, mettono in evidenza negli obesi, rispetto ad individui normopeso, la riduzione dei Bacteroidetes e dei Clostridium p. dei Firmicutes, ed un aumento degli Enterococchi dei Firmicutes stessi (117 ). Il monitoraggio dei due principali phyla di batteri della flora intestinale, Bacteroidetes e Firmicutes in obesi tenuti a dieta ipocalorica, evidenzia una bassa concentrazione di Bacteroidetes, che aumentano progressivamente mano a mano che il paziente perde peso, indipendentemente dall'introito energetico; viceversa i Firmicutes, che risultano in proporzione aumentati, si riducono quando il paziente viene

messo a regime dietetico dimagrante (118). Altri studi sulla variazione del microbiota in seguito a trattamento dietetico ed esercizio fisico, eseguiti con la tecnica “Fluorescent in situ hybridization” (FISH), mostrano un aumento nella proporzione di Bacteroidetes e Prevotellae coccoides ed una riduzione di Firmicutes del genere *Clostridium histolyticum*, *Eubacterium rectale* e *Clostridium coccoides*; tale riduzione correla con il maggiore calo ponderale (119). Tale risultato è stato confermato nella stessa popolazione anche con analisi quantitative con PCR (Polimerase Chain Reaction); inoltre, in seguito al dimagrimento, risulta una riduzione dei Bifidobacteria degli Actinobacteria (120). Altri studi, viceversa, non hanno trovato correlazione tra la proporzione di Bacteroidetes e l’obesità o il tipo di dieta.

Nel tentativo di comprendere se la composizione del microbiota dell’infanzia possa determinare aumento di peso nella crescita, Kalliomaki ha monitorato il peso, l’altezza ed il microbiota in differenti mesi di vita e a 7 anni. I bambini divenuti obesi a 7 anni non hanno presentato riduzione nella concentrazione di Bacteroidetes rispetto ai coetanei normopeso (121). Il calo ponderale in bambini precedentemente obesi non determina differenze nella quantità

di Bacteroidetes, rispetto ai bambini normopeso, ma mostra una diminuzione di Roseburia rectale, un genere produttore di butirrato appartenente ai Firmicutes (122). Da tutto ciò si evince che non vi sono evidenze conclusive che associno l'obesità ad uno specifico tipo di microbiota ma, negli individui obesi non vi sono differenze quantitative nel Phylum dei Bacteroidetes, mentre si assiste ad un aumento del numero assoluto dei Firmicutes. Studi recenti hanno evidenziato un aumento dei Lactobacilli negli obesi rispetto ai soggetti magri e agli anoressici (112) e in pazienti obesi affetti da diabete tipo 2 (107). I Lattobacilli risultano ridotti in un gruppo di adolescenti obesi in seguito a calo ponderale successivo ad una dieta restrittiva (123). Million in un recentissimo studio (2012) ha dimostrato l'associazione tra il Lactobacillus Reuterii e l'obesità (113). Invece studi sugli Actinobacteria mostrano una riduzione significativa dei Bifidobacteria nel microbiota dei soggetti obesi e tale alterazione, per la quale vi è consenso in tutti gli studi, sembra quella maggiormente implicata sia nell'obesità che in una eventuale terapia anti-obesità.

Gli Archaea metanogenici, a cui appartiene il Methanobrevibacter Smithii, sembrano legati all'obesità in

quanto capaci di aumentare l'efficienza della fermentazione, rimuovendo l'idrogeno dall'intestino. Vi sono studi contrastanti, nei quali il *Methanobrevibacter Smithii* risulta aumentato negli obesi rispetto ai soggetti magri (116 ) oppure ridotto (112,113,115). Sembra però confermata la tesi secondo cui il *Methanobrevibacter Smithii* è correlato al microbiota dei soggetti magri ma, in relazione alla sua capacità di aumentare l'intake calorico promuovendo la fermentazione, esso può essere promotore di aumento di peso in soggetti che assumono una dieta particolarmente ricca in fibre.

### **Anoressia nervosa**

L'anoressia nervosa (AN) è una grave e complessa malattia da disturbo della condotta alimentare che di solito inizia nell'adolescenza ed è caratterizzata da un'alimentazione che ha l'intento di mantenere basso il peso (124 ). Secondo il Manuale di Statistica e Diagnosi dei Disturbi Mentali (DSM-IV) i criteri diagnostici per AN sono il rifiuto di mantenere il peso corporeo al di sopra del minimo ideale in rapporto a età e altezza (peso corporeo inferiore all'85 % di quello atteso) e la presenza dei seguenti sintomi: alterata percezione del peso

e della propria immagine corporea, costante paura di diventare grassi e amenorrea nelle femmine postpubere (125). L'anorexia nervosa presenta due varianti: restrittiva (AN-R) e bulimica (che comprende meccanismi di compensazione come l'uso di lassativi, diuretici o vomito) (AN-BP) (125). Il tipo restrittivo è caratterizzato da un apporto calorico molto basso, associato ad esercizio muscolare compulsivo. Il tipo bulimico si verifica in pazienti anoressici che soffrono di episodi di perdita di controllo con abbuffate soggettive, perché in realtà la quantità di cibo ingerita è molto piccola. L'anorexia presenta complicanze croniche legate alla malnutrizione, fino alla cachessia ed è spesso accompagnata da disturbi psichiatrici come depressione, disturbi d'ansia e disturbo ossessivo-compulsivo (12). Altre complicazioni includono la compromissione della funzione mestruale, bradicardia, ipotensione ortostatica, basso livello di potassio plasmatico e perdita di capelli. La perdita di peso si verifica, almeno inizialmente, soprattutto a livello del tessuto adiposo e vi è una significativa riduzione del metabolismo energetico. Le anomalie metaboliche dei pazienti anoressici non sono chiare. Gli studi sulla sensibilità all'insulina nei pazienti anoressici hanno dato risultati contrastanti. Il metabolismo del

glucosio insulino-mediato è risultato normale ( 126), aumentato ( 127) o diminuito ( 128). Sicuramente gli anoressici mostrano normale “flessibilità metabolica”, cioè una buona capacità da parte dei muscoli di passare dall’utilizzo dei lipidi all’utilizzo insulino-mediato del glucosio, cosa che indica una buona sensibilità all’insulina (126). Sono state studiate numerose sostanze tra cui alcuni enterormoni ed adipocitokine per chiarire la patogenesi dell’AN, ma nessuno di questi fattori riesce a spiegare chiaramente il comportamento anoressico e la duratura perdita di peso in questi pazienti. Recentemente l’anoressia è stata associata anche ad aumentato rischio cardiovascolare, probabilmente dovuto ad aumento del colesterolo plasmatico e soprattutto della quota di colesterolo LDL, a causa della mobilizzazione di questo dai depositi a scopo energetico. L’aumento di LDL plasmatiche si associa inoltre a riduzione degli ormoni tiroidei e di estrogeni (E2) (129).

Nei pazienti affetti da anoressia si assiste a modifica dei livelli di adipocitochine circolanti, degli ormoni intestinali e dei fattori di crescita, che potrebbero dipendere dal tipo e dalla durata della malattia e dal grado di malnutrizione.

Lo studio della flora batterica intestinale, basato sul confronto tra microbiota di magri e di obesi, ha ipotizzato differenze anche nella flora degli anoressici. In particolare è da citare uno studio di Armougom (2009), che ha esaminato campioni di feci di soggetti obesi, normopeso ed anoressici attraverso l'analisi genetica quantitativa con PCR. I Firmicutes erano quantitativamente simili nei tre gruppi; i Bacteroidetes erano aumentati negli obesi rispetto ai magri e agli anoressici; i Lactobacilli erano significativamente aumentati negli obesi rispetto ai magri e agli anoressici, mentre i Methanobrevibacter Smithii, appartenenti agli Archaea risultavano più numerosi negli anoressici rispetto ai due altri gruppi, ma era significativa la differenza con i magri. La differenza significativa con i magri può essere spiegata dal tentativo negli anoressici di mantenere un bilancio energetico positivo, producendo calorie extra con la fermentazione, dato l'introito di calorie dalla dieta estremamente scarso.

Gli Archaea metanogenici sono importanti in quanto rimuovono l' $H_2$  in eccesso prodotto nell'intestino dalla fermentazione, favorendo quindi la produzione di energia da parte di quest'ultima (130). I Methanobrevibacter sono stati

ritrovati aumentati in soggetti obesi dimagriti in seguito a by-pass gastrico (131).

### **Sindrome da intestino corto**

La sindrome da intestino corto (SIC) è una condizione di malassorbimento successiva ad un'ampia resezione intestinale. I fattori prognostici includono l'età, la lunghezza dell'intestino residuo, la presenza o assenza della valvola ileocecale, ecc.. In particolare la valvola ileocecale impedisce il reflusso dei batteri dal colon al piccolo intestino e regola il passaggio di sostanze nutritive al colon. Quest'ultima funzione ha il ruolo di prolungare il tempo di transito intestinale: aumentando il tempo di contatto tra mucosa e nutrienti, si massimizza l'assorbimento di sostanze nutritive, fluidi ed elettroliti (132).

Nella normale fisiologia e anatomia, la proliferazione batterica nell'intestino tenue è controllata dall'acidità gastrica, dalla normale attività anterograda peristaltica nel piccolo intestino e dalla valvola ileocecale nell'ileo distale. Quando uno o più di questi meccanismi è compromesso nei pazienti con SIC, per esempio in seguito a rimozione della valvola ileocecale, i batteri dal colon ripassano nell'intestino tenue e ciò, in

combinazione con la ridotta motilità dell'intestino tenue, può portare all'eccessiva crescita batterica (133). La deconiugazione degli acidi biliari da parte dei batteri del colon porta ad infiammazione e danno della superficie assorbitiva con conseguente malassorbimento, squilibrio elettrolitico e perdita di proteine.

La diagnosi di iperproliferazione batterica può essere effettuata tramite il breath test, dimostrando un picco precoce della concentrazione di idrogeno espirato dopo la somministrazione di un carico orale di glucosio.

Il controllo della proliferazione batterica ha un ruolo chiave nella gestione dei pazienti con SIC. E' spesso necessario un trattamento con antibiotici ad ampio spettro, che dovrebbero essere ruotati ogni 1-2 mesi per evitare lo sviluppo di organismi resistenti (134).

L'utilità dei probiotici nel trattamento della proliferazione batterica è attualmente in corso di valutazione, ma la loro efficacia non è ancora stata ben stabilita.

## **Chirurgia bariatrica**

La Sleeve gastrectomy o gastrectomia laparoscopica a manica (SG) è una procedura chirurgica efficace per il trattamento dell'obesità grave e viene eseguita con sempre maggiore frequenza, sia in Europa che negli Stati Uniti, oltre al bendaggio gastrico regolabile laparoscopico (LAGB), al bypass gastrico Roux-en-Y (LRYGBP), e la diversione bilio-pancreatica con switch duodenale (BPD-DS). La SG (Fig.5) è un intervento puramente restrittivo, nato per pazienti obesi ad alto rischio (135-6 ). La perdita di peso dopo SG va dal 35% al 72% del peso iniziale (137-140). La risoluzione di comorbidità come il diabete, l'iperlipidemia, l'ipertensione e l'apnea notturna a 12-24 mesi dopo SG è percentualmente almeno simile a quella delle altre procedure restrittive, con complicanze inferiori rispetto al By-pass e alla diversione B.P.(141). Diversi studi riferiscono percentuali di complicanze che variano da 0% a 24% con un grado di mortalità globale dello 0,39% . La SG presenta molteplici vantaggi rispetto ad altre procedure bariatriche come la mancanza di un corpo estraneo, la conservazione del piloro, l'assenza di dumping syndrome. Il vantaggio più importante del procedimento è la possibilità di essere eseguita in pazienti Super-Super obesi

(BMI > 60 kg/m<sup>2</sup>), nel tentativo, riducendo il peso, di affrontare la chirurgia malassorbitiva con un minor rischio chirurgico. Inoltre, tale intervento può essere utilizzato in pazienti nei quali è controindicato il bypass gastrico, come quelli con storia di ulcera, anemia cronica o insufficienza renale.

Scopo della SG è la riduzione del volume gastrico al 10% del volume medio dello stomaco e l'aumento della pressione intragastrica, così da attivare i recettori di stiramento ed i meccanoceettori che trasmettono segnali di sazietà al sistema nervoso centrale (SNC). Più piccolo è il tubo gastrico, più velocemente si raggiungerà la capacità massima di volume, con conseguente diminuzione dell'appetito del paziente. Normalmente, durante l'ingestione di alimenti si ha rilasciamento attivo del fondo gastrico, con aumento di volume, senza aumento della pressione intragastrica (141), anche perché il fondo si espande di più del restante stomaco perché ha solo due strati di muscolo, consentendo così allo stomaco di ospitare grandi volumi. La SG non solo riduce la capacità gastrica totale, ma agisce anche sulla distensibilità, determinando un'elevata pressione intraluminale e di conseguenza la sensazione precoce di sazietà.

## **Chirurgia bariatrica e microbiota**

Gli interventi di chirurgia bariatrica, modificando l'anatomia e la fisiologia del tratto gastroenterico, modificano la flora batterica intestinale. Variazioni del microbiota interagiscono con il metabolismo del paziente operato, influenzandone il dimagrimento. Il primo studio condotto in tre adulti dopo by-pass gastrico ha mostrato una significativa diminuzione dei Firmicutes, con aumento dei Gamma – proteo batteri (116). Uno studio su 30 soggetti con obesità patologica, seguiti per 6 mesi dopo by-pass gastrico ha mostrato: rapido aumento del rapporto Bacteroidetes/Prevotellae dopo il by-pass (rapporto ridotto nell'obesità preoperatoria); inoltre una diretta correlazione tra la quantità di Faecalibacterium Prauznii e gli indici infiammatori (117). Ciò è in accordo con gli studi che mostrano una percentuale più bassa di Bacteroidetes nei soggetti obesi rispetto ai magri (143). Studi di correlazione che utilizzano modelli statistici, dimostrano che vi è una forte associazione tra specie batteriche, parametri metabolici e composizione corporea. Dopo la perdita di peso, maggiore è la riduzione della massa grassa e dei livelli circolanti di leptina, più aumenta la proporzione Bacteroides / Prevotellae nelle

feci. Al contrario, la presenza di *F. prausnitzii* è più bassa nei soggetti con diabete ed è inversamente associata ai marcatori infiammatori, prima e durante il follow-up dell'intervento chirurgico, indipendentemente dalle variazioni della dieta. *F. prausnitzii* mostra effetti anti-infiammatori, perché produce metaboliti in grado di bloccare l'attivazione di *fN-kB* e la secrezione di mediatori proinfiammatori (143).

## **1.6 Enterormoni ed Adipocitochine in differenti condizioni nutrizionali**

### **Leptina**

La scoperta della leptina, (un peptide di 167 aminoacidi con una struttura elicoidale simile a quella delle citochine) nel 1994, è stata determinante nella comprensione della regolazione dell'assunzione del cibo, del dispendio energetico, della modulazione del metabolismo del glucosio e dei grassi, nonché di altri processi come la funzione immunitaria, riproduttiva etc. (131). La leptina è secreta principalmente dagli adipociti ma può anche essere trovata in altri tessuti, come la placenta, i testicoli, le ovaie, l'ipotalamo, l'ipofisi ed altri organi (130). La sua secrezione segue un ritmo circadiano essendo massima tra mezzanotte e la mattina e

minima nel primo pomeriggio. Vi è una differenza tra i due sessi, secernendo le donne più leptina degli uomini a parità di età e di BMI (130). Essa si lega a specifici recettori situati nel sistema nervoso centrale ed in altri tessuti. I recettori della leptina , sei isoforme, sono localizzati in tutto il corpo, suggerendo che la leptina potrebbe svolgere un ruolo nella regolazione di diversi processi. Il ruolo primario della leptina è di fornire al sistema nervoso centrale informazioni sullo stato energetico dell'organismo, aiutando così a controllare l'appetito e l'assunzione di cibo, al fine di mantenere un peso stabile. La leptina influenza l'appetito attraverso l'inibizione delle vie orexigene, mediate dai neuroni che esprimono l'antagonista della melanocortina, il peptide Agouti-relatede (AGRP) e il neuro-peptide Y (NPY). I recettori periferici della leptina partecipano alla regolazione del bilancio energetico, influenzando il metabolismo e promuovendo l'ossidazione dei grassi nel muscolo scheletrico ( 131). La leptina previene anche l'accumulo di lipidi nel tessuto adiposo (144). La terapia sostitutiva con leptina in pazienti con deficit congenito di leptina e pazienti con lipodistrofia ha notevolmente migliorato la loro sensibilità all'insulina e ha ridotto la steatosi epatica (145). Il digiuno determina

riduzione dei livelli di leptina, prima ancora che vi sia stato calo ponderale (144), in modo da innescare un meccanismo adattativo che preservi l'energia corporea. Il digiuno determina anche riduzione della secrezione degli ormoni sessuali (per impedire la riproduzione); riduzione degli ormoni tiroidei (per ridurre il consumo metabolico); aumento dell'ormone della crescita GH (per mobilizzare le riserve di energia); diminuzione dell'IGF1 (per rallentare la domanda energetica relativa ai processi di crescita) ed aumenta l' ACTH.

Riguardo gli effetti sulla riproduzione in topi ob / ob, il trattamento cronico con leptina ripristina la pubertà e la fertilità ( 144). Probabilmente la leptina agisce come segnale di innesco della pubertà, collegando così l'adiposità con la funzione riproduttiva (145). Inoltre, nell'uomo il deficit di leptina è associato ad ipogonadismo ipogonadotropo e a pubertà ritardata, che si risolvono dopo trattamento con leptina (146). Studi condotti nei topi con deficit di leptina (145) e in esseri umani (146), mostrano che un basso livello di leptina influenza l'asse gonadico, gli ormoni tiroidei influenzando la secrezione di TRH, e di TSH che ha lo stesso ritmo circadiano della leptina , e le concentrazioni di ormone

della crescita. La privazione di cibo induce abbassamento dei livelli di leptina , con conseguente alterazione dell'asse (147). Nel ratto, la leptina aumenta il GHRH, inducendo un aumento di GH. Nell'uomo invece l'effetto della leptina sulla crescita si esercita non direttamente sul GH, ma modulando l'azione del GH nel regolare la secrezione di IGF1 (147) .

### **Leptina e obesità**

Sin dalla sua scoperta, numerosi studi hanno cercato di correlare la leptina all'insorgenza di obesità. Il livello di leptina è correlato all'intera massa grassa corporea (148), che induce un aumento di leptina che, a sua volta va a ridurre l'introito di nutrienti, arginando così l'aumento di peso. Infatti, la leptina plasmatica attraversa la barriera ematoencefalica ed esercita la sua azione sull'ipotalamo, inibendo l'NPY e attivando i neuroni POMC del nucleo arcuato con effetto anoressizzante. Tuttavia l'aumentato livello di leptina non previene l'obesità, e si ipotizza che quest'ultima sia causata non dalla carenza di leptina ma dalla resistenza ad essa (149). Recentemente lo stress del reticolo endoplasmico è stato ipotizzato come meccanismo di resistenza alla leptina sia negli animali che nell'uomo obesi. Inoltre l'induzione di stress del reticolo endoplasmico attraverso la somministrazione

intraventricolare cerebrale di taspigargina ha indotto aumento della fame e del peso (150).

### **Leptina e chirurgia bariatrica**

Partendo dal presupposto che nell'individuo obeso la leptina risulta aumentata, numerosi studi hanno valutato il livello di leptina in seguito a By-pass gastrico. Mentre il livello di leptina degli obesi pre By-pass gastrico è molto elevato, se comparato con quello di individui magri (151) tale livello si riduce notevolmente dopo By-pass gastrico (152) . Tuttavia in uno studio in cui si compara il calo ponderale raggiunto con la dieta e l'esercizio fisico e quello successivo a Bypass gastrico, il dosaggio della leptina è sostanzialmente identico, indicando che le procedure chirurgiche non sembrano di per sé influire sulla concentrazione di leptina (153)

### **Leptina nell'anoressia**

In pazienti anoressici (AN) rispetto a controlli normopeso, è stata riscontrata una concentrazione plasmatica notevolmente ridotta di leptina (154). Nella maggior parte degli studi la concentrazione plasmatica di leptina correla positivamente con

la quantità di tessuto adiposo; il basso livello di leptina plasmatica degli anoressici riflette la scarsità di tessuto adiposo. Questo è in accordo con l'ipotesi che la leptina è fisiologicamente più importante come sensore di mancanza di energia piuttosto che di eccesso di energia (causando così una risposta adattativa attraverso la diminuzione del dispendio energetico e/o la soppressione dell'azione riproduttiva). È stata inoltre studiata la concentrazione plasmatica del recettore solubile della leptina (s0B-R) (155). Il s0tB-R è il principale sito di legame della leptina e il rapporto tra leptina sierica e s0B-R fornisce la misura dell'indice di leptina libera (FLI), che si ritiene sia una misura più accurata dell'azione della leptina (156). Misra et al. hanno riportato una concentrazione plasmatica marcatamente ridotta di leptina con elevata concentrazione plasmatica di s0B-R e inferiore FLI in soggetti anoressici, rispetto ad adolescenti sani (155). Ciò può suggerire che un'alta concentrazione di s0B-R nell'anoressia, può riflettere l'up-regolazione di s0B-R per sopprimere l'azione della leptina in un momento di carenza energetica. La concentrazione plasmatica di leptina e FLI correla positivamente con le misure di insulino-resistenza valutate con il metodo indiretto HOMA-IR. In alcuni studi, però non

confermati, vi è una correlazione negativa tra livello plasmatico di s0B-R e l'indice HOMA-IR (155). Il recupero di peso nei pazienti anoressici correla con la diminuzione nel plasma di s0B-R, con concomitante aumento del livello plasmatico totale di leptina, ma non con FLI (155). Nelle pazienti anoressiche vi è un graduale aumento della concentrazione plasmatica di leptina durante la rialimentazione (157). Hass ha valutato la concentrazione di leptina plasmatica nei pazienti anoressici al tempo 0 e dopo 43 giorni e 84 giorni di follow-up ed ha osservato un graduale aumento di peso con un significativo aumento della concentrazione plasmatica di leptina durante le 12 settimane di osservazione. Tuttavia i soggetti anoressici con un aumento maggiore di leptina il giorno 43, hanno mostrato un aumento di peso nettamente inferiore tra il giorno 43 e 84 di follow-up (155). Questa correlazione inversa tra variazione dei livelli di leptina plasmatica nelle prime 6 settimane del periodo di recupero e l'aumento di peso successivo, potrebbe spiegarsi con l'effetto inibitorio di alti livelli di leptina sull'assunzione di cibo. In uno studio su 19 anoressiche, il rapporto leptina/massa grassa, risulta più elevato nelle pazienti di recente diagnosi non ancora trattate rispetto a controlli sani e a pazienti che

hanno già recuperato il 10 % del peso iniziale (158). Nonostante la misurazione della composizione corporea ed in particolare della massa grassa nelle pazienti anoressiche non sia del tutto affidabile, gli autori suppongono che vi sia in tali pazienti un' aumentata produzione di leptina per unità di massa grassa o una ridotta clearance della stessa. Rispetto a soggetti magri costituzionali, la leptina plasmatica totale ed il PYY sono stati trovati più bassi, e ciò può correlare con la risposta adattativa oressigena della regolazione dell'appetito .

