

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



IMPLICACIONS DE LA MICROBIOTA EN LES MALALTIES ENDOCRINOMETABÒLIQUES

**Tesi Doctoral presentada per
Rocío Puig Piña
per a optar al grau de Doctora**

Directors de la Tesi

Silvia Pellitero Rodríguez i Manel Puig Domingo

Tutor de la Tesi

Manel Puig Domingo

Programa de Doctorat en Medicina
Departament de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2026

AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu agraïment més sincer als meus directors de tesi, la **Dra. Sílvia Pellitero** i el **Dr. Manel Puig**, també tutor d'aquesta tesi, per la seva guia, dedicació i confiança al llarg de tot aquest camí. Gràcies per les vostres aportacions científiques, per la paciència i per l'acompanyament constant, especialment en els moments d'angoixa o d'incertesa en què semblava difícil assolir la fita. He après molt de vosaltres, i em sento molt afortunada d'haver pogut compartir aquesta etapa amb dos grans professionals i millors persones.

A tot l'**equip del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Germans Trias i Pujol**, on em vaig iniciar com a metge i on em vaig formar com a endocrinòloga. Sempre us sentiré com la meva "família" d'endocrins. Gràcies per haver-me transmès la passió per la professió, per l'esperit d'equip i per tots els moments compartits dins i fora de l'hospital.

Als meus companys del **Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital de Sant Pau**, per rebre'm tan bé i integrar-me des del primer dia. Amb vosaltres he compartit il·lusions, nervis i també l'estrès d'aquesta tesi, però sobretot he trobat suport, complicitat i amistat.

Al **Dr. Dídac Mauricio**, per la seva confiança i suport, i per haver contribuït a fer possible aquest projecte.

També vull donar les gràcies a **tots els companys i col·laboradors d'investigació** que han participat en els estudis que conformen aquesta tesi. No us anomeno un per un, però sense la vostra feina, entusiasme i esforç, aquest projecte no hauria estat possible.

A les meves amigues de la universitat i de la residència, la **Patri**, la **Tània**, la **Rosa** i la **Laia**, per la vostra amistat incondicional i per ser-hi sempre, malgrat el temps i la distància. Gràcies per escoltar-me, animar-me i fer-me riure quan més ho necessitava.

A la **Dra. Joaquín**, que també considero una gran amiga, companya de residència i de feina durant uns quants anys, de qui he après moltíssim —sobretot de nutrició— i a qui considero una excel·lent professional, una gran persona i un exemple a seguir.

A la meva **família**, als meus pares i germans, per la vostra estima, per creure sempre en mi i per ensenyar-me els valors que m'han fet arribar fins aquí. En record especial de la meva mare i del meu germà **Pepe**, que sé que estarien molt orgullosos. Els trobo molt a faltar i m'hauria agradat poder compartir aquest moment amb ells.

I com no, al **Josep Maria**, la meva parella i company de vida, i als nostres fills, la **Júlia i en Ricard**, per ser el meu refugi i la meva font d'energia. Gràcies per la paciència, per l'amor incondicional i per haver cedit tantes hores que hauríem pogut compartir, fent possible que aquest projecte tirés endavant. Amb vosaltres construeixo cada dia una família que m'omple i em fa sentir plena.

I finalment, **a totes les persones que, d'una manera o altra, han contribuït a aquesta tesi**, gràcies de tot cor. Sense vosaltres, aquest somni no s'hauria fet realitat.

ACRÒNIMS I ABREVIATURES

Nota: Algunes sigles provenen de l'anglès i es mantenen per coherència amb la terminologia científica internacional.

5-HT: serotonina

ACC1: *acetyl-CoA carboxylase 1* (acetil-CoA carboxilasa 1)

AGCC: àcids grassos de cadena curta

AhR: *aryl hydrocarbon receptor* (receptor d'hidrocarburs arílics)

AMPK: proteïna quinasa activada per AMP

AUC: *area under the curve* (àrea sota la corba)

BCAA: *branched-chain amino acids* (aminoàcids ramificats)

BPG: bypass gàstric

CB: cirurgia bariàtrica

ChREBP: *carbohydrate response element-binding protein* (proteïna d'unió a l'element de resposta als carbohidrats)

DCA: àcid desoxicòlic

DM2: diabetis mellitus tipus 2

EECs: *enteroendocrine cells* (cèl·lules enteroendocrines)

EWL: *excess weight loss* (percentatge de pèrdua del pes excedent)

FAS: *fatty acid synthase* (sintasa d'àcids grassos)

FFAR2/3: *free fatty acid receptor 2/3* (receptors d'àcids grassos lliures 2 i 3)

FAIF: *fasting-induced adipose factor* (factor adipós induït pel dejuni)

FTO: *fat mass and obesity-associated gene* (gen associat a massa grassa i obesitat)

FXR: *farnesoid X receptor* (receptor farnesoide X)

GABA: àcid gamma-aminobutíric

GIP: *glucose-dependent insulintropic peptide* (pèptid insulíntròpic dependent de glucosa)

GLP-1: *glucagon-like peptide 1* (pèptid similar al glucagó tipus 1)

GLP-1R: *glucagon-like peptide 1 receptor* (receptor de GLP-1)

GLP-2: *glucagon-like peptide 2* (pèptid similar al glucagó tipus 2)

GWAS: *genome-wide association study* (estudi d'associació del genoma complet)

GPCR: *G protein-coupled receptor* (receptors acoblats a proteïna G)

HDAC: *histone deacetylase* (