### **Grelina**

La grelina è un peptide di 28 aminoacidi che è il ligando endogeno del recettore 1a secretagogo dell'ormone della crescita ( GHS-R 1a ). Viene prodotta principalmente dal fondo dello stomaco, ma anche da piccole aree del Sistema Nervoso Centrale e di altri organi ( 159). La grelina plasmatica è presente in una quota acilata (che possiede un residuo di serina essenziale per la sua azione biologica) ed una non- acilata. La grelina acilata stimola il rilascio di GH, ma il principale ruolo fisiologico sembra essere il controllo dell'appetito e l'omeostasi energetica (159). La grelina è un

enterormone oressigeno, il cui effetto è mediato dall'attivazione dei neuroni NPY e AGRP del nucleo arcuato dell'ipotalamo e dei neuroni produttori di oressina nelle aree laterali dell'ipotalamo (159). La grelina non- acilata potrebbe avere ruoli biologici differenti, ma alcuni studi riportano che essa stimola l'appetito (160). I livelli circolanti di grelina diminuiscono dopo il pasto ed aumentano prima di mangiare; il picco plasmatico della grelina prima del pasto suggerisce un suo ruolo a breve termine nel determinare l'inizio dell'alimentazione, anche se essa è coinvolta anche nella regolazione del peso corporeo (161). La sua concentrazione dipende dall'energia accumulata nell'organismo e dai cambi compensatori in risposta ad alterazioni del peso, in quanto la grelina è bassa negli obesi e alta nei magri (162). Il livello di grelina è inversamente correlato al peso ed aumenta man mano che cala il peso corporeo mentre è basso nell'obesità; pertanto il livello di grelina sembra l'effetto e non la causa sia di obesità che di anoressia (163).

### **Grelina e Obesità**

I livelli di grelina sono diminuiti nell'obesità umana (164), e ciò potrebbe rappresentare una risposta compensatoria al fine

di mantenere positivo il bilancio energetico (165). Tra gli obesi adulti le concentrazioni plasmatiche di grelina sono più basse nei soggetti con maggiore insulino-resistenza rispetto ad individui altrettanto obesi ma con preservata sensibilità all'insulina (166). In uno studio effettuato con il clamp iperinsulinemico-euglicemico, nei soggetti obesi la concentrazione di grelina plasmatica è inversamente proporzionale alla resistenza all'insulina (167). I soggetti obesi sembrano essere più sensibili agli effetti stimolanti della grelina esogena rispetto a soggetti di peso normale e l'inibizione della grelina circolante potrebbe essere un utile approccio terapeutico nel trattamento dell'obesità (168). Tuttavia, l'effetto della somministrazione di grelina sui livelli di glucosio e di insulina non è diretto e dose  $\neg$  dipendente e il suo meccanismo è tuttora non del tutto chiaro (169).

Nei soggetti obesi Moran (170) ha dimostrato mancata soppressione della grelina postprandiale, mentre Marzullo (164) ha trovato invece livelli normali o poco al di sotto della norma, ma comunque la risposta della grelina postprandiale in soggetti obesi è, al contrario che nei soggetti sani, indipendente dalla composizione in macronutrienti e calorie del pasto. La ridotta risposta della grelina al pasto può

pertanto contribuire alla resistenza alla perdita di peso in alcuni pazienti obesi ( 171).

Sembra che sia necessaria una perdita di peso superiore al 5 % per avere una normale soppressione della grelina post-prandiale. La perdita di peso indotta in donne obese dalla dieta migliora preferenzialmente la risposta plasmatica della grelina ad un pasto con carboidrati (172), suggerendo un probabile ruolo al miglioramento della sensibilità all'insulina. Nel complesso, i cambiamenti nei livelli di grelina potrebbero segnalare all'ipotalamo l'entità della massa magra e della massa grassa così da controllare l'omeostasi energetica (173).

### **Grelina in chirurgia bariatrica**

Mentre i livelli basali di grelina aumentano in seguito a perdita di peso indotta dalla dieta, (172), la perdita di peso indotta chirurgicamente (bypass gastrico ad esempio) diminuisce i livelli di grelina (174). E 'stato suggerito che la riduzione dei livelli di grelina dopo la chirurgia dell'obesità può essere coinvolta nei meccanismi che inducono il più duraturo mantenimento del calo ponderale rispetto al calo di peso raggiunto con un regime alimentare dietetico.

Le diverse procedure chirurgiche non sono egualmente efficaci nel sopprimere la grelina e nel modificare la secrezione di altri enterormoni, in quanto esse determinano differenti variazioni dell'anatomia gastrointestinale. La Sleeve Gastrectomy, attraverso la tubulizzazione dello stomaco, senza alterare la superficie assorbitiva e senza bypassare il piccolo intestino, agisce come intervento puramente restrittivo. Pertanto l'eliminazione del fondo e la restrizione del corpo gastrico, che sono i luoghi di principale produzione della grelina, inducono una marcata riduzione della grelina e del suo effetto oressizzante. Il bypass gastrico con ansa alla Roux, viene considerato intervento misto restrittivo- malassorbitivo, in quanto lo stomaco viene ridotto ad una tasca di circa 20cc che viene suturata al digiuno, in un punto situato 50 cm distalmente al Treitz, eliminando dal transito del chimo sia il duodeno che la prima parte del digiuno. Il by-pass gastrico alla Roux-en-Y (RYGBP) sopprime marcatamente i livelli di grelina a digiuno nei pazienti con obesità patologica. E' stata descritta una riduzione della grelina a 6 settimane dopo RYGBP (174), mentre la perdita di peso prolungata, 9-31 mesi dopo RYGBP è associata ad un'ulteriore riduzione significativa della grelina circolante nei pazienti obesi (159).

La diminuzione paradossale della grelina a digiuno dopo l'intervento chirurgico RYGBP si verifica non solo nei pazienti con grandi perdite di peso (161), ma anche nei pazienti con perdita di peso paragonabile a quella ottenuta con la sola dieta (174). Questi risultati sollevano la possibilità che il by-pass gastrico riduca il peso almeno in parte sopprimendo la grelina ed i suoi effetti appetito  $\neg$  stimolanti.

Invece ad un anno dal bendaggio gastrico laparoscopico si assiste ad un lieve ma significativo aumento dei livelli plasmatici di grelina (175). Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che la soppressione della grelina è uno dei meccanismi che spiegano perché il bypass gastrico può ridurre il peso corporeo più efficacemente del bendaggio gastrico. È stato suggerito che l'assenza permanente di cibo nello stomaco vuoto mandi un segnale continuo di stimolo, che alla fine sopprime la produzione di grelina attraverso un processo di inibizione overriding (da iperstimolazione) (165). La modifica del controllo vagale del fondo e dell'antro gastrico dovuta al bypass gastrico potrebbe essere coinvolta nella riduzione paradossa della grelina .

La Sleeve Gastrectomy sopprime notevolmente i livelli di grelina, probabilmente a causa della resezione del fondo

gastrico, che è il più importante sito di produzione di grelina nell'uomo (176). La riduzione dei livelli di grelina dopo sleeve-gastrectomy a 6 mesi dall'intervento chirurgico, può spiegare la perdita di peso superiore rispetto al bendaggio gastrico (176) In un recente studio, basato su precedenti lavori (177), viene valutata la grelina a digiuno e dopo il pasto in pazienti sottoposti a bypass gastrico o a sleeve gastrectomy, comparando la grelina pre- operatoria, a 3 e a 12 mesi dall'intervento. sia a digiuno che dopo il pasto ( a 10 e a 60 minuti ) (178).La grelina fisiologicamente aumenta subito prima del pasto e diminuisce nel periodo post-prandiale ( 179). Negli obesi , bassi livelli di grelina possono contribuire allo scarso controllo glicemico( 180) Gli autori hanno riscontrato che nel bypass gastrico vi sono bassi livelli di grelina dopo il pasto, che sopprimono l'appetito, diversamente da come avviene in caso di calo per la dieta, nel qual caso la grelina aumenta (la riduzione della grelina promuove la secrezione insulinica). Nella sleeve- gastrectomy, la grelina post-prandiale non varia, rimanendo significativamente più bassa rispetto al by-pass, forse a causa della resezione del fondo gastrico.

## **Grelina nell'anoressia**

Nei pazienti anoressici la grelina risulta elevata. Tuttavia visto che nonostante i valori elevati l'effetto oreogigeno nelle anoressiche viene a mancare, ciò può riflettere una ridotta sensibilità alla grelina come stimolante dell'appetito. È stato visto però che la somministrazione di grelina esogena in anoressiche ha un discreto effetto stimolante sull'appetito(181). Pertanto elevati livelli di grelina fungono da meccanismo compensatorio nel tentativo di aumentare la fame e spingere in positivo il metabolismo energetico in tali pazienti (182).

Koya ha riportato che la concentrazione di grelina non acilata nei pazienti AN è superiore rispetto ai controlli e diminuisce durante la rialimentazione (183). I ricercatori hanno anche osservato che il rapporto tra la grelina acilata e la grelina totale aumenta dopo 8 settimane di trattamento.

Fattori nutrizionali sembrano giocare un ruolo importante nel modulare la secrezione di grelina. Il livello di grelina totale a digiuno diminuisce in seguito all'assunzione del pasto, o per assunzione di glucosio per via orale o endovenosa, ma non attraverso la distensione gastrica con acqua (184). La soppressione della grelina postprandiale potrebbe influenzare

la percezione di sazietà ed avere un impatto sul comportamento alimentare. L'insulina potrebbe mediare l'effetto della nutrizione sulla regolazione post-prandiale delle concentrazioni plasmatiche di grelina (184).

Alcuni ricercatori hanno osservato una diminuzione delle concentrazioni plasmatiche di grelina totale dopo un pasto ad alto contenuto di carboidrati a prima colazione (185) , mentre nelle AN vi è una riduzione del calo successivo al pasto, suggerendo che in tale patologia vi è una alterazione del senso di fame.(186).

Uno studio recente effettuato utilizzando il clamp euglicemico iperinsulinemico in obesi, magri e anoressici, ha mostrato una maggiore soppressione della grelina sierica negli anoressici e nei magri, ma la caduta nel siero di grelina totale era significativamente maggiore negli AN rispetto ai soggetti magri e obesi, anche se alla fine del test le concentrazioni di insulina non sono risultate significativamente differenti tra i gruppi studiati . Questi dati suggeriscono che questo effetto potrebbe essere specifico delle AN, in cui una più veloce soppressione della grelina potrebbe dare un più precoce senso di sazietà (186).

Numerosi studi hanno suggerito che la grelina è strettamente legata alla resistenza all'insulina . È stato riportato che nell'uomo bassi livelli plasmatici totali di grelina sono associati in maniera indipendente alla resistenza all'insulina (187). Vi è anche una relazione inversa tra grelina totale e insulina a digiuno. Nei pazienti anoressici vi è normale sensibilità insulinica e livelli bassi di insulina a digiuno; ciò potrebbe portare ad un aumento delle concentrazioni di grelina totale, cioè il calo progressivo di insulina circolante faciliterebbe la produzione di grelina in tali pazienti (187).

### **Glucagon-like Peptide1**

Fisiologia, obesità, chirurgia bariatrica

IL GLP-1 è un ormone polipeptidico appartenente alla famiglia degli enteroglucagoni, che viene secreto con il Peptide YY e l'oxintomodulina dalle cellule L dell'intestino distale in risposta al pasto. Esso è presente anche in numerose zone dell'encefalo come il Nucleo paraventricolare e dorso-mediale dell'ipotalamo, il talamo e l'ipofisi, ove funziona da neurotrasmettitore . GLP-1 stimola sia in vivo che in vitro la secrezione insulinica da parte delle cellule  $\beta$ - pancreatiche in risposta alla presenza di glucosio nell'intestino , ma la sua

azione comprende anche inibizione dello svuotamento gastrico, aumento della sensibilità all'insulina e inibizione della secrezione del glucagone, cosa che porta ad una minore sintesi epatica di glucosio (188). La carenza di GLP-1 è una delle cause della ridotta risposta della prima fase della secrezione insulinica nel diabete di tipo II.

Sia GLP-1 che PYY riducono l'introito di cibo, attraverso un meccanismo cui cooperano sia la Colecistokinina (CCK) che l'oxintomodulina. Essi infatti rallentano lo svuotamento gastrico, e utilizzano la secrezione acida gastrica come freno al transito intestinale, così da ridurre l'assorbimento dei nutrienti e promuovere la sazietà. Nell'obesità il GLP1 risulta ridotto. Il miglioramento del diabete di tipo II dopo chirurgia bariatrica è almeno in parte correlato all'aumento di GLP-1, non direttamente correlato ad ingestione di cibo. Infatti il rilascio di GLP-1 avviene in due fasi: una precoce a distanza di 10 minuti dal pasto ed una tardiva dopo 30-60 minuti. La fase tardiva dipende dalla diretta stimolazione delle cellule L dell'intestino distale da parte dei nutrienti, mentre nella secrezione precoce è coinvolto il nervo vago ed il neurotrasmettitore che rilascia gastrina. La Sleeve Gastrectomy a causa della riduzione di cellule oxintiche del

fondo gastrico a cui corrisponde un nervo vago intatto, porta alla produzione di peptide rilasciante gastrina e da qui ad una maggiore produzione di GLP-1 di fase precoce, indipendentemente dal contatto con i nutrienti. Peterly prima e Basso successivamente hanno studiato l'effetto del by-pass gastrico e della Sleeve Gastrectomy sulla secrezione degli enterormoni grelina, GLP-1, PYY e CCK , valutando la risposta a breve termine e dopo un anno dall'intervento. Peterly ha randomizzato 10 pazienti per By-pass gastrico e 10 pazienti per Sleeve Gastrectomy ed ha valutato la risposta dopo il pasto. Fisiologicamente la grelina nei normopeso aumenta a digiuno e si riduce velocemente dopo il pasto. Negli obesi prima dell'intervento il livello di grelina post-prandiale si manteneva patologicamente alto. Ad una settimana dall'intervento il livello di grelina sia a digiuno che dopo il pasto era significativamente più basso che prima dell'intervento e ciò si verificava anche a tre mesi sia nei pazienti che avevano ricevuto la SG che in quelli con By-pass gastrico. Invece a distanza di un anno nei pazienti con SG il livello di grelina a digiuno rimaneva basso, senza aumento dopo il pasto, mentre negli operati di by-pass i livelli a digiuno erano superiori a quelli pre-intervento, ma veniva ristabilita la

fisiologica caduta post-prandiale. Prima dell'intervento entrambi i gruppi mostravano normale risposta della CCK al pasto, ma dopo una settimana i valori erano marcatamente aumentati per entrambi i gruppi. Ad un anno la risposta al pasto della CCK si manteneva più elevata nei pazienti con SG che nei pazienti con By-pass gastrico. Per quanto riguarda il GLP-1 entrambi i gruppi avevano una carente risposta al pasto prima dell'intervento, mentre ad una settimana, a tre mesi e ad un anno il GLP-1 si manteneva elevato in quelli operati di By-pass, mentre negli operati di SG tale aumento era meno vistoso. Il PYY prima dell'intervento si manteneva patologicamente basso dopo il pasto in entrambi i gruppi, mentre aumentava in maniera cospicua in risposta al pasto sia a breve distanza dall'intervento che ad un anno dallo stesso, con differenze non significative tra i due gruppi studiati ( 177) .

Basso ha sostanzialmente confermato i risultati di Peterli nella SG, dimostrando inoltre che le variazioni degli enteroormoni studiati avvengono già nelle prime 72 ore dall'intervento, quindi prima di una consistente perdita di peso ed indipendentemente dal pasto , avvalorando l'ipotesi che almeno per quanto riguarda la secrezione di GLP-1, la fase

precoce è probabilmente legata all'effetto dell'acidità gastrica ed è mediato dal nervo vago (189).

### **GLP1 nell'anoressia**

In uno studio condotto da Tomasik (190) il livello di GLP1 in pazienti anoressiche risulta essere basso. Tuttavia in uno studio più recente in cui viene paragonato il livello a digiuno e la eventuale presenza di un ritmo circadiano in pazienti anoressici ed in magri costituzionali rispetto a controlli normopeso, il livello di GLP1 degli AN a digiuno risulta più basso dei controlli, ma più alto dei magri costituzionali; inoltre durante la giornata il GLP1 si mantiene negli anoressici molto più alto sia rispetto ai controlli che rispetto ai magri costituzionali (191)

### **Peptide YY**

Il peptide YY (PYY), viene secreto dalle cellule L situate nella parte distale dell'intestino, principalmente colon e retto in risposta al cibo (192). Esso rallenta lo svuotamento gastrico, inibisce la contrazione della colecisti e la secrezione gastrica e pancreatico. Altre funzioni sono la riduzione della gittata

cardiaca, la vasocostrizione e la riduzione del flusso plasmatico renale. PYY riduce l'appetito perché riduce l'espressione di NPY nel nucleo arcuato ed attiva invece i neuroni anoressigeni POMC; l'effetto inibitorio sull'assunzione di cibo è mediato dal legame con recettori Y accoppiati a G protein (193).

Il Peptide YY ( PYY) possiede un residuo di tirosina su entrambi i suoi terminali aminico e carbossilico. Viene sintetizzato e rilasciato dalle cellule L del tratto gastrointestinale come peptide di 36 aminoacidi, ma la forma in circolo è costituita principalmente da 34 aminoacidi, essendo stata troncata l'estremità N-terminale . Il livello plasmatico di PYY sale un'ora dopo il pasto ed è influenzato dalla composizione del pasto e dal suo contenuto calorico (192). Nell'obesità i livelli di PYY sono bassi, suggerendo un ruolo di questo enteroormone nel determinismo di tale patologia (194). Topi knock-out per PYY sono obesi e la somministrazione di PYY riconverte il loro fenotipo verso la normalità. La somministrazione di PYY in individui normopeso ed obesi riduce l'assunzione di cibo del 30% in entrambi (195), suggerendo un ruolo terapeutico del PYY nell'obesità anche nell'uomo, non essendosi manifestata

resistenza al PYY negli obesi trattati. Negli operati di chirurgia bariatrica si assiste ad un aumento sostenuto del PYY. Tale aumento inizia entro due giorni dall'intervento e dura almeno 2 anni e può contribuire alla duratura perdita di peso in tali pazienti (196).

Nei pazienti anoressici vi sono evidenze scientifiche contrastanti in quanto Misra e coll. hanno trovato livelli di PYY maggiori dei controlli normopeso, mentre Stock ed altri hanno riscontrato valori plasmatici più bassi dei controlli. In un lavoro di Germain (191) il valore di PYY a digiuno è più basso rispetto a magri costituzionali e a controlli normopeso e inoltre la curva di secrezione circadiana (rispetto a quella degli altri due gruppi) ha un profilo più piatto, con un minimo alle ore 4 ed un massimo alle ore 16. In questo studio, bassi livelli di PYY e leptina ed alti livelli di grelina nei pazienti anoressici sono stati interpretati come un tentativo da parte dell'organismo di forzare, attraverso il profilo enteroormonale il blocco psicologico, nel tentativo di aumentare l'introito calorico. Questo studio ha inoltre evidenziato come sulla base dei differenti profili enteroormonali è possibile distinguere tra anoressici e magri costituzionali (questi ultimi mostrano grelina bassa e PYY elevato).

## **Colecistochinina**

Mentre la leptina e l'insulina sono considerati segnali dello stato energetico "a lungo termine", gli ormoni gastrointestinali sembra siano implicati nell'indurre l'inizio e la fine del pasto. La colecistokinina (CCK) riduce l'appetito sia nel ratto che nell'uomo (197). E' prodotta dalle cellule L di duodeno e digiuno ed il suo livello plasmatico aumenta entro 15 minuti dal pasto, stimola la contrazione della colecisti e rallenta lo svuotamento gastrico (198). Tuttavia la CCK è anche il neuropeptide maggiormente presente a livello del sistema nervoso centrale, in particolare nell'ipotalamo. L'effetto è mediato da recettori di tipo A nell'intestino e da recettori B nell'encefalo (199) . La somministrazione intracerebrale di CCK nel ratto induce riduzione dell'assunzione di cibo e lo stesso avviene nell'uomo dopo infusione plasmatica (200), tanto che la CCK è stata considerata utile per la terapia anti-obesità. Tuttavia la breve emivita, l'aumento compensatorio del numero dei pasti (in risposta alla riduzione quantitativa degli stessi) e lo sviluppo di tolleranza in seguito all'infusione peritoneale di CCK , ne hanno limitato la ricerca per scopi terapeutici. Inoltre in seguito ad interventi di chirurgia bariatrica, la CCK dopo il pasto non varia. Topi knock-out per il recettore CCK-

A , tendono ad aumentare la quantità di cibo ingerito e a diventare obesi, con un meccanismo che implica un aumento dei neuroni NPY a livello del nucleo arcuato dell'ipotalamo (201). Tuttavia l'uso di un agonista del recettore CCK-A nell'uomo, pur efficace nel ritardare lo svuotamento gastrico, non ha indotto alcuna perdita di peso in uno studio di 24 settimane in doppio cieco (202). Pertanto si crede che la CCK possa essere in futuro utilizzata nella terapia, ma in associazione ad altri enterormoni.

### **Insulin Growth Factor-1**

L'Insulin Growth Factor-1 (IGF-I) è un ormone con attività metabolica e mitogenica. IGF-I è secreto dal fegato sotto stimolo dell'ormone della crescita (GH) . La fisiologia di IGF-1 è complessa in quanto tale ormone ha una funzione endocrina come ormone sistemico ed anche una paracrino / autocrina come fattore di crescita locale (203). L' IGF-1 circolante è principalmente sintetizzato dal fegato e tale sintesi è GH-dipendente, può essere sintetizzato da una varietà di altri tessuti extraepatici, dove agisce come un fattore di crescita locale. L' IGF-I circola nel sangue legato a proteine

specifiche, le IGF-binding proteins (IGFBPs). L'IGF-1 è per la maggior parte legato ad IGFBP-3 e alla subunità acido labile (ALS) così formando un complesso ternario (204). Meno dell'1% del totale di IGF-1 circola come IGF-1 libero. Il legame di IGF-I in complesso ternario regola la biodisponibilità di IGF-I. Il ruolo cruciale nel deposito e nel rilascio di IGF-I nella circolazione sistemica è svolto dalla ALS, che è sintetizzata anch'essa dal fegato sotto il controllo del GH. L'azione paracrina di IGF-1 è regolata da IGFBPs (principalmente IGFBP-1, -2 e -4) che formano un complesso binario con IGF-I.

L'IGF-1 è un importante regolatore dell'omeostasi ossea e stimola la crescita longitudinale dell'osso agendo in maniera endocrina e paracrina (205,206). L'IGF1 esercita una vasta gamma di azioni metaboliche. Tenendo conto delle analogie tra IGF-1 e insulina si può ipotizzare che IGF-1 interferisca con il metabolismo glucidico e lipidico. La secrezione di IGF-1, come la secrezione di insulina, è stimolata dall'assunzione di cibo e inibita dal digiuno. IGF-1 è espresso prevalentemente nel fegato. L'eliminazione dell'IGF-1 derivato dal fegato in studi genetici nei topi, ha provocato la diminuzione della sensibilità all'insulina ed iperinsulinemia (207,208). Yakar ha

dimostrato che la resistenza all'insulina osservata nel muscolo, nel tessuto adiposo e nel fegato è secondaria alla diminuita inibizione della secrezione di GH a livello ipofisario, che a sua volta porta ad una maggiore secrezione di GH, ormone con un potente effetto diabetogeno (209). Tuttavia, non si può escludere un effetto diretto dell' IGF-1 derivato dal fegato sul metabolismo del glucosio (210).

#### IGF1 nell'anoressia

Nell'anoressia vi è una riduzione della concentrazione plasmatica di IGF-1 rispetto a soggetti di controllo, probabilmente correlata al diminuito rilascio dal fegato di IGF-1 , a causa della mancata assunzione di cibo (211). Come già detto, la secrezione di IGF-1 avviene sotto stimolo del GH; tuttavia l'interruzione del normale asse GH-IGF-1 è caratteristica della malnutrizione cronica (212) e Stoving ha dimostrato che variazioni della secrezione di GH negli AN possono essere attribuite ad una diminuzione del tono ipotalamico somatostatinergetico (213). In un altro studio in pazienti anoressiche, la secrezione di GH correla inversamente con gli indici nutrizionali (BMI, massa grassa, leptina plasmatica) , cosa che suggerisce che il controllo ipotalamico della secrezione di GH nei pazienti anoressici può

essere regolato dallo stato di nutrizione (214). Tuttavia, la bassa secrezione di IGF-1 nei soggetti cronicamente malnutriti per anoressia potrebbe anche contribuire al rilascio di GH indotto dal digiuno e all'adattamento al digiuno, attraverso l'induzione della resistenza all'insulina e della lipolisi. Fazeli ha somministrato GH ricombinante (rhGH) e placebo a pazienti anoressiche con l'obiettivo di chiarire l'effetto di concentrazioni superiori a quelle fisiologiche di GH sull'IGF-1 plasmatico per un periodo di 12 settimane. Non si è evidenziata nessuna differenza nell' IGF-1 plasmatico, nel glucosio, nell' insulina e negli acidi grassi liberi (FFA) nei due gruppi (215). La massa grassa totale risulta diminuita nel gruppo trattato con rhGH in confronto al gruppo placebo nonostante il peso corporeo simile in entrambi i gruppi. La conclusione principale di questo studio è che nei pazienti anoressici malnutriti, anche livelli sovrafisiologici di GH non riescono a stimolare la secrezione di IGF-1. La diminuzione della massa grassa osservata nei pazienti trattati con rhGH può essere causata da aumento della lipolisi GH- indotta.

In uno studio di rialimentazione, un miglioramento dello stato nutrizionale è stato accompagnato da un aumento di IGF-1 plasmatico e della sua attività biologica (216). Tutti questi dati

sostengono l'ipotesi che IGF-1 giochi nei pazienti anoressici un ruolo importante nell'adattamento alla fame cronica.

### **TNF- $\alpha$**

Il tessuto adiposo è organo attivo nell'influenzare il metabolismo energetico, l'immunità, la sensibilità all'insulina, l'infiammazione, la pressione sanguigna, il metabolismo dei lipidi, attraverso la secrezione di sostanze chiamate adipochine (217). Infatti oltre che da adipociti, cellule che accumulano grasso ed entrano nella regolazione dell'omeostasi energetica, il tessuto adiposo è anche costituito da cellule stromali, tra cui preadipociti, cellule staminali mesenchimali, fibroblasti, cellule endoteliali e macrofagi, che hanno un importante ruolo nel regolare l'infiammazione tissutale (218). Per convenzione, tutte le sostanze prodotte dal tessuto adiposo sono dette adipochine e a ne sono state scoperte più di 100. La comprensione dei meccanismi attraverso i quali viene stimolata la loro secrezione da parte del tessuto adiposo, rappresenta un obiettivo primario per ridurre soprattutto le complicanze legate all'obesità. Numerosi studi correlano lo stimolo alla secrezione di adipochine agli acidi grassi della dieta. Essi agirebbero attraverso la via dei Toll-like receptor 4

(TLR4), espressi sia nel tessuto adiposo viscerale che sottocutaneo, che sarebbero attivati dagli acidi grassi, determinando localmente la produzione di citochine, con la successiva induzione di infiammazione sistemica (219). All'infiammazione sistemica sono poi correlate le due principali complicanze dell'infiammazione del tessuto adiposo, la cardiopatia ischemica e il diabete di tipo II (220, 221), in quanto le adipochine da un lato inducono lipolisi e quindi accumulo di grasso ectopico e dall'altro resistenza all'insulina. Il  $\text{TNF}\alpha$  è una citochina pro-infiammatoria che ha un livello elevato nel plasma degli obesi e diminuisce in caso di perdita di peso (222). E' prodotto principalmente dai macrofagi e agisce iniziando una cascata di segnali che inducono apoptosi cellulare, con il fine ultimo di regolare la massa del tessuto adiposo (223). Altro meccanismo coinvolge i  $\text{PPAR-}\gamma$ , che sono chiavi di regolazione della trascrizione di fattori che controllano l'adipogenesi (224). La produzione di  $\text{TNF}\alpha$ , induce poi la secrezione di altre adipochine proinfiammatorie come l'IL6, mentre riduce l'adiponectina, che è antiinfiammatoria. Inoltre promuove l'aumento del PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno), che è legato alla cardiopatia ischemica (225). L'aumento del  $\text{TNF}\alpha$  determina

insulino-resistenza perché, attraverso la disregolazione delle protein-chinasi che fosforilano il substrato 1 del recettore dell'insulina, impediscono a quest'ultimo di unirsi al recettore stesso, determinando resistenza all'insulina (226,227). Anticorpi neutralizzanti il  $TNF\alpha$  determinano un miglioramento dell'uptake di glucosio successivo alla somministrazione di insulina (228). L'espressione del  $TNF\alpha$  è regolata dagli acidi grassi. In particolare in vitro l'acido palmitico (C16:0) stimola la produzione di  $TNF\alpha$  in maniera dose-dipendente, mentre l'acido oleico (C18:1n-9) ed il DHA (C22:6n-3) non la influenzano (229). La somministrazione nel ratto di una dieta ricca in grassi per 5 settimane aumenta il  $TNF\alpha$ , ma la co-somministrazione di EPA (C20:5n-3) previene questo aumento (228). In realtà tutti gli studi indicano che gli acidi grassi saturi aumentano, mentre gli n3-polinsaturi PUFA, riducono il  $TNF\alpha$  anche nell'uomo nel quale ad esempio, la somministrazione di acido linolenico e di olio di pesce riduce il  $TNF\alpha$  del 70 % (229).

## **IL-6**

L'interleuchina 6 è un'adipochina prodotta in parte dagli adipociti e per il 50% almeno dai macrofagi che infiltrano lo

stroma del tessuto adiposo, oltre che da leucociti e cellule endoteliali ( 230). E' coinvolta nella regolazione dell'infiammazione, dell'ematopoiesi e della risposta immune (230). Regola il peso ed il metabolismo lipidico, in quanto può sopprimere l'azione della lipoprotein-lipasi, con riduzione dell'accumulo di trigliceridi negli adipociti (231). Il suo recettore è presente nell'ipotalamo ove contribuisce alla regolazione della fame e della sazietà ( 232). I suoi livelli plasmatici sono aumentati nell'obesità, mentre in seguito a chirurgia bariatrica (bendaggio gastrico), i suoi livelli possono aumentare o ridursi. Tali differenti effetti possono correlarsi al polimorfismo genico secondo cui i portatori omozigoti dell'allele G perdono più peso in seguito all'intervento, rispetto ai portatori di GC o omozigoti CC. L'IL-6 diminuisce dopo bendaggio gastrico nei pazienti portatori dell'allele G ed aumenta in quelli con allele C, ciò potrebbe aiutare a selezionare il tipo di intervento di cui i pazienti maggiormente si gioverebbero (233). Anche la secrezione di IL-6 è influenzata dagli acidi grassi della dieta: il pretrattamento di macrofagi umani con EPA e DHA riduce la secrezione di IL-6 indotta dal LPS batterico (234), con riduzione anche dell'attività di NF- $\kappa$ B negli adipociti. In vitro, l'analisi di

adipociti di ratti nutriti con dieta arricchita di acidi grassi saturi, mette in evidenza una maggiore produzione di IL-6, mentre ratti nutriti con PUFA, mostravano minore produzione di IL-6 (235).

Nell'uomo lo studio Multietnico sull'Aterosclerosi, ha mostrato che la somministrazione di n-3 PUFA e di pesce riduce l'IL-6 nel plasma (236). Alti livelli di grassi saturi nella dieta aumentano l'IL-6 nel plasma e stimolano le vie di segnale di NF- $\kappa$ B, mentre il consumo di MUFA li riduce (236).

### **1.7 Microbiota ed epatosteatosi in differenti condizioni nutrizionali**

La NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) rappresenta un ampio spettro di condizioni clinico-istologiche che vanno dall'accumulo di grasso intracellulare epatico alla steatoepatite nella quale è presente una componente necroinfiammatoria, fino alla cirrosi ed al carcinoma epatico. Negli ultimi anni la patogenesi della NAFLD è stata legata alla sindrome metabolica. Le biopsie epatiche di pazienti obesi mostrano steatosi nell'80% dei casi, e di questi nel 20- 30% vi è fibrosi (237). Fattori di rischio per la NAFLD sono l'obesità, la

sindrome metabolica, il diabete mellito tipo II e la dislipidemia (238). Si è soliti classificare la NAFLD come 1) primaria (dovuta a condizioni associate ad insulinoresistenza come i tre fattori di rischio sopra citati); 2) secondaria ( - a farmaci come amiodarone, estrogeni, corticosteroidi, nifedipina, diltiazem; - a procedure chirurgiche come resezioni del piccolo intestino e by-pass digiuno -ileale; - a nutrizione parenterale nel caso in cui le miscele contengano troppi glicidi, miscele non bilanciate di lipidi e scarsa colina; - a tossici ambientali e chimici, a malattia di Weber Christian); 3) da causa incerta come da eccessiva crescita dei batteri intestinali, emocromatosi, epatite cronica HCV correlata.

La patogenesi della NAFLD non è chiara, ma sembra valida l'ipotesi che l'insulino-resistenza determini un aumento del trasporto di acidi grassi dal tessuto adiposo al fegato (239), con conseguente steatosi semplice. Un aumentato stress ossidativo legato ad aumento dei grassi della dieta stimola l'Ikk $\beta$  ( che promuove l'attivazione dell' NF-k $\beta$  ,enzima a sua volta coinvolto nella produzione di citochine pro-infiammatorie e nello sviluppo dell'insulino-resistenza), ed un aumento del TNF $\alpha$ , che insieme, inducono cambi nella fosforilazione del substrato del recettore dell'insulina,

distruggendo così il segnale intracellulare mediato dal legame dell'insulina col suo recettore . L'insulino-resistenza aumenta la lipolisi periferica e mette così in circolo maggiori quantità di acidi grassi liberi (FFA) che vengono in maggior misura captati dal fegato e lì accumulati; inoltre l'iperinsulinismo che ne deriva favorisce l'accumulo epatico di FFA perchè inibisce la glicolisi e la riesterificazione epatica dei trigliceridi in lipoproteine, impedendogli di lasciare il fegato per i tessuti periferici (240). Quindi l'insulino-resistenza aumenta l'afflusso di FFA dai tessuti periferici al fegato, e sembra che l'adiposità centrale attraverso il rilascio di FFA direttamente nel circolo portale sia implicata in misura maggiore rispetto all'adiposità periferica (241).

Nel fegato l'insulina stimola SREBP-1c , fattore nucleare che attiva la trascrizione di tutti i geni della lipogenesi , mentre l'iperglicemia attiva sia i geni della lipogenesi che la piruvato-kinasi. Pertanto iperglicemia ed iperinsulinismo stimolano la sintesi di acidi grassi e conseguentemente di malonil-CoA, che a sua volta inibisce la carnitina-palmitoil-transferasi (che trasporta gli acidi grassi nei mitocondri per ossidarli) e quindi l'eccesso di FFA che si crea non verrà beta-ossidato, ma verrà

riesterificato a trigliceridi, con successivo accumulo epatico di essi (242).

L'accumulo intraepatocitario di FFA induce stress ossidativo, con successiva possibile evoluzione della epatosteatosi in epatosteatite e successivamente in fibrosi Fig. 4). Il TNF $\alpha$  ha nella NAFLD il doppio ruolo di causa ed effetto. Infatti, da un lato TNF $\alpha$  può indurre insulino-resistenza e dall'altro l'obesità e l'insulinoresistenza attivano la produzione di citochine infiammatorie, tra cui soprattutto il TNF $\alpha$ . Esso viene prodotto da epatociti danneggiati e dalle cellule di Kupffer attivate sia da molecole derivanti dagli epatociti danneggiati dallo stress ossidativo che dalle endotossine prodotte dalla flora batterica intestinale (LPS), giunte al fegato tramite il circolo portale. Il LPS attiva il Toll receptor-4 (TLR4) che a sua volta recluta la via del MyD88, che esita nella produzione di TNF $\alpha$  e di IL-6 da parte delle cellule di Kupffer (243). L'attività del TNF $\alpha$  si esplica anche attraverso la stimolazione dell'attività dell'HMGCoA- reduttasi, della sintesi dei lipidi e della lipolisi periferica e attraverso l'inibizione dell'LCAT e della lipoproteinlipasi (LPL). Inoltre esso, inducendo aumento di NF $\kappa$ B, fattore di trascrizione delle citochine, crea un circolo vizioso autopertuantesi (244). Tutti questi eventi scatenano

la produzione di proteine della fase acuta dell'inflammazione con ulteriore attivazione delle cellule di Kupffer, che attraverso la secrezione di TGF $\beta$  e la presenza di prodotti di perossidazione delle membrane come l'idrossinonenale, attivano le cellule di ITO che trasformandosi in miofibroblasti attivi, producono collagene ,determinando fibrosi. Da alcuni anni anche il microbiota intestinale sembra influire sulla patogenesi della NAFLD, sia attraverso la produzione di LPS e quindi la stimolazione della cascata delle citochine come il TNF $\alpha$ , che attraverso la produzione in anaerobiosi di acetaldeide da piruvato, con successiva riduzione di essa ad etanolo (245). Tale ipotesi è sostenuta dall'evidenza che l'uso di antibiotici come la polimixina B ed il metronidazolo , o l'uso di probiotici , possono migliorare la epatosteatite sia nel ratto che nell'uomo. Recenti studi di Zhang e coll. (246) hanno dimostrato una differente flora batterica in individui obesi rispetto ad individui sottoposti a by-pass gastrico, con un maggior numero di Archea metanogeni negli obesi, che utilizzando l'idrogeno prodotto dalla fermentazione nell'intestino, potrebbero utilizzarlo come ulteriore fonte di energia. Furet (247) ha dimostrato che in individui sottoposti a by-pass gastrico vi è una maggiore perdita di peso se vengono

somministrati probiotici. Inoltre il microbiota dopo by-pass gastrico cambia velocemente, con aumento del *Faecalibacterium Prausnitzii*, specie legata alla riduzione dello stato infiammatorio nell'obesità, indipendentemente dall'intake calorico. Drenick ha ipotizzato che sia il miglioramento che l'eventuale scompenso della NAFLD i seguito a By-pass gastrico, possono essere legati a variazioni del microbiota.

### **Epatosteatosi nella SIC**

Una patogenesi simile avrebbe la NAFLD nei pazienti con Sindrome da intestino corto (SIC), nei quali si assiste a sovracrescita batterica con alterazione della funzione barriera dell'intestino e maggiore passaggio del LPS nel sangue portale. Alla steatosi si aggiunge la colestasi legata all'interruzione del circolo enteroepatico dei sali biliari, che tra le conseguenze ha anche l'aumentata traslocazione batterica con sepsi sistemica (248). Una delle principali cause di steatosi in tali pazienti è l'eventuale eccesso di glucosio (> 8-10 mg/kg/die) delle miscele nutrizionali dei pazienti che praticano la Nutrizione Parenterale (10) o l'eccesso di lipidi in quantità superiore a 1 gr./kg/die (soprattutto se si tratta di trigliceridi a catena lunga (LCT) derivanti dai lipidi della soia,

ora sostituiti da miscele SMOF contenenti olio di soia, di oliva, MCT e olio di pesce, quindi con una composizione lipidica più simile a quella assunta con una normale dieta), o la mancanza di acidi grassi essenziali, di colina, di taurina e di glutatione.

Nelle pazienti anoressiche, invece, la steatosi è causata da accumulo epatico di lipidi per l'impossibilità di esportarne sotto forma di lipoproteine, a causa della carenza cronica di aminoacidi necessari alla loro sintesi.

## **Cap 2. Scopo dello studio**

Il nostro studio si propone di valutare le possibili correlazioni esistenti tra gli Acidi Grassi a Catena Corta fecali (SCFA) prodotti dal microbiota intestinale, la struttura epatica valutata con ultrasonografia, alcuni parametri espressione del metabolismo, alcuni enterormoni e citochine, in 4 gruppi di pazienti differenti per lo stato nutrizionale ed in un gruppo controllo.

### Cap.3 Pazienti e Metodi

#### *Popolazione in studio*

Sono stati studiati 91 soggetti scelti tra i pazienti a peso stabile afferenti agli ambulatori dell'Area centralizzata di Nutrizione clinica così suddivisi: n.20 pazienti con anoressia nervosa di tipo restrittivo (AN) (3 M-17 F, età media  $22\pm 4$  anni, BMI  $14,1\pm 1$  kg/m<sup>2</sup>); n.14 pazienti con sindrome dell'intestino corto (SIC), in Nutrizione Parenterale Domiciliare (5 M – 9 F, età media  $38\pm 17$  anni, BMI  $20\pm 3$  kg/m<sup>2</sup>); n.20 pazienti operati di Sleeve Gastrectomy (SG) a scopo bariatrico da più di un anno (7 M – 13F), età media  $39\pm 9$ , BMI  $36\pm 8$  kg/m<sup>2</sup>; n.17 pazienti obesi (OB) (10 M – 7 F), età media  $37\pm 11$ , BMI  $45\pm 7$  kg/m<sup>2</sup> e n.20 controlli normopeso (CNP) (8 M – 12 F), età media  $38\pm 14$ , BMI  $22\pm 3$  kg/m<sup>2</sup>. La popolazione in studio è stata reclutata presso gli Ambulatori dell' Area Centralizzata di Nutrizione Clinica, Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Federico II di Napoli. Tutti i soggetti arruolati, hanno firmato il consenso informato per la partecipazione allo studio.

Per ciascun soggetto, dopo la raccolta dell'anamnesi e l'esame obiettivo, sono state rilevate le misure antropometriche e sono stati effettuati prelievi di sangue a digiuno per la valutazione dello stato di nutrizione, della funzione endocrina con particolare riferimento agli enterormoni e ad alcune citochine pro-infiammatorie. Un campione di feci è stato prelevato per la valutazione del contenuto in acidi grassi a catena corta (SCFA) e della flora batterica intestinale. È stata effettuata un'inchiesta alimentare per correlare le differenti abitudini alimentari alla flora batterica intestinale e agli SCFA. Per ciascun soggetto è stato misurato il dispendio energetico a riposo, in condizioni standardizzate (metabolismo basale) con calorimetria indiretta e valutata la composizione corporea con bioimpedenziometria (BIA).

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad ecografia epatica, con metodo standardizzato, per l'identificazione di eventuale steatosi epatica e sua quantizzazione. Il rischio di steatosi epatica è stato valutato mediante l'indice di grasso epatico (FLI), un algoritmo basato su BMI, circonferenza vita, trigliceridi e gamma GT, come precedentemente descritto da altri autori (249)

### ***3.2 Antropometria***

L'altezza è stata misurata mediante uno stadiometro con una sensibilità di 0,1 cm e il peso corporeo con bilancia meccanica con una sensibilità di 0,1 Kg con il soggetto a piedi nudi e avente indosso abiti leggeri; dalla misurazione di peso e altezza è stato calcolato il BMI ( $\text{Kg/m}^2$ ); la circonferenza vita è stata misurata con un metro a nastro a livello delle creste iliache.

### ***3.3 Calorimetria indiretta***

Il metabolismo a riposo dei soggetti in studio è stato misurato con calorimetria indiretta per 30 minuti mediante il calorimetro Vmax 29n, Sensor-Medics. La calorimetria indiretta valuta il dispendio energetico a riposo attraverso la misura del consumo di  $\text{O}_2$  ( $\text{VO}_2$ ) e della produzione di  $\text{CO}_2$  ( $\text{VCO}_2$ ). Il quoziente respiratorio (QR), ottenuto dal rapporto tra  $\text{VO}_2$  e  $\text{VCO}_2$ , fornisce indicazioni circa la miscela metabolica utilizzata dal soggetto. Prima di ogni misura gli analizzatori del gas sono stati calibrati utilizzando la miscela di gas di riferimento (95%  $\text{O}_2$  e 5.00%  $\text{CO}_2$ ).

Per il calcolo del metabolismo basale è stata utilizzata la formula di De Weir ottenendo quindi una media rispetto al periodo intero di misura. Durante le misurazioni, il soggetto è

in posizione supina. a digiuno da almeno 12 ore, dopo una notte di riposo, nessun esercizio fisico o pasto eccessivo o abuso di sostanze eccitanti nelle 24 ore precedenti la misura; durante la determinazione vanno garantite condizioni di termoneutralità (20-24 °C), inoltre è necessaria l'assenza di qualsiasi fattore di eccitazione fisica o psichica.

Dopo aver permesso ai pazienti di adattarsi allo strumento per 15-20', sono stati determinati per 45' il consumo di ossigeno e la produzione di anidride carbonica.

La strumentazione del calorimetro comprende un'unità centrale contenete il misuratore di gas per la ventilazione polmonare, analizzatori per l'O<sub>2</sub> e la CO<sub>2</sub>, un barometro ed un termometro per misurare le variabili ambientali al fine di correggere il volume di aria espirata a condizioni standard di temperatura, pressione ed umidità, la pompa di aspirazione dell'aria, il flussimetro ed un monitor su cui compaiono tutte le misurazioni dei parametri metabolici determinati. A questa unità centrale sono collegati un computer e un casco trasparente di forma ellissoidale del volume di circa 30 litri (canopy).

### ***3.4 Bioimpedenziometria (BIA)***

L'analisi bioimpedenziometrica permette di valutare la composizione corporea mediante misure elettriche. In particolare viene valutata la TBW (Total Body Water = acqua totale corporea), somma dell'acqua intracellulare (ICW = IntraCellular Water) e dell'acqua extracellulare (ECW = ExtraCellular Water): in condizioni fisiologiche normali esse rappresentano rispettivamente circa il 60% e 40% dell'acqua corporea totale nell'adulto. La BIA fa riferimento ad un modello di composizione corporea di tipo bicompartimentale: la FFM (*free fatty mass*), in condizioni fisiologiche normali, costituita nell'adulto dal 73% di acqua e la FM (*fatty mass*) considerata completamente anidra anche se in realtà può avere fino al 5% di acqua. Da un punto di vista elettrico, la FFM, ricca in acqua ed elettroliti, è un buon conduttore elettrico, mentre la FM non è capace di condurre elettricità.

L'impedenza ( $Z$ ) ha una parte resistiva (la *resistenza*  $R$ ) e una parte legata ai fenomeni energetici di accumulo (la *reattanza*  $X$ ). Entrambe le componenti sono espresse in ohm. Matematicamente ciò si esprime con la formula:

$$Z = R + jX$$

( $j$  è l'unità immaginaria).

Nel corpo umano sano la resistenza contribuisce per ben il 98% all'impedenza e la reattanza al 2%. Il rapporto tra X ed R è detto fattore Q e la sua tangente è detta *angolo di fase*. L'angolo di fase è espresso in gradi e rappresenta il ritardo che la corrente elettrica alternata a 50 Hz incontra nell'attraversare un conduttore. Nell'organismo umano le membrane cellulari fungono da condensatori (trattengono cioè una certa quantità di corrente elettrica), per tale motivo l'angolo di fase sarà direttamente proporzionale alla quantità di membrane cellulari. Essendo una metodica indiretta, la BIA ha bisogno di equazioni specifiche per trasformare il dato elettrico in massa corporea. Il parametro elettrico che viene utilizzato è l'impedenza o la resistenza elettrica misurata a 50 kHz corretta per l'altezza; tale parametro viene definito come Indice Biompedenziometrico (BI biompedance Index =  $\text{Altezza}^2 / \text{resistenza} - 50 \text{ kHz} - \text{cm}^2/\text{ohm}$ ).

L'analisi bioimpedenziometrica è capace di definire la ripartizione dell'acqua corporea tra spazi intra ed extracellulari. I parametri BIA utilizzati per tale tipo di analisi sono: l'angolo di fase e la multifrequenza.

In questo studio, la resistenza e la reattanza per l'intero organismo (R e X) sono state misurate con l'apparecchio

AKERN BIA 101 (BIA 101, Akern, Firenze, Italy). L'apparecchio è costituito da 4 elettrodi di cui 2 iniettori e 2 sensori. Il soggetto è supino, non a contatto con superfici metalliche. Le gambe sono divaricate di un angolo che va da 0° a 45° e gli arti superiori sono abdotti (allontanati dal tronco) di un angolo da 0° a 30°. In genere si usa una corrente alternata a 50 kHz di debole intensità (400 microampere), del tutto innocua.

Gli elettrodi iniettori vengono posizionati sulla superficie dorsale della mano e del piede, mentre gli elettrodi sensori vengono posizionati tra le prominente del radio e dell'ulna e tra il malleolo mediale e laterale della caviglia. Agli elettrodi vengono collegati dei fili conduttori, attraverso cui viene fatta circolare la corrente, che, attraversando le strutture corporee, subirà un calo della sua intensità dovuta all'impedenza associata alle strutture corporee; il segnale risultante (ovvero la risposta in termini di intensità elettrica) viene trasmesso ad un apparecchio trasduttore che raccoglie i dati traducendoli in misure corporee.

Le misurazioni sono state ottenute in stato post-assorbitivo (la mattina a digiuno), ad una temperatura ambientale di 22-24°C,

dopo aver svuotato la vescica e dopo essere rimasti in posizione supina per almeno 20 minuti.

La FFM e la FM sono state valutate utilizzando l'equazione predittiva sviluppata da Kushner (250).

Tutte le misurazioni della BIA sono state calcolate come media dei valori ottenuti su entrambi gli emilati. L'angolo di fase (PA) è stato ottenuto dal rapporto reattanza/resistenza:  $PA \text{ (gradi)} = \arctan (XC/Res)$ .

### ***Questionario sulle abitudini alimentari***

Per la registrazione delle abitudini alimentari è stato usato un questionario validato dall'Università di Perugia, Istituto di Scienza dell'Alimentazione (251) che si basa sulla registrazione per ricordo degli alimenti assunti abitualmente e di recente, mediante frequenza di consumo. Si chiede al soggetto quante volte al giorno o alla settimana o al mese, consuma un determinato cibo o una serie di cibi. Il questionario dà dunque un'idea delle abitudini alimentari più che dei consumi effettivi.

### ***Ecografia epatica***

L'ecografia epatica è stata eseguita da due indipendenti operatori all'oscuro dei dati clinici dei pazienti. È stato utilizzato un apparecchio Esaote Mpx Biomedica con sonda convessa 3.5-MHz e una sonda lineare ad alta frequenza (7-13 MHz). La steatosi epatica è stata valutata semiquantitativamente su una scala da 0 a 3 (0: assente; 1: lieve; 2: moderata; 3: grave). La steatosi è stata classificata secondo Saverymuttu et al.(252) sulla base di anormali echi intensi e di alto livello dal parenchima epatico, dalla differenza rene-fegato nell'ampiezza dell'eco, dalla penetrazione dell'eco nella porzione profonda del fegato, e dalla chiarezza della struttura dei vasi sanguigni del fegato(253, 254).

### ***Indagini di laboratorio***

Le indagini ematochimiche (azotemia, glicemia, creatininemia, emocromo, QPE, transaminasi, colesterolo totale, HDL-colesterolo, trigliceridi, fibrinogeno, ferritina, insulinemia, colinesterasi) sono state determinate con metodi di laboratorio di routine presso il DAS Medicina di Laboratorio - Servizio Analisi - Azienda Ospedaliera

Universitaria “Federico II” di Napoli. L’indice di insulinoresistenza è stato calcolato utilizzando l’indice HOMA.

Oltre alle indagini ematochimiche di routine sono state dosate le adipocitochine TNF $\alpha$ , IGF-1, IL-1 e IL-6, e gli enterormoni Leptina, GLP-1, Grelina, CCK e NPY. Tale dosaggio è stato eseguito mediante Tecnologia Luminex xMAP con il sistema Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), una piattaforma automatizzata per l’analisi contemporanea di decine di analiti in circa 5 ore. L’opportuno software, utilizzando le curve standard incluse nel saggio, fornisce la quantificazione assoluta senza bisogno di ulteriori elaborazioni dei dati (255). In particolare, il Bio-Plex Pro Human Diabetes Panel consente il dosaggio contemporaneo di 14 biomarker più frequentemente dosati nei pazienti obesi e diabetici, e cioè: C-peptide grelina, GIP, GLP-1, glucagone, IL-6, insulina, leptina, PAI-1, resistina, visfatina, TNF-alpha, adiposina, adiponectina.

### ***Raccolta campioni di feci***

Per la raccolta delle feci sono stati utilizzati contenitori specifici muniti di cucchiaino interno. I campioni di feci sono

stati raccolti dai pazienti e dai controlli in quantità pari ad una noce evitando di mescolare le feci con le urine. Il campione è stato conservato in luogo fresco (2-8 °C) e consegnato il prima possibile in laboratorio per un massimo di 24 ore. Tutti i pazienti hanno sospeso l'eventuale terapia antibiotica per almeno una settimana. Successivamente alla consegna i campioni sono stati congelati entro 4 ore a -20 °C e conservati per le successive indagini gascromatografiche, saggio real-time PCR e metodo colturale.

### ***3.9 Determinazione degli acidi grassi a catena corta (SCFA)***

#### *Analisi Gas Cromatografica con Rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID Flame Ionization Detector)*

I campioni di feci sono stati pesati (1 g), sospesi in 5 ml di acqua distillata e agitati con agitatore orizzontale per 5 minuti. Il campione è stato acidificato con HCl (5 M) fino ad un pH ~ 2 e successivamente centrifugato (4000 rpm x 20 min). Sono stati prelevati 980 µl di acqua fecale e aggiunti a 20 µl di Acido Metacrilico (2.5 mMol/ ml). Il contenuto in acidi grassi a catena corta (acido acetico, acido propionico e acido

butirrico) è stato determinato mediante gas cromatografo Hewlett Packard 5890 Series II con rilevatore a ionizzazione di fiamma iniettando 1 µl di campione in colonna capillare Supelco SPB<sup>TM</sup> 30m x 0.25mm x 0.25mm. I risultati sono stati elaborati mediante un integratore Hewlett Packard 3396 Series II (256).

### **3.10 Analisi della flora batterica intestinale mediante saggio real-time PCR**

#### *Preparazione del campione e estrazione del DNA*

I campioni di feci sono stati congelati e conservati immediatamente a -20°C. Al momento dell'analisi i campioni sono stati scongelati e il DNA è stato estratto secondo le indicazioni del kit QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). La concentrazione del DNA è stata determinata con uno spettrofotometro Nanodrop-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA).

#### *Saggi PCR quantitativa Real-Time*

I geni target, le sequenze dei primer e delle sonde (lifetech, applied biosystems), e le dimensioni dell'amplicone per due saggi real-time PCR usati in questo studio sono riassunti in tabella 1 (257) phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono stati progettati sulla base del DNA genomico dei barcode precedentemente descritti (258) . I primers e le sonde del genere *Lactobacillus* usati in questo studio sono stati precedentemente riportati (259). Le sonde e i primers *M. smithii* (tabella 1) sono stati fatti sintetizzare secondo quanto riportato (260) . Nei campioni sono stati inseriti 5 pmol di primers e sonde marcate con FAM o VIC. Un totale di 5 µl di DNA estratto dalle feci è stato diluito 1/10, 1/100, o 1/1000. Le diluizioni sono state portate a un volume finale di 25 µl. I cicli di amplificazione real-time PCR per la determinazione dei *Bacteroidetes* comprendono 95°C per 15 min e 45 cicli (95°C 30 s, 48°C 45 s, 72°C 1 min). Per le determinazioni dei *Firmicutes* e *Lactobacillus*, i cicli di amplificazione comprendono 95°C per 15 min e 45 cicli (95°C 30 s, 60°C 1 min). La determinazione e quantificazione dei *Lactobacillus* è stata eseguita come precedentemente riportato (257). *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono stati quantificati usando un

plasmide sintetico che è stato costruito come precedentemente descritto.

**Table 1.** *Bacteroidetes* and *Firmicutes* Real-Time PCR System.

Target phylum	Target gene	Amplicon length (bp)	Primer and probe sequences
<i>Lactobacillus</i>	Tuf	90	FP: TACATYCCAACHCCAGAACG
			RP: AAGCAACAGTACCACGACCA
			Probe: AAGCCATTCTTRATGCCAGTTGAA
<i>Firmicutes</i>	16S rRNA	179	FP: GTCAGCTCGTGTCTGTA
			RP: CCATTGTAKYACGTGTGT
			Probe: GTCAANTCATCATGCC
<i>Bacteroidetes</i>	16S rRNA	184	FP: AGCAGCCGCGGTAAT
			RP: CTAHGCATTTACCGCTA
			Probe: GGGTTAAAGGG
<i>M. smithii</i>	16S rRNA	123	FP: CCGGGTATCTAATCCGGTTC
			RP: CTCCAGGGTAGAGGTGAAA
			Probe: CCGTCAGAATCGTCCAGTCAG

FP indicates the forward primer, and RP indicates the reverse primer.  
doi:10.1371/journal.pone.0007125.t001

### *Plasmide di quantificazione*

La curva standard per l'analisi quantitativa è stata costruita utilizzando diluizioni seriali di un plasmide contenete frammenti chimerici corrispondenti alle sequenze specifiche dei 3 gruppi batterici ricercati (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, e *M. smithii*).

La lunghezza del frammento chimerico è di 485 bp.

agcagccgcgtaatACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATT-  
 TATT<sup>ggg</sup>tttaaaggAGCGTAGGTGGACTGGTAAGTCAGTTGT-  
 GAAAGTTTGC GGCTCAACCGTAAAATTGCAGTTGATAC-  
 TGTCAGTCTTGAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTCG-  
 TGGT<sup>gtagcgg</sup>tgaatgcttaggtcagctcgtgtcgtgaGATGTTGGGTT-  
**AAGTCCC**GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGC-  
 CATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGT-  
**GACAA**CCGGAGGAAGGTGGGGATGAC<sup>gtcaa</sup>atcatg-  
**cc**CCTTATGACCTGGGCT <sup>acacacgtg</sup>tacaatgg <sup>ccgggtatcta</sup>at-  
<sup>ccgggtc</sup>GCGCCCCTAGCTTTCGTCCCTCA<sup>ccgtcagaatcgtccagtcag-</sup>  
ACGCCTTCGCAACAGGCGGTCTCCAGGATTACAGA-  
Attcacctctaccctgggag.

La sequenza target per i *Bacteroidetes* è indicata in stile normale, la sequenza target per i *Firmicutes* è indicata in stile grassetto, e la sequenza target per *M. smithii* è indicata in stile sottolineato. Le sequenze primer sono indicate in minuscolo e sottolineate; le sequenze probe sono indicate in minuscolo e in corsivo (257).

### *Metodo colturale*

Un 1 gr di materiale fecale prelevato dal centro del campione è stato passato in terreno di arricchimento Brain Heart Infusion Broth effettuando diluizioni seriali, da  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Per la ricerca dei batteri aerobi si stanno utilizzando i seguenti terreni di coltura: Macconkey Agar n° 3, Mannitol Salt Agar e Columbia Agar Base supplementato con sangue di montone (Oxoid). Vengono piastrati 0.1ml di campione dalle diluizioni  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  e poi incubati in aerobiosi a 37°C per 24-48 h. Per la

ricerca dei batteri anaerobi si stanno utilizzando i terreni di coltura a base di sangue di montone: Agar Schaedler (diluizioni:  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$ ), Schaedler Kana-Vanco Agar, Schaedler CNA Agar (diluizioni  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$ ) e terreni selettivi: Bacteroides Bile Esculin Agar (diluizioni  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$ ), LBS agar (per la ricerca dei lattobacilli), Bifidobacterium Agar (per la ricerca dei bifidobatteri) e CCFA (per la ricerca del Clostridium difficile). Le piastre vengono incubate in cappa per anaerobi (miscela: 85%  $N_2$ , 10%  $H_2$  e 5%  $CO_2$ ) ad una temperatura di 37°C. Dopo 24 – 48 ore le colonie vengono subcoltivate e incubate in doppio: in anaerobiosi ed in incubatore a  $CO_2$  per distinguere i batteri anaerobi obbligati da quelli facoltativi (261,262,263). I microrganismi sono stati identificati seguendo procedure standard e mediante successivi test biochimici standardizzati e miniaturizzati: Api 20A, Api20E, ApiStrep, ApiStaph (BioMerieux) (263-65).

#### **Cap.4 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il programma SPSS versione 11.0. I dati delle variabili continue sono stati espressi come media e deviazione standard. Per il confronto

delle medie dei valori è stato utilizzato il t-test, mentre per il confronto tra gruppi è stato usato il test ANOVA per l'analisi della varianza e la significatività delle correlazioni è stata valutata con il Test di Pearson . Sono stati considerati significativi valori di  $p$  inferiori a 0.05.

## **Cap.5 Risultati**

La popolazione dei soggetti esaminati è omogenea per età, tranne che per gli AN, la cui patologia ha insorgenza in età più precoce rispetto alle altre e che dunque sono in media più giovani rispetto agli altri gruppi. I pazienti esaminati sono stati scelti tra i soggetti a peso stabile.

I risultati degli esami di routine per i quali sono state messe in evidenza differenze statisticamente significative tra i gruppi sono descritti nelle Tabelle 2a,2b e 2c. Per la glicemia vi è differenza significativa tra gli AN e gli Obesi (OB) ( $p=0,001$ ) e tra gli AN ed i controlli normopeso (CNP) ( $p=0,031$ ); l'albuminemia è inferiore negli AN rispetto agli OB ( $p=0,009$ ); la colesterolemia è significativamente più bassa nei SIC e negli AN rispetto agli OB ( $p=0,000$ ), ai CNP ( $p=0,001$ )

ed agli operati di S.G. (S.G.) ( $p=0,001$ ); la trigliceridemia mostra differenze tra gli AN e gli OB ( $p= 0.005$ ). Le HDL sono più basse nei SIC rispetto agli S.G. ( $p=0,051$ ) e agli AN ( $p=0, 045$ ) e negli OB rispetto agli AN ( $p=0,012$ ) e agli S.G. ( $p=0,011$ ). Per l'insulinemia gli OB hanno, come atteso, valori molto elevati e differenze statisticamente significative ( $p< 0,000$ ) nei confronti di tutti e quattro gli altri gruppi. Nei valori dell'emocromo troviamo un ematocrito più elevato negli OB rispetto alle AN ( $p=0,000$ ), valori di emoglobina più elevati negli OB rispetto ai SIC ( $p=0,029$ ) e agli AN ( $p=0,005$ ), linfociti più bassi negli AN rispetto agli OB ( $p=0,000$ ). Gli OB hanno valori statisticamente differenti di CK e di colinesterasi rispetto a tutti gli altri gruppi ( $p<0,005$  e  $p<0,005$ ). Tra gli indici infiammatori: PCR, ferritina e fibrinogeno, solo quest'ultimo ha mostrato differenze statisticamente significative per gli AN vs SIC e S.G. ( $p<0,015$ ) e per gli OB vs AN e CNP ( $p=0,000$ ). Per quanto riguarda gli indici di citolisi, sia AST che ALT sono significativamente più alte nel gruppo di pazienti AN rispetto agli operati di S.G., mentre tra gli indici di colestasi solo la ALP è significativamente più alta nei SIC rispetto agli AN agli S.G. e agli OB. Riguardo le caratteristiche antropometriche (tabella 3), il peso mostra

differenze significative tra gli OB ed i SIC, tra gli AN ed i CNP ( $p=0,000$ ); l'IMC ed il metabolismo basale mostrano differenze statisticamente significative tra tutti i gruppi ( $p=0,000$ ) tranne che tra i SIC ed i CNP. Come atteso esiste una stretta correlazione tra peso ed M.B. in tutti i gruppi ( $r = 0.87$  ;  $p= 0,001$ ). Il quoziente respiratorio è praticamente sovrapponibile nei gruppi. Per quanto riguarda i dati bioimpedenziometrici, la resistenza è significativamente maggiore nei SIC e negli AN rispetto agli S.G. e agli OB e negli OB rispetto ai CNP, mentre la Reattanza (XC) è più elevata nei SIC rispetto agli OB ( $p=0,019$ ).

L'analisi di enterormoni ed adipocitochine ha mostrato differenze statisticamente significative per la leptina e la grelina (vedi tabella 4 e fig.6 e fig.7), mentre i dati inerenti gli altri analiti, pur molto diversi tra i vari gruppi, non raggiungono la significatività statistica (tabella 5). In particolare per quanto riguarda il GLP1, i valori più bassi sono stati trovati negli S.G. quelli più elevati nei SIC e negli AN, ma senza raggiungere la significatività. L'analisi gascromatografica delle feci ha mostrato i valori descritti nella tabella 5, laddove l'acido butirrico è significativamente più basso negli AN rispetto agli S.G. ( $p=0,05$ ) e agli OB

( $p=0,000$ ), l'acido propionico è significativamente più basso negli AN rispetto ai SIC, agli S.G. e agli OB ( $p < 0,05$ ), i dati per l'acido acetico sono differenti tra i gruppi ma non significativi (fig.8).

L'epatosteatosi ha mostrato una prevalenza globale del 25% nella popolazione sottoposta allo studio, così distribuita: 21% dei pazienti affetti da SIC, 10% degli AN, 46% degli OB, 45% dei pazienti operati di S.G. e 20% dei C.N.P. Per quanto riguarda l'entità della steatosi abbiamo riscontrato steatosi di grado lieve nel 21% (3) dei pazienti affetti da SIC, nel 35% (7) degli operati di SG, nel 10% (2) degli Anoressici, nel 10% (2) degli OB, e nel 15% (3) dei CNP; steatosi di grado moderato nel 10% (2) degli operati di S.G., nel 30% (6 paz.) di OB, e nel 6,5% (1) dei CNP.; steatosi grave è stata riscontrata nel 6% degli OB (1 paziente). Valori di transaminasi superiori alla norma in associazione alla steatosi sono stati riscontrati in un paziente con la SIC, in 2 pazienti OB ed in un CNP. Nessun operato di chirurgia bariatrica presentava ipertransaminasemia ed in una paziente osservata prima e dopo la SG, a 6 settimane dall'intervento si era avuta la normalizzazione delle transaminasi. Due pazienti

AN mostravano ipertransaminasemia in assenza di steatosi epatica. La percentuale globale di epatosteatosi risultava sovrapponibile negli OB e negli operati di SG: nessun operato di SG presentava steatosi grave, solo il 10% dei SG, contro il 30% degli OB presentava steatosi moderata, ed il 35% dei SG mostrava steatosi lieve contro solo il 10 % degli Obesi ( vedi tabella 6 e Fig.8).

Per i dati relativi all'inchiesta alimentare si rimanda alla Tabella 7 e per quelli relativi ai diari alla Tabella 8. Dall'analisi dei dati relativi agli introiti, si può dedurre che l'inchiesta alimentare risulta più affidabile nella definizione dei consumi di ciascun gruppo. Nel diario, infatti gli Obesi tendono ad omettere determinati alimenti e/o relative reali quantità, mentre per gli AN si verifica il contrario. Dall'analisi dei dati dell'inchiesta alimentare si evince che: per quanto riguarda l'introito calorico totale, vi è differenza statisticamente significativa tra AN e OB ( $p=0,05$ ) e tra AN e CNP. ( $p=0,023$ ). Per le proteine vi è differenza tra SG e OB e CNP ( $p=0,05$ ); tra AN e CNP e OB ( $p=0,05$ ). Per i lipidi vi è differenza tra i SIC e gli AN ed i CNP. ( $p<0,005$ ). Per i glicidi vi è differenza tra gli AN ed i CNP e gli OB ( $p<0,05$ ), e tra gli

SG ed i CNP e gli OB ( $p < 0,005$ ). Per la fibra totale vi è differenza tra SG e CNP e OB ( $p = 0,05$ ). Per gli acidi grassi saturi vi è differenza tra AN e CNP ( $p = 0,05$ ), mentre per gli acidi grassi polinsaturi vi è differenza tra i SIC e gli AN ( $p = 0,000$ ) ed i C.N.P. ( $p = 0,023$ ). Per gli Acidi grassi monoinsaturi vi è differenza tra i SIC e gli AN ( $p = 0,000$ ), tra i SIC ed i C.N.P. ( $p = 0,006$ ) e tra i SIC e gli S.G. ( $p = 0,011$ ).

Da uno studio di correlazione è emerso che per quanto riguarda gli SCFA, in ciascun gruppo esaminato vi è una correlazione diretta tra Metabolismo Basale (MB) ed SFCA totali.

Negli AN vi è correlazione diretta tra i lipidi della dieta e l'acido Acetico, Propionico e Butirrico; nei SIC è emersa correlazione tra gli A.Grassi monoinsaturi della dieta e l'Acido Butirrico fecale; negli OB vi è correlazione inversa tra i Lipidi totali e l'A.Butirrico ; negli AN vi è correlazione inversa tra le fibre solubili e gli SCFA totali. La glicemia negli Obesi è invece inversamente correlata sia agli SCFA totali che all'Acido Propionico. Non c'è correlazione tra la colesterolemia e gli SCFA fecali.

Per quanto riguarda la steatosi epatica è emerso che nei pazienti con SIC vi è correlazione diretta con il valore della

PCR e con l'IGF1. Negli AN vi è correlazione diretta con la grelina, mentre negli obesi con l'NPY e negli operati di S.G. con la leptina. Dall'analisi dell'inchiesta alimentare è emerso che negli AN vi è correlazione inversa tra gli Ac. Grassi polinsaturi della dieta, le calorie ingerite, i glicidi e la steatosi epatica.

Il valore molto basso di GLP1 negli S.G. sembrerebbe in contrasto con la letteratura, ma in realtà può essere spiegato dal fatto che si tratta della determinazione a digiuno e non dopo il pasto; inoltre i pazienti hanno subito la S.G. almeno da un anno e tale valore conferma i dati di letteratura sulla incapacità della Sleeve Gastrectomy rispetto al by-pass gastrico di controllare in maniera stabile il diabete tipo II .

## **Cap.6 Discussione**

Dai risultati emergono differenze sostanziali nei parametri metabolici valutati nei differenti gruppi di pazienti in studio, sia tra loro, che nei confronti del gruppo di controllo. Alcune differenze sono prevedibili e rappresentano una conferma di quanto già noto dagli studi fisiopatologici, altre differenze richiedono una spiegazione più articolata, altre ancora

necessitano di ulteriori conferme con studi su più ampia scala o validati con test funzionali.

I valori ridotti di glicemia negli AN si spiegano fondamentalmente con il ridotto apporto calorico globale e soprattutto con la ridotta quota di carboidrati assunti che emerge sia dalle inchieste che dai diari alimentari. La differenza nei valori di glicemia risulta significativa solo nel confronto tra AN e OB e tra AN e controlli normopeso, non rispetto a SIC e SG, in quanto questi ultimi due gruppi hanno rispettivamente un ridotto assorbimento (SIC) ed un ridotto apporto (SG) di carboidrati.

Per quanto riguarda l'albuminemia, anche qui la differenza significativa nei valori tra AN ed OB si spiega con il differente apporto dietetico. La colesterolemia, significativamente più bassa nei SIC e negli AN rispetto agli altri tre gruppi (OB, SG, controlli), si spiega considerando la colesterolemia come indice nutrizionale, in quanto espressione della sintesi epatica, influenzata, ancora una volta, dal ridotto assorbimento nei SIC e dal ridotto apporto negli AN, fattori che contribuiscono a rendere queste popolazioni, a maggiore rischio di malnutrizione. Il più basso valore di HDL colesterolo nei SIC rispetto agli AN e agli SG,

si può spiegare nel primo caso con l'attività fisica compulsiva di alcuni AN e soprattutto con il fatto che i pazienti SIC hanno in genere un maggiore rischio cardiovascolare; bisogna infatti ricordare che una delle maggiori cause di SIC è appunto una patologia vascolare su base aterosclerotica, autoimmune, genetica, etc. ). Il colesterolo HDL risulta ovviamente inferiore nei pazienti OB rispetto agli AN, anche in questo caso, perché gli AN si muovono certamente di più rispetto agli obesi, ma anche perché essi hanno un ridotto apporto di colesterolo con la dieta. Il valore di HDL colesterolo più basso negli SG, si spiega invece con un ridotto apporto globale di nutrienti, secondario alle ridotte dimensioni della tasca gastrica. L'elevata insulinemia negli OB rispetto a tutti gli altri gruppi si spiega con l'insulinoresistenza caratteristica del paziente obeso, indotta dall'eccesso di grasso viscerale. I valori di emoglobinemia significativamente più bassi negli AN e nei SIC rispetto agli OB, si spiegano per la carenza di nutrienti e vitamine tipica di questi due gruppi, nel primo caso per ridotto apporto con la dieta, nel secondo caso per malassorbimento. La conta linfocitaria è espressione, oltre che di validità delle difese immunitarie, anche dello stato nutrizionale, pertanto, come

atteso, negli AN la conta linfocitaria risulta significativamente inferiore rispetto agli OB. La colinesterasi, (266) che negli ultimi anni è stata ampiamente rivalutata come indicatore dello stato nutrizionale e correla fortemente con gli indicatori di sindrome metabolica (iperinsulinemia, indice HOMA, ipertrigliceridemia, ipertensione), risulta significativamente più alta negli OB. Così pure la fibrinogenemia negli OB è maggiore, per lo stato di infiammazione cronica di basso grado, presente in tali soggetti. Riguardo alle transaminasi AST ed ALT, esse sono significativamente più alte negli AN per lo stato di cronica citolisi epatica indotta dalla malnutrizione. La ALP risulta significativamente aumentata nei pazienti con SIC a causa della colestasi indotta dalla nutrizione parenterale di cui tali pazienti necessitano; la colestasi è soprattutto legata alla composizione della miscela lipidica somministrata per via parenterale ed era certamente più frequente in passato, quando venivano somministrati per via parenterale, esclusivamente acidi grassi a catena lunga (LCT) derivati dalla soia. Attualmente, con la disponibilità in commercio di miscele lipidiche con LCT ed MCT (trigliceridi a catena media) e/o con acidi grassi omega 3, con rapporti e

composizione che si avvicinano il più possibile a quelli di una dieta sana, il rischio colestasi è più contenuto. Altri fattori che influenzano il rischio di colestasi nei pazienti con SIC in Nutrizione Parenterale sono l'alterato circolo enteroepatico dei sali biliari (a causa delle resezioni intestinali subite che quasi sempre interessano le ultime anse ileali, la valvola ileocecale ed il colon destro), e la carenza di colina.

Come atteso, il peso corporeo e l'IMC è differente tra i vari gruppi e così pure il MB che risulta strettamente correlato ad esso.

La leptina, adipochina prodotta principalmente dal tessuto adiposo, è espressione dell'entità della massa grassa e nel nostro studio risulta, ovviamente, marcatamente e significativamente elevata negli OB e nei pazienti con SG. Anche se negli SG l'intervento chirurgico ha contribuito al massiccio calo ponderale, il tessuto adiposo residuo è ancora abbondantemente rappresentato, così che la leptina risulta ancora significativamente superiore a quella degli AN, dei SIC e dei CNP. La riduzione di leptina negli SG, rispetto ai valori degli OB, proprio in seguito all'intervento di chirurgia bariatrica ricevuto, è stata prevalentemente studiata in

pazienti operati di by-pass gastrico, nei quali però essa correla con il calo ponderale e risulta, a parità di peso corporeo, equivalente ai valori di leptina dei soggetti dimagriti con terapia dietetica associata ad esercizio fisico (153), indicando che più che l'intervento di chirurgia bariatrica, sono l'entità del calo ponderale ed il tessuto adiposo residuo ad influenzare direttamente la concentrazione ematica di leptina. Per quanto riguarda la Sleeve Gastrectomy, pochi sono i lavori scientifici che hanno valutato i livelli di leptinemia, nonostante essa interferisca direttamente o indirettamente nel controllo dell'appetito a livello ipotalamico. Come emerge dai nostri risultati, il livello di leptina negli AN correla con la scarsa o assente rappresentazione del tessuto adiposo, funzionando dunque da sensore di mancanza di energia che induce, come tentativo di risposta adattativa, la riduzione del dispendio energetico e la soppressione della capacità riproduttiva (154).

Nel nostro studio i valori di grelina a digiuno risultano, come descritto in letteratura, significativamente elevati negli AN rispetto agli operati di SG. I livelli di grelina, ormone oressizzante prodotto principalmente da cellule del fondo gastrico, fisiologicamente presentano un picco subito prima

del pasto e si riducono dopo il pasto; presentano valori più elevati nei soggetti magri e più bassi negli obesi (162). Il nostro studio conferma questo dato: infatti il livello di grelina a digiuno dei magri è del 30% superiore a quello degli OB (per i quali tuttavia i livelli post-prandiali restano elevati, contribuendo al ridotto senso di sazietà). Il valore elevato di grelina a digiuno negli AN (di circa il 10% superiore a quello dei C.N.P.), concorda con i dati presenti in letteratura. Tuttavia, visto che negli AN, nonostante gli elevati livelli di grelina, non si assiste all'effetto oressizzante di essa, tale aumento viene inteso come tentativo infruttuoso dell'organismo di aumentare la fame ed il metabolismo energetico (172) e si ipotizza negli AN una sorta di grelinoresistenza (173). Inoltre negli AN la grelina correla in maniera diretta con l'epatosteatosi e ciò si può spiegare dal momento che più elevati sono i livelli di grelina, più grave è la malnutrizione, pertanto più carente sarà la sintesi epatica di lipoproteine, che normalmente consente di esportare i lipidi dal fegato. Mentre in caso di calo ponderale ottenuto con la dieta, i valori di grelina aumentano, nei pazienti operati di SG, questi si riducono notevolmente, a causa del fatto che in tale procedura si asporta la maggior parte del

fondo gastrico, sede principale della produzione di grelina. Nei nostri pazienti operati di SG, i valori a digiuno di grelina restano bassissimi (65% inferiori rispetto agli AN e 60% circa rispetto ai CNP), confermando che ad un anno almeno dall'intervento di SG, persiste una importante e duratura soppressione della grelina. Ciò contribuisce sicuramente al mantenimento del peso negli operati (177).

Per quanto riguarda il GLP1, i valori più bassi sono stati trovati negli SG, quelli più elevati nei SIC e negli AN, anche se non si osservano valori statisticamente significativi. Il valore molto basso di GLP1 negli SG sembrerebbe in contrasto con la letteratura, ma in realtà può essere spiegato dal fatto che si tratta di una determinazione a digiuno e non dopo pasto; inoltre, avendo i pazienti subito l'intervento di SG da almeno un anno, tale valore conferma i dati di letteratura sulla incapacità della Sleeve Gastrectomy rispetto al by-pass gastrico (177) (in cui i valori di GLP1 si mantengono elevati anche a distanza di un anno) di controllare il diabete tipo II in maniera duratura. Negli OB i nostri dati confermano una riduzione del GLP1. Il GLP1, elevato negli AN è in contrasto con gli studi di Tomasik, ma in accordo con uno studio di Germain del 2007, che mostra

livelli di GLP1 negli Anoressici più elevati rispetto ai magri costituzionali. Non vi sono differenze statisticamente significative nei valori di CCK nei vari gruppi in studio, tuttavia i valori di CCK nei vari gruppi correlano con quelli del GLP1, di cui la CCK rappresenta un fattore di stimolo. Come nello studio di Peterly, i nostri dati di CCK non variano in seguito a SG, rispetto a quelli degli OB (177).

I valori di PYY sono sostanzialmente uguali in ciascun gruppo.

I bassi valori di IGF-1 negli Anoressici concordano con quelli della letteratura . Infatti la bassa produzione epatica di IGF1 negli Anoressici è considerata valido marcatore di malnutrizione. I valori dei due gruppi di pazienti altrettanto tendenti alla malnutrizione anche se per cause differenti, malassorbimento nei SIC e forte restrizione calorica negli SG, risultano parimenti molto bassi rispetto agli due gruppi : OB e CNP, anche se tale differenza non è statisticamente significativa. E' da notare che, anche se in maniera non significativa, IL6 e TNF alfa risultano notevolmente elevati nei pazienti con SIC, dato lo stato di flogosi cronica presente in questi soggetti.

Contrariamente a quanto atteso, non si osservano valori particolarmente elevati negli OB che pure hanno, per altri motivi, uno stato di infiammazione cronica di basso grado.

Per quanto riguarda gli SCFA fecali, come emerge dalla rappresentazione grafica, in ciascun gruppo, sussiste una correlazione tra presenza nelle feci e quantità assunta con la dieta, sia per quanto riguarda la quantità totale che per i singoli SCFA. Gli acidi grassi fecali correlano inoltre con il MB in ciascun gruppo. La distribuzione dei tre principali SCFA fecali è conservata in ciascun gruppo, con una prevalenza dell'Ac. Acetico, seguito dall'Ac. Propionico e infine dall'Ac. butirrico. Negli AN l'Ac. Butirrico ed l'Ac. Propionico sono significativamente più bassi rispetto agli altri gruppi studiati, in relazione allo scarso o nullo apporto dietetico di lipidi, come emerge anche dall'analisi dell'inchiesta alimentare. A conferma di ciò, si osserva negli OB una correlazione inversa tra i lipidi totali della dieta e Ac. Butirrico. Dalla letteratura (268) , emerge che l'apporto dietetico in lipidi è in grado di condizionare la produzione di SCFA fecali da parte della flora batterica intestinale. In tale studio la dieta ricca in grassi, prevalentemente saturi quale è quella degli OB, modifica il microbiota intestinale, riducendo

la varietà di batteri ed aumenta l'escrezione fecale di SCFA, probabilmente allo scopo di attuare un meccanismo compensatorio che elimini l'eccesso di energia assunto con la dieta. Inoltre la dieta ricca in grassi saturi, favorisce non solo una minore sintesi di Ac. Butirrico, che ha effetto protettivo nei confronti dell'epitelio intestinale, ma anche il passaggio di LPS batterico attraverso la barriera intestinale verso il sangue portale, perché l'Ac. Butirrico stimola la produzione di proteine delle tight junctions. L'Ac. Acetico nelle feci, per quanto presente in quantità inferiore negli AN, non mostra differenze statisticamente significative con gli altri gruppi. I nostri risultati sono in accordo con recenti studi che hanno evidenziato che gli SCFA nelle feci sono maggiori negli obesi rispetto agli individui magri, nonostante negli obesi vi sia una minore quantità di batteri intestinali appartenenti a ceppi saccarolitici (43). Anche Schwartz (115) ha riportato una maggiore concentrazione di SCFA nelle feci degli obesi rispetto ai magri, e ciò viene interpretato sia come ridotto assorbimento intestinale, sia come possibile presenza di ceppi batterici che hanno bassa efficienza nell'utilizzare gli SCFA come fonte di energia. La correlazione inversa da noi riscontrata tra fibre solubili ed SCFA totali fecali negli AN si

può spiegare, secondo Armougom, con lo sviluppo di particolari ceppi nel microbiota intestinale degli AN (come il *Faecalibacterium Prautzii*), che fermentano con maggiore efficienza le fibre solubili della dieta, con produzione di SCFA (112). Negli AN, inoltre, verrebbe promosso un maggior assorbimento degli SCFA fecali, al fine di compensare lo scarso apporto calorico della dieta, cosa che determinerebbe una minore concentrazione finale di SCFA nelle feci, perché appunto assorbiti nel sangue portale. Il riscontro negli OB di valori di glicemia inversamente correlati agli SCFA totali fecali ed in particolare all'Ac. Propionico, può essere spiegato dal fatto che quest'ultimo è substrato chiave della neoglucogenesi, mentre è un forte inibitore della sintesi epatica del colesterolo e degli acidi grassi (267). Dal nostro studio emerge la presenza di epatosteatosi, oltre che negli OB e negli SG come atteso, anche nei SIC, negli AN e nei CNP; in particolare nei SIC la steatosi si spiega con diversi meccanismi correlati sia alla composizione quantitativa e qualitativa dei lipidi utilizzati nella miscela nutrizionale somministrata per via parenterale, sia alla quantità ed alla velocità di somministrazione dei glicidi della miscela, sia alla carenza di colina che riduce il

trasporto degli Acidi grassi attraverso la membrana mitocondriale interna per la loro ossidazione ( 248). Negli AN , la causa principale di epatosteatosi è la carenza di aminoacidi assunti con la dieta che impediscono la sintesi delle lipoproteine da parte del fegato, per cui i lipidi non possono essere esportati in periferia, sia l'eccesso di Ac. grassi liberi provenienti dalla lipolisi periferica. La prevalenza globale di steatosi negli OB e negli SG è pressochè identica, tuttavia la gravità di essa è differente, in quanto negli OB prevale la steatosi moderata e grave, mentre negli SG quella lieve. Pertanto possiamo dedurre che l'intervento di chirurgia bariatrica risulta vantaggioso in quanto è in grado di modificare la gravità di una preesistente epatosteatosi .

## **Capitolo 7 Conclusioni**

Nel nostro studio, per la prima volta in letteratura, sono stati messi a confronto 4 gruppi di pazienti, profondamente differenti per l'assetto metabolico-nutrizionale, le condizioni cliniche e la storia della patologia. Oltre a quanto già clinicamente evidente ed ipotizzabile, nei quattro gruppi di

pazienti e nel gruppo controllo, sono emerse sostanziali differenze in alcuni parametri biochimici nei dosaggi ematici di alcuni enterormoni e citochine e negli acidi grassi fecali a catena corta (SCFA), confermando ipotesi di lavoro già note e fornendo informazioni utili per nuove ipotesi da validare. Dall'analisi dei dati è stato possibile identificare caratteri distintivi per ciascun gruppo in esame, partendo dal presupposto che ciascun paziente è stato studiato in una fase di equilibrio metabolico, e cioè solo se ai precedenti controlli ambulatoriali si era registrata stabilità del peso corporeo e dei principali parametri ematobiochimici e clinici. Tutto ciò al fine di limitare l'influenza di variazioni recenti della dieta e del peso sul metabolismo. I 17 pazienti obesi (OB), di età media 37 anni, si caratterizzano, oltre che per peso, IMC e MB molto elevati, anche per glicemia, colesterolemia, trigliceridemia ed insulinemia significativamente elevati soprattutto nel confronto con gli AN e con i SIC. Il valori di fibrinogeno, PCR e colinesterasi sono i più elevati rispetto a ciascun altro gruppo e ciò si inquadra nel maggior rischio di comorbidità presentato dagli obesi. Per quanto riguarda gli enterormoni e la adipocitokine, la leptina è significativamente elevata (essendo espressione diretta della

massa grassa), come pure l'IGF1, mentre la grelina ha un valore intermedio ed il GLP1 presenta valori molto bassi. La gascromatografia delle feci ha evidenziato livelli di SCFA fecali nettamente maggiori, sia globalmente che per ciascun acido grasso studiato (acetico, butirrico e propionico) rispetto agli altri gruppi esaminati; inoltre, negli OB la quantità di SCFA prodotti correla in maniera diretta con i valori del M.B. mentre vi è correlazione inversa tra i lipidi totali della dieta e l'acido butirrico prodotto.

L'inchiesta alimentare mostra il maggior introito calorico, ma anche di carboidrati, proteine e lipidi rispettivamente in confronto a tutti gli altri gruppi, con una preferenza nella scelta degli alimenti per i carboidrati, che costituiscono il 62% dell'introito calorico giornaliero. Un ulteriore aspetto caratterizzante il gruppo degli OB è la forte presenza di epatosteatosi (46%), rappresentata per il 10% (2 pazienti) da steatosi lieve, per il 30% (6 pazienti) da steatosi moderata e per il 6% (1 paziente) da steatosi grave. All'epatosteatosi in due pazienti si associa ipertransaminasemia.

I soggetti del gruppo SG sono stati scelti tra i pazienti operati di Sleeve Gastrectomy da almeno un anno, che avevano perso in media il 20% del loro peso pre-intervento (in media circa

30 kg) e che attualmente presentano un peso stabile. L'età media è simile a quella degli OB, 39anni, mentre il peso, l'IMC ed il MB, per quanto elevati, risultano significativamente differenti dagli OB e dai rimanenti gruppi. Dal punto di vista ematochimico si caratterizzano per indici biochimici nella norma. Degni di nota sono le HDL significativamente superiori rispetto a quelle degli OB e dei SIC; le transaminasi normali rispetto agli OB (transaminasi elevate) e gli indici di colestasi nella norma rispetto ai SIC; anche il fibrinogeno risulta significativamente più alto rispetto a quello degli AN. Per quanto riguarda gli enterormoni e le adipocitokine, la leptina pari al 50% del valore degli OB, è tuttavia ancora significativamente elevata rispetto a quella dei SIC, degli AN e dei CNP, essendo espressione di una massa grassa ancora ben rappresentata. La grelina presenta invece il valore più basso, con una differenza statisticamente significativa rispetto agli AN, dipendendo i bassi valori, dal tipo di intervento effettuato.

Il GLP1 in questi pazienti è risultato molto basso, in contrasto con i dati in letteratura (177) , ma ciò può dipendere dal minor tempo di osservazione che caratterizza gli altri studi effettuati e dal fatto che il nostro studio ha previsto il

prelievo a digiuno e non dopo stimolo (pasto). Pertanto potrà essere interessante integrare i dati con studi funzionali. Non vi sono differenze significative per gli altri enteroormoni ed adipocitokine valutati. Il dosaggio degli SCFA fecali ha mostrato valori significativamente più elevati, sia in totale che per ciascun acido grasso, rispetto agli AN. Anche qui la quantità di SCFA fecali prodotti correla in maniera diretta con il metabolismo basale. Dall'esame degli introiti alimentari si evince che la quantità di glicidi assunti (53% delle calorie totali) è inferiore in maniera significativa rispetto agli OB ed ai CNP, mentre la quota calorica giornaliera viene raggiunta attraverso un aumentato apporto di lipidi (25% delle calorie totali), soprattutto acidi grassi monoinsaturi, significativamente più elevati. Nonostante il calo ponderale importante, successivo all'intervento chirurgico è presente steatosi epatica nel 45% dei pazienti. Tuttavia, gli S.G. differiscono dagli OB per l'assenza di steatosi grave, per la presenza di soli 2 pazienti (10%) con steatosi moderata mentre la maggior parte dei soggetti di questo gruppo affetti da epatosteatosi, 7 pazienti (35%), mostra steatosi lieve e comunque non complicata da ipertransaminasemia. Ciò dimostra che l'intervento di

chirurgia bariatrica ed il calo ponderale risultano efficaci nel migliorare l'entità dell'epatosteatosi. In questo gruppo di pazienti i valori di leptina correlano in maniera diretta con la steatosi epatica.

I pazienti AN sono stati reclutati tra quelli afferenti all'Ambulatorio dei Disturbi del comportamento alimentare, non in fase di rialimentazione ed a peso stabile da alcuni mesi. Tale gruppo, per le caratteristiche stesse della malattia, è costituito da soggetti di età inferiore (età media 22 anni) rispetto agli altri 3 gruppi ed ai controlli normopeso e prevalentemente di sesso femminile (17 F e 3 M). Gli AN mostrano peso (in media kg 32), IMC (in media 14 kg/mq) e MB (in media 904 kcal) significativamente più bassi rispetto agli altri gruppi. La presenza di grave malnutrizione si evidenzia attraverso valori significativamente bassi di albuminemia, glicemia, colesterolemia, trigliceridemia, emoglobina e linfociti. Anche l'insulinemia è molto bassa, mentre le HDL risultano elevate rispetto agli altri gruppi di pazienti, probabilmente per l'esasperata attività fisica praticata da questi soggetti a scopo compensatorio. I valori di leptina sono bassissimi e riflettono la totale assenza di massa grassa in tali pazienti e la necessità dell'organismo di

bloccare l'attività riproduttiva. Invece i livelli di grelina sono significativamente più elevati che negli altri gruppi, nel vano tentativo dell'organismo di stimolare l'introito calorico. Gli AN presentano valori di IGF1 bassissimi, in accordo con il ruolo di marcatore della malnutrizione calorico-proteica recentemente identificato in questo metabolita. Gli SCFA fecali sono i più bassi riscontrati nel nostro studio; in particolare il butirrato è significativamente più basso negli AN rispetto agli OB ed S.G. Anche in questo gruppo la quantità di SCFA totali correla con il M.B. e quindi con l'introito calorico e con la quantità di lipidi assunti con la dieta.

La validità dell'inchiesta e del diario alimentare in questi pazienti è inficiata da una sovrastima (volontaria o involontaria) della quantità di nutrienti assunta. Infatti, per quanto gli introiti degli AN siano di gran lunga inferiori a quelli dei rimanenti gruppi (soprattutto per quanto riguarda l'apporto lipidico), tuttavia il computo delle calorie riferite come assunte quotidianamente è nettamente superiore alla realtà. Risulta pertanto più affidabile e caratterizzante in questo senso la misurazione del MB, che è direttamente correlato al reale introito calorico. Negli AN troviamo un

10% di steatosi epatica (2 pazienti con epatosteatosi di grado lieve) che presenta una diretta correlazione con i livelli di grelina.

I 14 pazienti con SIC presentano un'età media (38 anni), comparabile con gli OB, gli SG ed i CNP e presentano peso, IMC e MB simili ai controlli normopeso. Sono soggetti in trattamento con nutrizione parenterale domiciliare, allo scopo di arginare la malnutrizione legata alla riduzione della superficie intestinale assorbente, per le resezioni intestinali subite. Sono stati esclusi i pazienti che mostravano segni di infezione e/o infiammazione in fase attiva relativa alla malattia di base. Nonostante gli indici antropometrici li accomunino ai CNP e siano stati scelti tra i pazienti con peso stabile nel tempo, il gruppo SIC mostra colesterolemia totale, colesterolemia-HDL, emoglobina ed insulinemia significativamente inferiori rispetto agli altri gruppi. E' evidente inoltre la presenza di uno stato infiammatorio cronico, anche se clinicamente silente, correlato alla malattia di base, come dimostrato dagli elevati valori di PCR e fibrinogeno e soprattutto dai valori di IL-6 (valore più alto tra i gruppi) e TNF $\alpha$  (valore 10 volte superiore a quello degli OB) riscontrati. L'integrazione nutrizionale con miscele

nutrizionali per via parenterale è invece alla base dell'aumento degli indici di colestasi, in particolare della  $\gamma$ GT.

Per quanto riguarda gli enterormoni e le adipocitokine, tali soggetti mostrano valori di leptina significativamente più bassi rispetto agli OB ed agli SG, a causa della scarsa presenza di grasso corporeo, nonostante l'integrazione nutrizionale. Dall'inchiesta alimentare si evince una aumentata assunzione di acidi grassi monoinsaturi, che correlano inoltre positivamente con la quantità di acido butirrico fecale prodotto. La percentuale di epatosteatosi presente nel gruppo dei SIC è del 21% (3 pazienti con steatosi lieve) ed in uno di questi pazienti è stato riscontrato aumento delle transaminasi. In tali pazienti, i livelli di PCR correlano positivamente con la steatosi epatica.

I controlli normopeso (CNP), sono 20 soggetti clinicamente sani, sovrapponibili per età media (38 anni) agli altri gruppi in studio (tranne che agli AN), con IMC medio di 22 kg/mq, e MB di 1442 kcal, cosa che consente di distinguerne lo stato di nutrizione da tutti gli altri gruppi (eccetto il gruppo SIC). I CNP presentano esami ematochimici nella norma (tranne che in un paziente in cui è stata riscontrata ipertransaminasemia

ed epatosteatosi), valori degli indici infiammatori e di IL-6 e TNF $\alpha$  significativamente più bassi. La leptina ha un valore intermedio tra i valori elevati degli OB e degli SG ed i valori bassissimi degli AN. La grelina è elevata, ma non in maniera significativa rispetto agli altri gruppi. Gli SCFA fecali correlano positivamente con il MB, ed è presente epatosteatosi nel 20% dei soggetti studiati (4 pazienti di cui 3 con steatosi lieve ed uno con steatosi moderata ed ipertransaminasemia). L'introito calorico dei CNP è significativamente maggiore rispetto agli AN, risultando maggiori anche le proteine, i lipidi e gli acidi grassi saturi. Invece i CNP assumono una quantità di fibre significativamente superiore ai soggetti sottoposti a SG.

Dall'analisi di ciascun gruppo studiato emerge che il differente stato di nutrizione, che è la caratteristica distintiva di ciascun gruppo, e che è legato alla differente alimentazione (cosa che si evince dallo studio delle abitudini e dei consumi alimentari), determina una differente composizione di SCFA nelle feci e con ogni probabilità è in grado di influenzare la composizione del microbiota intestinale, interferendo quindi con possibili fattori di rischio o di beneficio sulla salute umana. Lo studio degli enterormoni a digiuno ha

caratterizzato i differenti gruppi, ma ha messo in evidenza differenze statisticamente significative solo per la grelina e la leptina. Per questi ultimi e per gli altri enterormoni potrà essere utile approfondire la valutazione con lo studio della risposta post-prandiale, corredata da specifici questionari sulla sensazione di fame e sazietà. L'identificazione di uno specifico microbiota intestinale (in itinere), magari con caratteristiche peculiari per ciascuno dei gruppi in studio, potrà aiutare a mettere in correlazione tra loro i prodotti del metabolismo, differenti ceppi batterici, gli enterormoni secreti dall'organismo ospite e la presenza o meno di steatosi epatica, al fine di capire se sia possibile, attraverso una variazione della composizione della flora batterica intestinale, modificare anche il destino di alcune malattie metaboliche.

## Capitolo 8 Tabelle e Figure

### CARATTERISTICHE DEL CAMPIONE

	n	M	F
<b>SIC</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
<b>S.G.</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>13</b>
<b>AN</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>17</b>
<b>OBESI</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>7</b>
<b>Controlli normope so</b>	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>12</b>

	<b>Glicemia</b> mg/dl Med± SD	<b>Urea</b> mg/dl Med ± SD	<b>Creatinina</b> mg/dl Med ± SD	<b>Albumin.</b> g/l Med± SD	<b>Bil.T</b> mg/dl Med ± SD	<b>Colest.T</b> mg/dl Med ± SD	<b>Trigl.</b> mg/dl Med ± SD	<b>HDLcol.</b> mg/dl Med ± SD
<b>SIC</b>	80 ± 15	28 ±9	0.8 ±0,2	4.4 ±0.4	0.6 ±0.2	147 ±28	116 ±68	46 ±9
<b>S.G.</b>	78 ± 8	30 ±9	0.7 ±0,1	4.6 ±0.2	0.6 ±0.2	194 ±35	86 ±29	62 ±11
<b>AN</b>	66 ± 8	33 ±8	0.7 ±0,1	4.8 ±0.4	0.5 ±0.3	164 ±35	66 ±26	63 ±18
<b>OB</b>	98 ± 40	21 ±6	0.8 ±0,3	4.4 ±0.2	0.4 ± 0.2	200 ±26	148 ±79	46 ± 13
<b>C.N.P.</b>	90 ± 32	29 ±10	0.7 ±0,1	4.6 ±0.4	0.4 ±0.2	192 ±43	117 ±119	56 ±17

Tab. 2a Esami ematochimici ( media ± SD) in ciascun gruppo

	<b>AST</b> U/L Med± SD	<b>ALT</b> U/L Med ± SD	<b>ALP</b> U/L Med ± SD	<b>γGT</b> U/L Med± SD	<b>AMILASI</b> U/L Med ± SD	<b>INSULIN.</b> μU/ml Med ± SD	<b>Colinest</b> U/L Med ± SD	<b>CK</b> U/L Med ± SD
<b>SIC</b>	25 ±12	27 ±17	96 ±61	45 ±90	69 ±30	2,3 ±0,7	7070 ±2693	67± 28
<b>S.G.</b>	17 ±4	15 ± 5	66 ±16	20 ±20	64 ±14	7,3 ±3,7	7446 ±1674	87± 26
<b>AN</b>	31 ±12	47 ±42	62 ±29	18 ±9	97 ±64	5,1 ±8,4	6705 ±3277	96± 47
<b>OB</b>	23 ±10	34 ±18	71 ±13	33 ±19	44 ±15	23,3±20,3	10277 ±1877	157± 84
<b>C.N.P.</b>	25 ±26	25 ±30	58 ±23	14 ±10	60 ±25	8,1 ±7,1	8108 ±1361	87±60

Tab. 2b Esami ematochimici ( media ± SD) in ciascun gruppo

	<b>Ferritina</b> ng/ml Med± SD	<b>PCR</b> Mg/dl Med ± SD	<b>Fibrinog</b> mg/dl Med ± SD	<b>Hb</b> g/dl Med± SD	<b>Hct</b> % Med ± SD	<b>Linfoc.</b> ×ml Med ± SD
<b>SIC</b>	117 ±159	0,8 ±0,9	354 ±80	12,5 ±2,4	45 ±6	1805 ±638
<b>S.G.</b>	108 ±86	0,5 ±0,5	346 ±81	13,1 ±1,5	20 ±4	1997 ±525
<b>AN</b>	153 ±168	0,3 ±0,0	260 ±71	12,3 ±1,4	18 ±4	1577 ±678
<b>OB</b>	136 ±121	0,8 ±0,8	390 ±72	14,2 ±0,8	33 ±3	2418 ±639
<b>C.N.P.</b>	96 ±122	0,3 ±0,4	277 ±56	13,2 ±1,1	14 ±3	2092 ±697

Tab. 2c Esami ematochimici ( media ± SD) in ciascun gruppo

	età	Peso kg	IMC Kg/mq	MB kcal	QR	RES ohm	XC Ohm
<b>SIC</b>	38 ±17	61 ±19	20 ±3	1267 ±449	0,9 ±0,07	622 ±102	73 ±17
<b>S.G.</b>	39 ±9	97 ±27	36 ±8	1820 ±353	0,8 ±0,04	451 ±85	54 ±9
<b>AN</b>	22 ±4	32 ±7	14 ±1	904 ±153	0,9 ±0,06	677 ±90	63 ± 14
<b>OB</b>	37 ±11	129 ±23	45 ±7	2200 ±264	0,8 ±0,09	366 ±41	40 ±10
<b>C.N.P.</b>	38 ±14	59 ±8	22 ±3	1442 ±210	0,8 ±0,07	585 ±138	65 ±16

Tab.3 Caratteristiche antropometriche

Analita			MEDIA	SIGNIFICATIVITA'	
LEPTINA	AN	20	1.05 ng/ml ± 4,4	.000	Vs. s.g. e ob
	SIC	14	5.5 ± 7,7	.000	Vs. S.G. e obesi
	S.G.	20	16.1 ± 11,7	.000 - .010	Vs. tutti
	OBESI	17	27.1 ± 6,5	.000 - .010	Vs. tutti
	CONTROLLI	20	7.5 ± 5,3	.041 - .000	Vs. S.G. e obesi
GRELINA	AN	20	849 pg/ml ± 913	NS	Vs S.G.
	SIC	14	562 ± 913	.005	
	S.G.	20	318 ± 199	.005	Vs. AN
	OBESI	17	554 ± 328	NS	
	CONTROLLI	20	753 ± 769	NS	

□  
**Tab.4 Leptina e grelina**

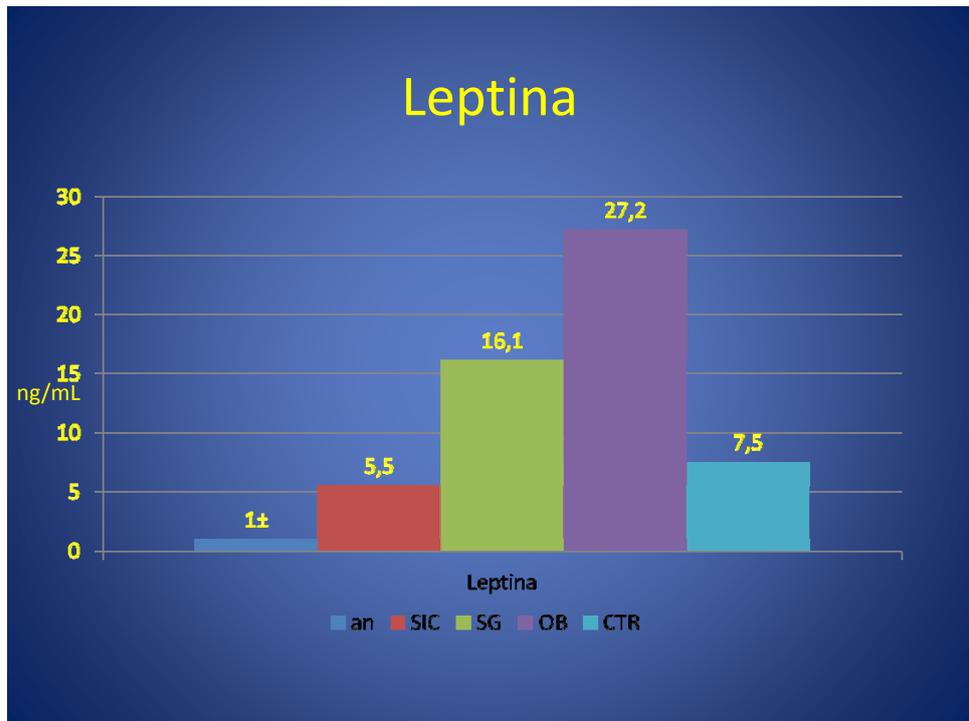


Fig.6 Leptina

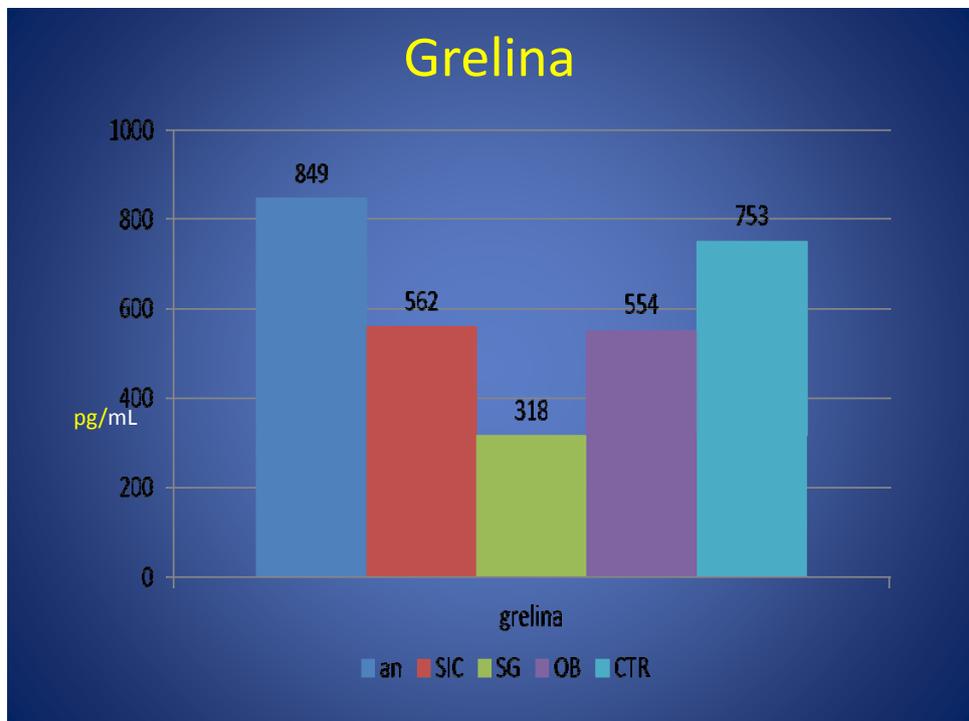


Fig.7 Grelina

	GLP1	CCK	IGF1	IL6	TNF $\alpha$	NPY
	Pg/ml	Pg/ml	Ng/ml	Ng/ml	Pg/ml	Pg/ml
	m SD	m SD	m SD	m SD	m SD	m SD
SIC	90 $\pm$ 209	53 $\pm$ 39	39 $\pm$ 43	37 $\pm$ 80	228 $\pm$ 487	15 $\pm$ 8
S.G.	23 $\pm$ 19	37 $\pm$ 20	25 $\pm$ 18	13 $\pm$ 24	52 $\pm$ 115	15 $\pm$ 10
AN	77 $\pm$ 107	41 $\pm$ 18	18 $\pm$ 39	13 $\pm$ 13	65 $\pm$ 165	11 $\pm$ 7
OB	41 $\pm$ 57	47 $\pm$ 34	43 $\pm$ 57	12 $\pm$ 15	18 $\pm$ 33	13 $\pm$ 10
CNP	59 $\pm$ 46	28 $\pm$ 24	53 $\pm$ 78	9 $\pm$ 27	46 $\pm$ 154	16 $\pm$ 11

Tab.4 Enteroormoni ed adipokine (GLP1, CCK, IGF1, IL6, TNF $\alpha$ , NPY)

**Tab. 5 Concentrazione media ( $\pm$ ds) Acidi Grassi a Catena Corta**

<b>Gruppo</b>	<b>Butirrato</b>	<b>Propionato</b>	<b>Acetato</b>	<b>SCFA totali</b>
<b>AN</b>	<b>0.9 <math>\pm</math> 0.9</b>	<b>2.0 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>6.9 <math>\pm</math> 5.5</b>	<b>9.8 <math>\pm</math> 3.2</b>
<b>S.I.C.</b>	<b>1.7 <math>\pm</math> 1.8</b>	<b>4.3 <math>\pm</math> 3.4</b>	<b>11.4 <math>\pm</math> 9.5</b>	<b>17.4 <math>\pm</math> 5.0</b>
<b>S.G.</b>	<b>3.1 <math>\pm</math> 2.5</b>	<b>4.3 <math>\pm</math> 3.0</b>	<b>12.6 <math>\pm</math> 7.2</b>	<b>20.0 <math>\pm</math> 5.2</b>
<b>Obesi</b>	<b>4.1 <math>\pm</math> 2.7</b>	<b>5.7 <math>\pm</math> 2.0</b>	<b>14.5 <math>\pm</math> 6.4</b>	<b>24.3 <math>\pm</math> 5.6</b>
<b>C.N.P.</b>	<b>2.4 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>3.9 <math>\pm</math> 2.2</b>	<b>11.0 <math>\pm</math> 4.5</b>	<b>17.3 <math>\pm</math> 4.6</b>

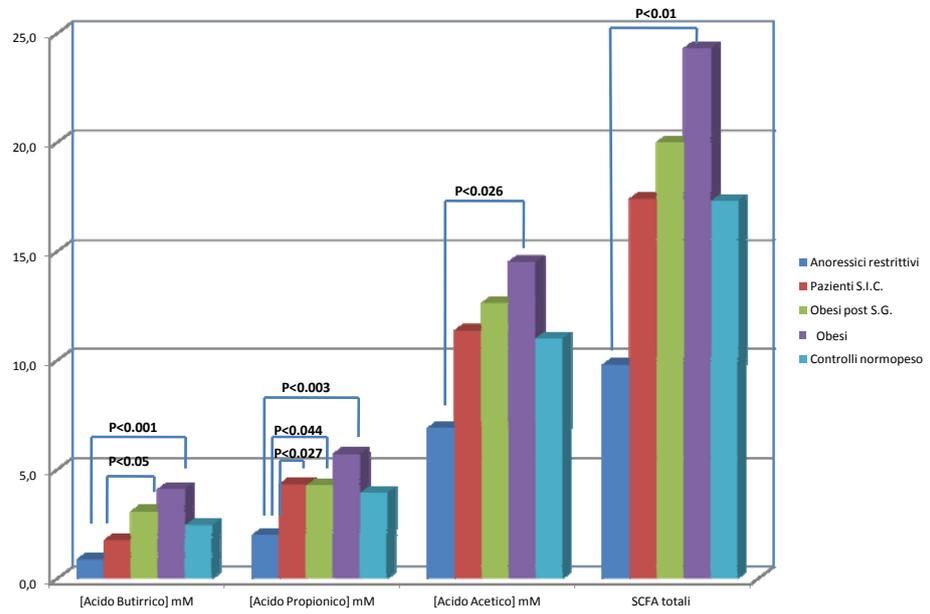


Fig.8 Acidi grassi a catena corta fecali

PAZIENTI	ASSENTE		LIEVE		MODERATA		GRAVE	
	n	%	n	%	n	%	n	%
SIC 14	12	79	2	21 1*	0		0	
S.G. 20	11	55	7	35	2	10	0	
AN 20	18	90 3*	2	10	0		0	
OBESI 17	11	55	2	10	6	29 2*	1	6
C.N.P. 20	16	80	3	12,5	1	6,5 1*	0	
Nessuna correlazione con SCFA totali								
Con * sono indicati i casi di ipertransaminasemia								

Tab.6 Prevalenza di Epatosteatosi

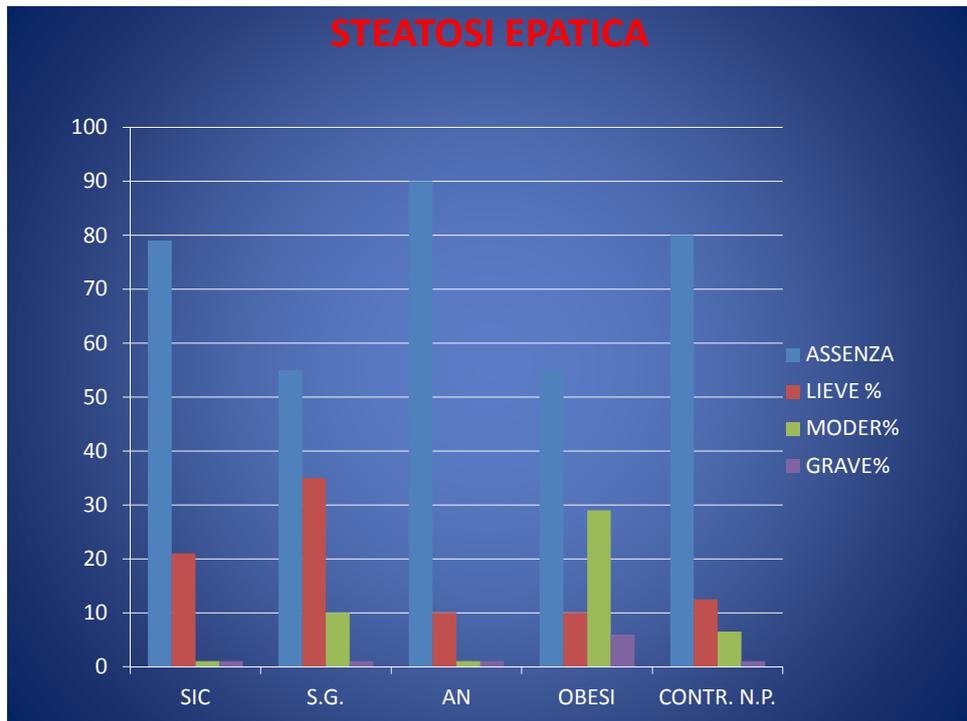


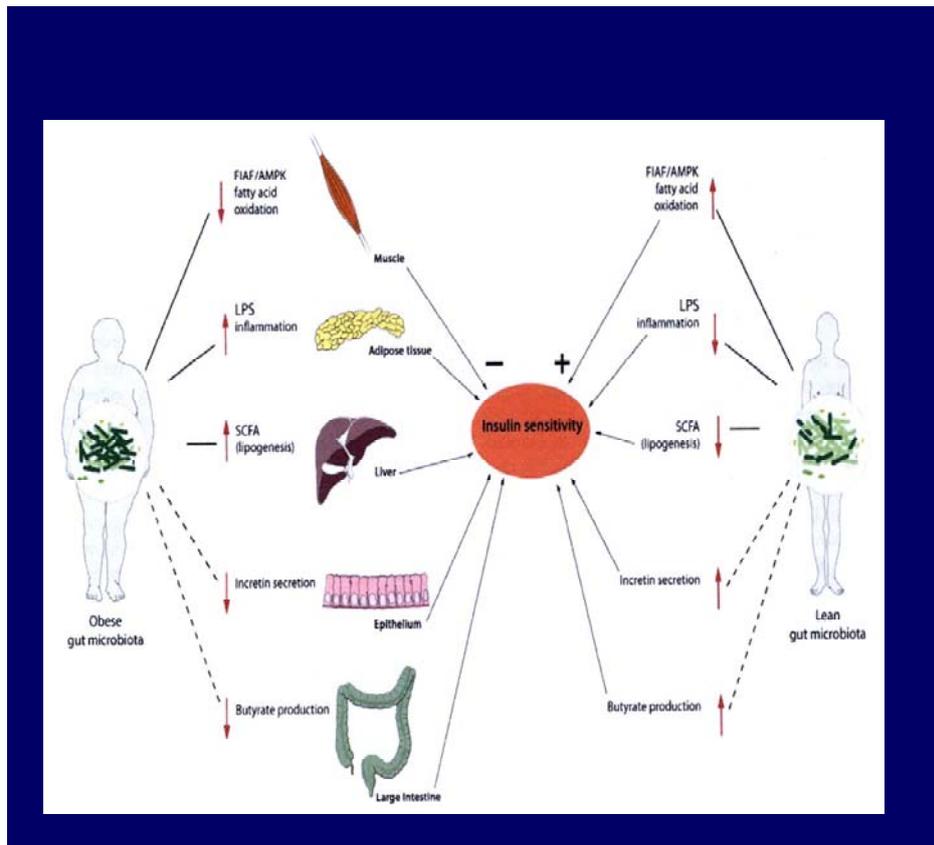
Fig.9 Grado di epatosteatosi nei gruppi esaminati

Tab. 7 INTROITO ALIMENTARE INCHIESTA

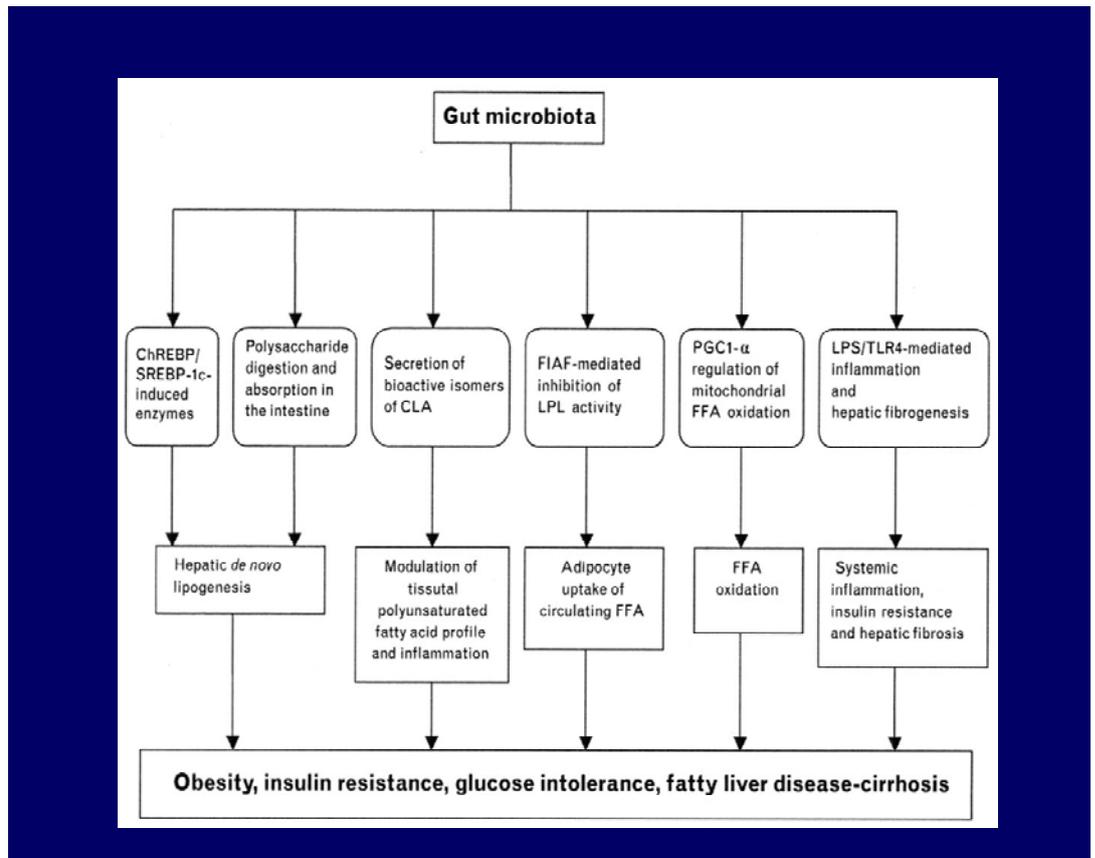
PAZIENTI	CALORIE	PROTEINE gr	LIPIDI gr	GLICIDI gr	FIBRA TOT gr
SIC	1912 ± 474	81 ± 19	65 ±13	254 ± 97	17 ± 4
S.G.	1652 756	69 23	82 71	170 80	14 8
AN	1375 381	66 18	47 22	181 42	20 5
OBESI	2256 815	105 35	75 26	291 109	24 11
CONTR.N.P.	2234 349	101 26	78 22	296 47	23 6
	A.G. SATURI gr	A.G.MONOIN gr	A.G.POLINS. gr	FIBRA INSOL. gr	FIBRA SOLUB.gr
SIC	16 ± 6	34 ± 10	6 ± 1	10 ± 4	5 ± 1,3
S.G.	21 11	47 54	8 6	8 6	3 1,8
AN	11 6	21 12	5 3	14 3	4 1,6
OBESI	21 11	35 13	9 4	14 8	5 3
CONTR.N.P.	26 10	36 10	8 2	12 4	4 1,5

Tab.8 Introito Alimentare Diario

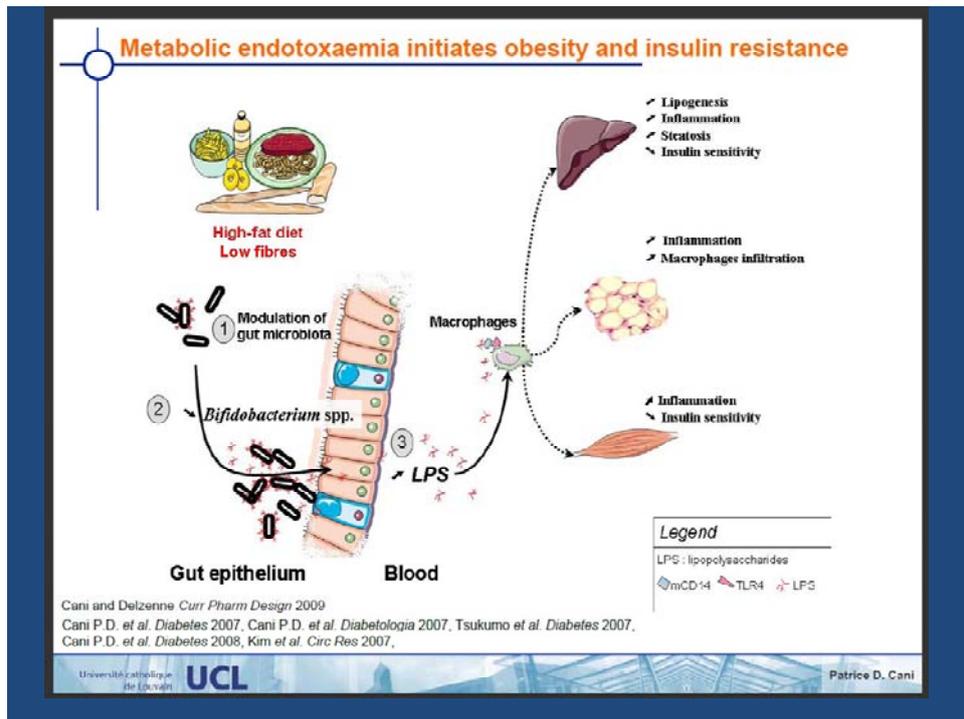
	Calorie	Proteine Gr	Lipidi gr	Glucidi Gr	Fibra tot.gr
SIC	1733±619	73±19	79±39	183±68	11±3
S.G.	1473±574	56±24	64±34	179±63	12±7
AN	1269±433	65±17	38±16	180±82	16±10
OB	1511±400	67±26	57±23	193±66	14±4
C.N.P.	1145±369	64±18	35±17	146±63	12±8
	A.G.Sat gr	A.G.pol Gr	A.G.mon gr	Fibra ins. gr.	Fibra sol.gr
SIC	19±10	6±3	39±18	5±2	2,8±1
S.G.	14±8	4±2	31±19	5,2±5	2,5±1
AN	7±4	3±0,8	13±7	7,5±5	2,8±1
OB	13±9	4±1	26±13	6,2±4	2,7±1
C.N.P.	9±6	3±1	16±8	5,7±4	2,8±2



**Fig. 1. Possibili interferenze tra microbiota intestinale e metabolismo ( da Vrieze A. )**

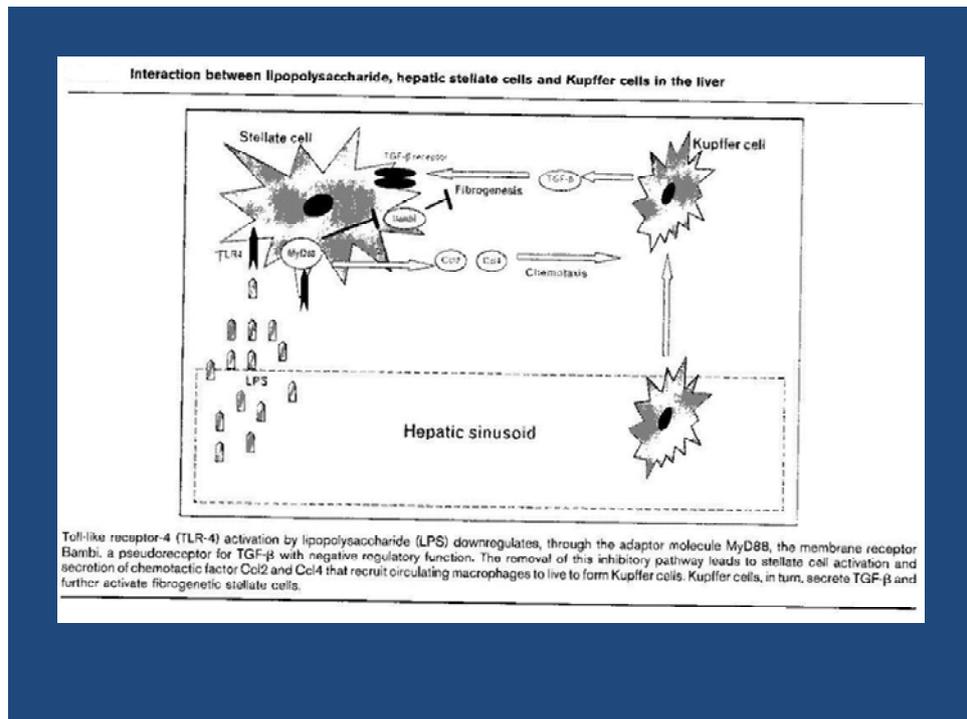


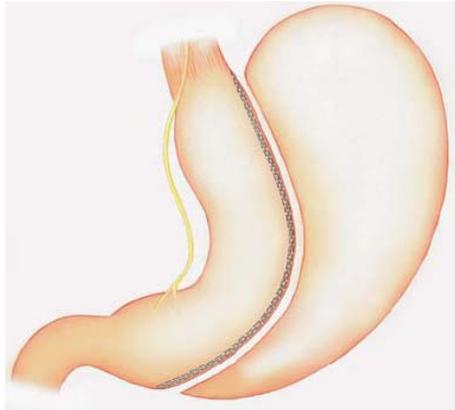
**Fig. 2 Gut microbiota e metabolismo (da G. Musso).**



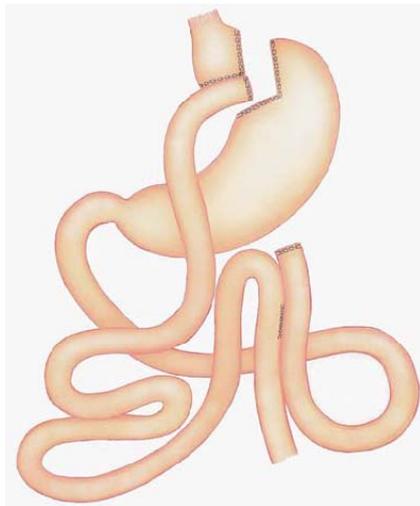
**Fig. 3 Microbiota e infiammazione (da Cani e Delzenne )**

**Fig 4 Ruolo dell'LPS Nella patogenesi della Epatosteatosi**





Sleeve Gastrectomy



By-pass Roux-en-y

Fig.5 Interventi bariatrici ( SG e By-pass gastrico)

## Capitolo 9 BIBLIOGRAFIA

1. Raoult D. Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8), 631-634 .
2. Holines E, Li JY, Athanasion T, Ash rafian H, Nicholson JK. Vnderstanding the mole of gut microbiorne-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol.* 2011;19(7), 349-359.
3. Sekirov 1, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Pbysiol. Rep.* 2010; 90(3), 859-904 .
4. Guamer F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *The Lancet* 2003; 361: 512-19.
5. Bengmark S. Pre-, pro- and synbiotics. *Curr Opin in Clin Nutr Metab Care* (2001), 4: 571-579.
6. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microhiol.* 1977;31:107-133.
7. Qin Li R, Raes .1, ci al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464:59-65
8. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005;307: 1915-1920
9. Palmer C, Bik EM, Digiulio 1313,Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 2007; 5(7), e177 .
- 10.Gronlund MM, Lehtonem OP, Eerola E, Kero P. Fecal

microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after caesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 19-25.

11.Armsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, et Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*2000; 30:61-7.

12.Enck P, Zimmermann K, Rusch K, Schwiertz A, Klosterhalfen S, Frick JS. The effects of maturation of the colonic microflora *Gastroenterol. Res. Prat.*2009; 75 :2401.

13.Agans R, Rigsbee I,, Kenche H. Michail S, Khamis I II, Paliy O. Distal microbiota of adolescent children is different from that of adults, *FEMS Microbiol. Ecol.*2011; 77(2), 404-412.

14. Torroni F, Formi E, Pizzi ( Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(6), 1534-1539 .

15. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J. Appl. Microbiol.* 102(5), 1178-1186 (2007).

16. Fallani M, Amarri S, Uusijarvi A et al. Determinants of the human infant intestinal microbiota after introduction of first complementary foods in five European centres. *Microbiology* 157(Pt 5),1385-1392 (2011).

17. De Filippo C, Cavalieri D, Di PM et al, Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and ritrai Africa. *Proc. Nati Acad. Sci.USA* 107(33), 14691-14696 (2010).

18. Arumugam M, Raes J, Pelletier E et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473(7346), 174-180 (2011).
19. Perry GH, Dominy NJ, Claw KG *et al.* Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat. Genet.* 39(10). 1256-1260 (2007).
20. Wong JM, de SR, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40: 235-243.
21. Chen W, Anderson D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1984;175:215-218.
22. Berggren AM, Nyman EM, Lundquist I, Bjorck IM. Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *Br. J Nutr* 1996;76:287-294.
23. Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells *in vitro*. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7: 165-172.
24. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 2000; 46: 507-514.
25. Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 1467-56.

26. Lefebvre P, Cariou B, Lien Kuipers, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009;89:147-191
27. Pierro A, van Saene HK, Donnell SC, *et al.* Microbial Translocation in neonates and infants receiving long-term parenteral nutrition. *Arch Surg* 1996; 131 : 176-179.
28. Bernet MF, Brassart D, Nesser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA I binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-489.
29. Hooper LV, Xu F, Falk PG, Midvedt T, Gordon JI. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9833-9838
29. Brook J. Bacterial interference: *Crit Rev Microbiol* 1999; 25: 155-172.
31. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, *et al.* Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000. 47: 646-652.
32. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 1998; 6: 13-18
33. Haverson K, Rehakova Z, Sinkora J, Sver L, Bailey M. Immune development in jejunal mucosa after colonization with selected commensal gut bacteria: A study in germ-free pigs. *Int J Immunol Immunopathol.* 2007;119:243-253.

34. Hapfeimeier S, Lawson MA, Slack E, et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science*. 2010;328:1705-1709.
35. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*. 2011;331:337-341.
36. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005;122:107-118.
37. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009;139:485-498.
38. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 2008;453:620-625.
39. Luhrs H, Gerke T, Muller JG, et al. Butyrate inhibits NLRP6 activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37:458-466.
40. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461:1282-1286.
41. Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 2001; 414: 555-558.

42. Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L V., Koh, G. Y., Nagy, A. et al. (2004). The gut I microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 15718-15723
43. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027-1031.
44. Ley, R. E., Backhecl, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 102, 11070-11075
45. Stappenbeck, T. S., Hooper, L V.. & Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of in testi nal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 99, 15451-15455.
46. Denechaud, P. D., Dentin, R., Girard, 1., & Postic, C. (2008). Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* 582, 68-73.
47. Fleissner, C. K., Huebel, N., bd El-Bary, M. M., Loh, G., Klaus, S., & Blaut, M. (2010). Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-included obesity. *Br. J. Nutr.*, 1-11.
48. Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 979-984.
49. Samuel, B. S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F. E., Backhed, F., Manchester, J. E., et ai. (2008). 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. USA* 105, 16767-16772.

50. Bjursell, M., Adrnyre, T., Goransson, M., Marley, A. E., Smith, D. M., Oscarsson, J., et al. (2011). Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2 (Ffar2) deficient mice fed a high fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 300, E211-E220.
51. Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.
52. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Mein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022-1023.
53. Cani, R. D., Dewever, C., & Delzenne, N. M. (2004). Inulin-type fructans modulate the gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br. J. Nutr.* 92, 521-526.
54. Cani, P. D., Datibioul, C. A., Reusens, B., Remacle, C., Catillon, G., & Delzenne, N. M. (2005). Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on the glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats. *J. Endocrinol.* 185, 457-465.
55. Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Maton, N., & Delzenne, N. M. (2005). Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes. Res.* 13, 1000-1007.
56. Cani, P. D., Joly, E., Horsmans, Y., & Delzenne, N. M. (2006). Oligofructose promotes satiety in healthy human: A pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 60, 567-572

57. Cani, P. D., Knauf, C., Iglesias, M. A., Drucker, D. J., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2006). Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes* 55, 1484-1490.
58. Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L, Rastall, R., Rowland, L. et al(2010). Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *J. Num.* 104, 51-563.
59. Cani, P. D., Lecourt, E., Dewull E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., et al.(2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response alter a meal, *Am. J. Che. Nutr.* 90, 1236-1243.
60. Parnell, J. A., & Reimer, R. A. (2009). Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1751-1759.
61. Peters, H. P., Boers, H. M., Haddeman, E., Melnikov, S. M., & Qvyjt, F. (2009). No effect of added beta-glucan or of fructooligosaccharide on appetite or energy intake. *AM. J. Chi. Nutr.* 89, 58-63.
62. Tarini, J., & Wolever, T. M. (2010). The fermentable fibre inulin increases postprandial serum short-chain fatty acids and reduces free-fatty acids and ghrelin in healthy subjects, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 35, 9-16.
63. Freeland, K. R., & Wolever, T. M. (2010). Acute effects of intravenous and rectal acetate on glucagon-like peptide-1, peptide YY, ghrelin, aciponectin and tumour necrosis factor-alpha. *Br. J. Nutr.* 103, 460-466.

64. Ley, E. (2010). Obesity and the human microbiome. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 201026:5-11.
65. Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PLoS ONE* 4, e7125.
66. Ramirez-Farias, C., Slezak, E., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Blautia obeum* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br. J. Nutr.* 101, 541-550.
67. Furet, J. P., Kong, L. C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J. L., et al. (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes* 59, 3049-3057.
68. Raoult, D. (2008). Human microbiome: Take-home lesson on growth promoters? *Nature* 454, 690-691.
69. Delzenne, N., & Reid, G. (2009). No causal link between obesity and probiotics. *Net, Rev. Microbio.* 7, 901.
70. Santacruz, A., Marcos, A., Warnberg, J., Matti, A., Martin-Matillas, M., Campoy, C., et al. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1906-1915.
71. Balamurugan, R., George, G., Kaheerdoss, J., Hepsiba, J., Chandragunasekaran, A.M., and Ramakrishna, B. S. (2010). Quantitative differences in intestinal

Faecalibacterium prausnitzii in obese Indian children. *Br. J. Nutr.* 103, 335-338.

72. Lieto, R., Laitinen, S., Nermes, M., Isolami, E. (2010). Impact of maternal probiotics supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal (and postnatal) growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br. J. Nutr.* 103, 1792-1799.
73. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796-1808.
74. Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821-1830.
75. Tordjman, J., Guerre-Millo, M., & Clement, K. (2008). Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab.* 34, 658-663.
76. Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219-246.
77. Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J. F., Lei, J., Zechner, R., et al. (2010). Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 120, 3466-3479.
78. Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, E., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). Innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 3015-3025.

79. Suganami, T., Miecina, T., Itoh, M., Shimoda, Y., Kamei, Y., & Ogawa, Y. (2007). Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 45-49.
80. Erridge, C., & Samani, N. J. (2009). Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1944-1949.
81. Cani, P. D., Hoste, S., Guiot, Y., & Delzenne, N. M. (2007). Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br. J. Nutr.* 98, 32-37.
82. Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Lava, F., Knauf, C., Burcelin, R. G., Tuohy, S. M., et al. (2007). Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 50, 2374-2383.
83. Davis, J. E., Gabler, N. S., Walker-Daniels, J., & Spurlock, M. E. (2008). Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1248-- 1255.
84. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., et al. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470-1481
85. Amar, L., Burcelin, R., Ruidavets, J. B., Cani, P. D., Fauvel, J., Alessi, M. C., et al. (2008). Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am. J. Nutr.* 87, 1219-1223.

86. Creely. S. McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, M., da Silva, N. Khanolkar, M., et al, (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E740-E747.
87. Anderson, P. D., Mehta, N. N., Wolfe. M. L., Hinkle, C. C., Pruscino, L., Comiskey, L L, et al. (2007). Innate immunity modulates adipokines in humans. *Endocrinol. Metab.* 92, 2272-2279.
88. Anderson, A. S., Larsen, N., Pedersen-Skovsgaard, T., Berg, R. M., Moller, S., Sventen, S. D., et al. (2010). Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Nutr.*, 1-8.
89. Al-Attas, O. S., Al-Daghri, N. M., Al-Rubeaan, K., da Stiva, N. F., Sabico, S. L., Kumar, S., et al. (2009). Changes in endotoxin levels in T2DM subjects under anti-diabetic therapies. *Cardiovasc. Diabetol.* 8. 20.
90. Ghanim, H., Abuay Himes. R. W., & Smith, C. W. (2010). TLR2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model. *FASEB J.* 24, 731-739.
91. Laugerette F, Vors, C., Goloen. A., Chauvin, M. A., Soulage, C., Lambert-Porcheron, S., et al. (2011). Emulsified lipids increase endotoxemia: Possible role in early postprandial low-grade inflammation. *Nutr. Biochem* 22, 53-59.
92. Kuo. L H., Tsai, P. J., Hang, M. J., Chuang, Y. L., Yu, L, Lai, K. T., et al. (2011). Toll-like receptor 2 deficiency improves insulin sensitivity and hepatic insulin signalling in the mouse. *Diabetologia* 54, 168-179.

93. Lin, Y., tee, H., Berg, A. Fl., Lisanti, M. P., Shapiro, L, & Scherer, P. E. (2000). The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J. Biol Chem.* 275, 24255-24263.
94. Nilsen, N., Nonstad, U., Khan, N., Knetter, C. F., Akira, S., Sundan, A., et al. (2004). Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate Toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88. *J. Biol. Chem.* 279, 39727-39735
95. De La Serre, C. B., Ellis, C. L. Lee, J., Hartman, A. L, Rutledge, J. C. & Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G440-G448.
96. Muccioli, G. G., Naslain, D., Backhed, E., Reigstad, C. S., Lambert, D. M., Delzenne, N. 91., et al. (2010). The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mot. Syst. Biol.* 6, 392.
97. Mazzon, E., & Cuzzocrea, S. (2008). Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am. J. Physiol, Gastrointest Liver Physiol.* 294, G1268-G 1280.
98. Cani, P. D., Possemiers, S., Van de, W. T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., et al. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58, 1091-1103
99. Kleessen, Hartmann, L., & Blaut, M. (2003). Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture,

- released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *Br. J. Nutr.* 89, 597-606.
100. Di Marzo, V., Bisogno, T., De, P. L., Melck, D., Orlando, P., Wagner, J. A., et al. (1999). Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur. J. Biochem.* 264, 258-267,
101. Hoareau, L., Buyse, M., Festy, F., Ravanan, P., Gonthier, M. P., Matias I., et al. (2009). Anti-inflammatory effect of palmitoylethanolamide on human adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 17, 431-438.
102. Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Zhou, L., Godlewski, O., Harvey-White, jeong, W. 1, et al, (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3160-3169.
103. Alhamoruni, A., Lee, A. C., Wright, S. L, Larvin, M., & O'Sullivan, S. E. (2010) Pharmacological effects of cannabinoids on the Caco-2 cell culture model of intestinal permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335, 92-102
104. Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg.* 2003;13:329.
105. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults. *JAMA.* 2012;288:1723-7.
106. Sturm R. Increases in clinically severe obesity in the United States 1986-2000. *Arch Intern Med* 2003;163:2146-8.
107. Clément K, Sorensen TIA (eds). *Obesity: Genomics and Postgenomics*. Informa Healthcare,

2007, pp 1-600

108. Prentice AM, Hennig BJ, Fulford AJ. Evolutionary origins of the obesity epidemic: natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1607-1610.
109. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science* 2003; 299: 853-855.
110. Kim MJ, Marchand P, Henegar C, Antignac JP, Alili R, Poitou C *et al.* Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 377-383.
111. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 313-323.
112. 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* 4(9), e7125 (2009).
113. Million M, Maraninchi M, Henry M, Armougom F, Raoult D. Obesity-associated Gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *J. Obesity* doi:10.1038/ijo.2011.153 (2011) (Epub ahead of print).
114. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance.

*Physiol Rev* 2007; 87: 507-520.

115. Schwartz A, Taras D, Schafer K *et al.* Microbiota and SCFA in Lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18(1), 190-195 (2010).
116. Zhang H, DiBaise JK, Zoccolo A *et al.* Human gut microbiota in obesity *and* after gastric bypass. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(7), 2365-2370 (2009).
117. Zuo HJ, Xie ZM, Zhang WW *et al.* Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism. *World J. Gastroenterol.* 17(8), 1076-1081 (2011).
118. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan U, Li L, Baker SB, Johnson MD *et al.* Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med* 2007; 13: 803-811.
119. Nadal I, Santacruz A, Marcos A *et al.* Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int. J. Obes. (Lond.)* 33(7), 758-767 (2009).
120. Santacruz A, Marcos A, Warnberg I *et al.* Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17(10), 1906-1915 (2009).
121. Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, Isolanti E. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am. J. Clin. Nutr.* 87(3), 534-538 (2008).

122. Duncan SII, Lobley GE, Holtrop G et al. Human colonie: microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *J. Obes. (Lond.)* 32(11), 1720-1724 (2008).
123. Santacruz A, Marcos A, Warnberg I et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 17(10), 1906-1915 (2009).
124. Yager J, Anderson AE. Anorexia nervosa. *N Engl J Med* 2005;353:1481-8.
125. Diagnostic and statistica) manual of mental disorders. DSM-IV-TR.4th ed. Washington, D.C: American Psychiatric Association; 2000.
126. Karczewska-Kupczewska M, Straczkowski M, Adamska A, et al. Insulin sensitivity, metabolic fiexibility, and serum adiponectin concentration in women with anorexia nervosa. *Metabolism* 2010;59:473-7.
127. Dostalova I, Smitka K, Papezova H, Kvasnickova H, Nedvidkova J. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res* 2007;56:587-94.
128. Pannacciulli N, Vettor R, Milan G, et al. Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1748-52.
129. Matzkin, V.B., Geissler c., Coniglio R. et al. : Cholesterol concentration in patients with anorexia nervosa and in halty control. *The International J . Psychiatric nurse Research*, 2006, 11, 1283-1293.)
- 130 Bluher 5, Mantzaros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr*

2009;89(Suppl):991S-7S

131 . Muoio DM, Dohm GL. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:653-66

132. Morris JA Jr, Selivanov V, Sheldon GF. Nutritional management of patients with malabsorption syndrome. *Clin Gastroenterol.* 1983 May; 12(2): 463-74.

133. Vanderhoof JA, Langnas AN. Short-Bowel Syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997; 113: 1767-1778.

134. Griffen WO Jr, Richardson JD, Medley ES. Prevention of small bowel contamination by ileocecal valve. *South Med J.* 1971 Sep; 64(9): 1056-8.

135. Clinical Issues Committee of the American Society for Metabolic and Bariatric Surgery. Position statement: sleeve gastrectomy as a bariatric procedure. *Surg Obes Rel Dis.* 2007;3:573-6.

136. Deitel M, Croshy R, Gagner M. The first international consensus summit for sleeve gastrectomy (SG), New York City, October 25... 27,2007. *Obes Surg.* 2008;18:487-96.

137. Mognol P, Chosidow D, Marmuse J. Laparoscopic sleeve gastrectomy as an initial bariatric operation for high-risk patients: initial results in 10 patients. *Obes Surg.* 2005;15:1030.-3.

138. Lee CM, Cirangle PT, Jossart Vertical

gastrectomy for morbid obesity in 216 patients; report of two-year results. *Surg Endosc.* 2007;21:1810-6.

139. Himpens I, Dapri G, Cadiere G. A prospective randomized study between laparoscopic gastric banding and laparoscopic isolated sleeve gastrectomy: results after 1 and 3 years. *Obes Surg.* 2006;16:1450-6.

140. Han MS, Kim WW, Oh JH. Results of laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) at 1 year in morbidly obese Korean patients. *Obes Surg.* 2005;15:1469-75.

141. Gagner M, Deitel M, Kalberer TL, et al. Symposium review: the second international consensus summit for sleeve gastrectomy, March 19-21, 2009. *Surg Obes Rel Dis.* 2009;5:476--85.

142. Moy J, Pomp A, Dakin A, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity. *Am Surg.* 2008;196:e56-9.

143. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 737-743.

144. Farooqi IS, O'Rahilly S. Leptin: a pivotal regulator of energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 2009;89(suppl):480S-4S.

145. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318-20

146. Welt CK, Chan JL, Bullen J, et al. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2004;351:987-97

147. Chan JL, Mantzaros CS. Role of leptin in energy-

deprivation states: normal human physiology and clinical implication for hypothalamic amenorrhea and anorexia nervosa. *Lancet* 2005;366:74-148. 148.

148. Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature* 2000; 404:632-634.

149. Bloomgarden ZT. Gut and adipocyte peptides. *Diabetes Care*. 2006; 29: 450- 456)

150. Ozcan L, Ergin AS, LU A et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metabolism* 2009; 9: 35-51.

151. Bobbioni E. IL-1 receptor antagonist serum levels are increase in human obesity. A possible link to the resistance to leptin? *J Clin Endocrin. Metab* 2002; 87: 1184-1188.)

152. Kotidis e, Koliakos G, Baltzopoulos V. Serum gherlin, leptin and adiponectin levels before and after weight loss. *Obes Surg* 2006; 16:1425-32).

153. Olivian B Teixeira J, . Effect of weight loss by diet or gastric bypass surgery on peptide YY levels. *Ann Surg* 2009; 249: 948-53).

154. Kowalska I, Karzczewska M. Adipokynes, gut hormones and growth factors in anorexia Nervosa . *Clinica CHimica Acta* 2011 ; 412: 1702-11.

155. Misra M, Miller KK, Almazan C, et al. Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3486-95.

156. Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, et al.

Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1730-6

157. Modan-Moses D, Stain D, Pariente C, et al. Modulation of adiponectin and leptin during refeeding of female anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1843-7.

158. Ayse K., Basak Y., Beyan O. et al., *Clinical Endocrinology* 2009,71:33-39.

159. Tritos NA, Kokkotou EG. The physiology and potential clinical applications of ghrelin, a novel peptide hormone. *Mayo Clin Proc* 2006;81:653-60.

160. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2006;147:2306-14.

161. Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 2006;89:71-84.

162. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240-4.

163. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, et al. Plasma ghrelin levels after diet- induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002;346:1623.

164. Marzullo P, Caumo A, Savia G, Verti B, Walker Ge, Maestrini S, Tagliaferri A, Di Blasio Am, Liuzzi A. Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake

of different macronutrients. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4124-4130, 2006

165. Cummings De, Shannon Mh: Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2999-3002, 2003.

166. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo Rs, Cummings De. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1630-1635, 2004.

167. St-Pierre Dh, Karelis Ad, Coderre L, Malita F, Fontaine J, Mignault D, Brochu M, Bastard Sp, Cianflone K, Doucet E, Imbeault P, Rabasa-Lhoret R. Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 264-269, 2007

168. Druce Mr, Small Cj, Bloom Sr: Minireview: Gut peptides regulating satiety. *Endocrinology* 145: 2660-2665, 2004.

169. Alvarez-Castro P, Isidro Ml, García-Buela J, Dieguez C, Casanueva Ff, Cordido F: Effect of acute ghrelin administration on glycaemia and insulin levels in obese patients. *Diabetes Obes Metab* 8: 555-560, 2006

170. Moran TH: Gut peptide signaling in the controls of food intake. *Obesity; (Silver Spring)* 14: 250S-253S, 2006.

171. Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 382-388, 2004.

172. Romon M, Gomila S, Hincker P, Soudan B, Dallongeville J. Influence of weight loss on plasma ghrelin responses to high-fat and high-carbohydrate test meals in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 1034-1041, 2006.
173. Purnell Jq, Cummings D, Weigle Ds: Changes in 24-h area-under-the-curve ghrelin values following diet-induced weight loss are associated with loss of fat-free mass, but not with changes in fat mass, insulin levels or insulin sensitivity. *Int J Obes (Lond)* **31**: 385-389, 2007.
174. Morinigo R, Casamitjana R, Moizé V, Lacy Am, Delgado S, Gomis R, Vidal J. Short-term effects of gastric bypass surgery on circulating ghrelin levels. *Obes Res* 12: 1108-1116, 2004
175. Hanusch-Enserer U, Cauza E, Brabant G, Dunky A, Rosen H, Pacini G, Tochler H, Prager R, Roden M. Plasma ghrelin in obesity before and alter weight loss alter laparoscopical adjustable gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3352-3358, 2004.
176. Langer Fb, Reza Hoda Ma, Bohdjalian A, Felberbauer Fx, Zacherl J, Wenzl E, Schindler K, Luger A, Ludvik B, Prager G: Sleeve gastrectomy and gastric banding: effects on plasma ghrelin levels. *Obes Surg* **15**: 1024-1029, 2005.
177. Peterly R, Steinert R. Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and Sleeve Gastrectomy: a randomized trial. *Obes Surg* 2012; 22:740-7
178. Ramon J.M., Salvanas S., Crous X.,Puig S. et al. J. *Gastrointest. Surg*: 2012 , 16: 1116-1122). 48.
179. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo

- H, Kangawa K: Ghrelin is a growth-hormone - releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999.
180. Tchop m, Meyer C et.al: Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity *Diabetes* 2001; 50: 707-9).
181. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J* 2009;56:1119-28.
182. Dostalova I, Haluzik M. The role of ghrelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa. *Physiol Res* 2009;58:159-70.
183. Koyama KI, Yasuhara D, Nakahara T, et al. Changes in acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, and ratio of acyl ghrelin to total ghrelin with short-term refeeding in female in patients with restricting-type anorexia nervosa. *Horm Metab Res* 2010;42:595-8.
184. Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 2003;144:2765-7.
185. Sedlackova D, Kopeckova J, Papezova H, et al. Changes of plasma obestatin, ghrelin and NPY in anorexia and bulimia nervosa patients before and after a high-carbohydrate breakfast. *Physiol Res* Oct 15 2010 (epub ahead of print).
186. Karczewska-Kupczewska M, Straczkowski M, Adamska A, et al. Increased suppression of serum ghrelin concentration by hyperinsulinemia in women with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2010;162:235-9.

187. Ukkola O. Ghrelin and the metabolic balance. *J Endocrinol Invest* 2005;28: 849-52.
188. Meier JJ, Gallwitz Normalization on glucose concentration and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous GLP-1 in patients with type II diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2719-25.
189. Basson R, Capoccia D, Rizzello M, et al. : First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. *Surg Endosc* 2011; 25: 3540-3550).
190. Tomasik PJ, Sztefko K, Malek A. GLP-1 as a satiety factor in children with eating disorders. *Horm Metab Res* 2002; 34: 77-80).
191. Germain N, Galuska B, Le Roux CW. Constitutional thinness and lean anorexia nervosa display opposite concentrations of peptide YY, GLP1, ghrelin, and leptin. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 967-71).
192. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AI, Fuessi HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone peptide. *Gastroenterology* 1985; 89: 1070 -1077.
193. Keire DA, Mannon P, Kobayashi M, Walsh JH, Solomon TE, Reeve Jr JR. Primary structures of PYY, jPro(34)1PYY, and PYY-(3-36) confer different conformations and receptor selectivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **279**: G126 -G131.
194. Le Roux CW, Batterham RL, Aylwin SJ, Patterson M, Borg CM, Wynne KJ *et al.* Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology* 2006; 147: 3-8.

195. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS *et al.* Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 2003; 349: 941 -948.
196. Korner J, Bessler M, Odio Conwell IM, Daud A, Restuccia NL *et al.* Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 359-365.
197. Lieveise RJ, Jansen JB, Masciee AA, Lamers CB. Satiety effects of a physiological dose of cholecystokinin in humans. *Gut* 1995; 36: 176-179.
198. Dufresne M, Seva C, Fourmy D. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev* 2006; 86: 805 - 847.
199. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 2007; 117: 13-23.
200. Szewczyk JR, Laudeman C. CCK1R agonists: a promising target for the pharmacological treatment of obesity. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 837 -43.
201. Moran TH, Si S. Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1211 -1218.
202. Jordan J, Greenway FL, Leiter LA, Li Z, Jacobson P, Murphy K *et al.* Stimulation of cholecystokinin-A receptors with GI181771X does not cause weight loss in overweight or obese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83: 281-287.
203. Melmed S. Insulin-like growth factor-I - a

prototypic peripheral-paracrine hormone.  
Endocrinology 1999;140:3879-80.

- 204-Boisclair YR, Rhodas RP, Ueki I, Wang J, Ooi GT. The acid labile subunit (ALS) of the 150kDA IGF-I binding protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF-I system. *J Endocrinol* 2001;170:63-70.
205. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin like growth-factors and the skeleton. *Endoc Rev* 2008;29:535-59.
206. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, et al. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev* 2009;30:494-535.
207. Sjogren K, Wallenius K, Liu JL, et al. Liver-derived IGF-I is of importance for normal carbohydrate and lipid metabolism. *Diabetes* 2001;50:1539-45.
208. Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, et al. Liver specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* 2001;50:1110-8.
209. Yakar S, Setser J, Zhao H, et al. Inhibition of growth hormone action improves insulin insensitivity in liver IGF-1 deficient mice. *J Clin Invest* 2004;113:96-105.
210. Kaplan SA, Cohen P. The somatomedin hypothesis 2007: 50 years later. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4529-35.
211. Fazeli PK, Misra M, Goldstein M, et al. Fibroblast Growth Factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:369-74.
212. Stoving RK, Veldhuis JD, Flyvbjerg A, et al. Jointly amplified basal and pulsatile growth hormone (Gli)

- secretion and increased process of irregularity in women with anorexia nervosa: indirect evidence for disruption of feedback regulation within the GI-1-insulin like growth factor I axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2056-63.
213. Stoving RK, Andersen M, Flyvbjerg A, et al. Indirect evidence for decreased hypothalamic somatostatinergic tone in anorexia nervosa. *Clin Endo (Oxf)* 2002;56:391-6.
214. Misra M, Miller KK, Bjornson J, et al. Alterations in growth hormone secretory dynamics in adolescent girls with anorexia nervosa and effect on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5615-23.
215. Fazeli PK, Lawson EA, Prabhakaran N, et al. Effect of recombinant human growth hormone in anorexia nervosa: a randomized-placebo controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4889-97.
216. Stoving RK, Chen JW, Glinborg D, et al. Bioactive insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-I binding protein-1 in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2323-9.
217. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J The secretory function of adipocytes in the physiology of nwhite adipose tissue. *J Cell Physiol* 2008; 17: 510-517.
218. Nair S, Lee YH, Rousseau E, Cam M, Tataranni PA Bajer Lj et al. Increased expression of inflammation-related genes in cultured preadipocytes/ stromal vascular cells from obese compared with non- obese Pima Indians . *Diabetologia* 2005; 48: 1784-1788.

219. Fessler MB, Rudel L, Brown JM . Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20:379-85.
220. Gustafson B . Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis *J Atheroscler Thromb* 2010; 17 : 332-341.
221. Karastergiou K, Mohammed –Ali V The autocrine and paracrine roles of adipokynes. *Mil Cell Endocrinol* 2010; 318: 69-78.
222. Maury E, Brichard SM. Adipokyne dysregulation, tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molec Cell Endocrinol* 2010 ; 314: 1-16.
223. Cawthorn WP, Heyd F. Tumor necrosis factor- alpha inhibits adipogenesis via a beta-catenin /TCF4 dependent pathway. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 1361-73.
224. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF $\alpha$  and adipocyte biology *FEBS Lett* 2008 ; 582: 117-131.
225. Kanety H, Feinstein R, Papa MZ, Hemi R. Tumor necrosis factor- alpha- induced phosphorylation of insulin-receptor substrate-1 IRS-1. Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated-tyrosine phosphorylation of IRS-1. *JBiol Chem* 1995; 270: 23780-84.
226. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A Ellis R. IRS-1-mediated inhibition of insulin-receptor tyrosine kinase activity in TNF $\alpha$  and obesity induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-668.
227. Bradley RL, Fisher FF, Maratos- Flier E . Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF $\alpha$  and IL.10 by murine 3T3L1 adipocytes. *Obesity* 2008; 16: 938-44.

228. Perez-Matute P, Perez- Echarri N, Martinez JA, Marti A. Eicosapentenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat diet fed rats. Role of apoptosis, adiponectin and tumor-necrosis factor alpha. *Br. J. Nutr.* 2007; 97: 389-398.
229. Caughey G E, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG. The effects of TNF $\alpha$  and IL-1 production on diets enriched in n-3- fatty-acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Nutr* 1996; 63: 116-122.
230. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator IL-6 and obesity. *Inflamnt Res.* 2009;58: 727-736.
231. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO. IL-6 reduces LPL activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for IL-6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 1997; 52:4113-16.
232. Stenlof K, Wernstedt I. IL-6 in CNS in negatively correlated with the fat- mass in overweight/ obese subjects. *J Clin Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 4379-83.
233. Sesti G, Perego L, Cardellini M, Andreozzi F . Impact of common polymorphism in candidate genes for insulin resistance and obesity on weight loss of morbidity obese subjects after laparoscopic adjustable gastric banding and hypocaloric diets. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5064-69.
234. Weldon SM, Mullen AC, Losche CE, Hurley LA. Docosanoic acid induces an anti-inflammatory profile . *J Nutr Biochem* 2007; 18: 250-258.
235. Garcia Escobar E, Rodriguez- Pachero F, Gomez-Zumaquero JM, Haro-Mora JJ. Nutritional regulation of

- IL-6 release from adipocytes. *Int J Obes* 2010; 43: 1328-32.
236. Van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, Hoelen DW. A saturated fatty acid diet induce an obesity –linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 1656-64.
237. Shalhub S, Parsee A, Gallagher SF, et al. The importance of routine liver biopsy in diagnosing non-alcoholic steatohepatitis in bariatric patients. *Obes Surg* 2004 ; 14: 54-59.
238. Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N.E.J.M.* 2002; 346:1221-31.
239. Day C, James O. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;114:842-45
240. Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin. Invest* 2005; 115: 1139-42.
241. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance and metabolic syndrome: further evidence for etiologic association. *Hepatology* 2002; 35: 367-372.
242. Browning J Horton HD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury *J.Clin. Invest* 2004;114:147-52.
243. Frazier TH, DiBaise JK, Crajg J. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation and liver injury. *JPEN* 2011; 35:14-20S.
244. Maeda N . Diet induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ ACPR30. *Nat. Med.* 2002;8: 731-737.

245. Logan BK, Jones AW. Endogenous ethanol auto-brewery syndrome as a drunk driving defense challenge. *Med Sci Law* 2000; 40:206-15.
246. Zhang H , DIBaise JK, Rolo A. Human gut microbiota in obesity and after gastri bypass. *PNAS* 2009; 106: 1022-23.
247. Furet JP, Kong LC, Tap J. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery induced weight loss. *Diabetes* 2010; 59:3049-3057.
248. Kelly DA. Preventing parenteral nutrition liver disease. *Early Human Development* 2010; 86: 683-687.
249. (Bedogni G., Bellentani S., Miglioli L., et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol.* 2006;6:33).
250. Kushner RF. Bioelectrical impedance analysis: a review of principles and applications.
251. Fidanza F., Liguori G., Mancini F. “Lineamenti di Nutrizione Umana” Idelson, pp. 306-329 – 1969
252. Saverymuttu SH, Joseph AEA, Maxwell JA. Ultrasound scanning in the detection of hepatic fibrosis and steatosis. *Br Med J.* 1986;292:13-5
253. Ricci C, Longo R, Gioulis E, et al. Noninvasive in vivo quantitative assessment of fat content in human liver. *J Hepatol.* 1997;27:108-13)
254. del Genio, G. del Genio, I. De Sio, et.al. Noninvasive evaluation of abdominal fat and liver changes following progressive weight loss in severely obese patients treated

- with laparoscopic gastric bypass. *Obes Surg* (2009) 19:1664-1671).
255. Labruna G., Pasanisi F., et al. High leptin/adiponectin ratio and serum triglyceride are associated with an “at-risk” phenotype in young severely obese patients. *Obesity* (2010) doi:10.1038/oby.2010.309)
256. *Analyticalbiochemistry* 236, 1-8, 1996).
257. Armougom et al, *PLOSOne*, sept, vol.4, iss 9 (2009) e7125).
258. Armougom F, Raoult D (2008) Use of pyrosequencing and DNA barcodes to monitor variations in Firmicutes and Bacteroidetes communities in the gut microbiota of obese humans. *BMC Genomics* 9: 576).
259. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D (2008) Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 47: 33-43).
260. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawets S, Misener S, (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. pp 365-366).
261. Drasar BS, Roberts AK. Methods for the study of anaerobic microflora. In: Levett PN, ed. *Anaerobic microbiology: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1991; 183-200)
262. Macy JM, Probst I. The biology of gastrointestinal bacteroides. *Annu Rev Microbiol* 1979; 65: 390-7
263. L. Santarpia, I. Torre et al., Intestinal bacterial flora in neurologically impaired patients on long-term enteral

- nutrition. *Nutritional Therapy & Metabolism* Vol.25 no.2, pp. 89-96 (Wichtig Editore, 2007).
264. Mackowiak PA. The normal microbial flora. *N Engl J Med* 1982; 307: 83-93
265. Franks H, Harmsen HJM, Raangs GC, et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group—specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3336-45
266. Santarpia L, Grandone I, Contaldo F, Pasanisi F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013 Mar;4(1):31-9.
267. Wright R.S., Anderson J.W., Bridges S.R. Propionate inhibits hepatocyte lipid sintesis *P.S.E.B.M* 1990; vol.195, n.1, pp.26-29
268. Fava F, Gitau R, griffin BA, Gibson GR et al. The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome “at risk” population. *Int.J.of Obesity* 2012 ;1-8.)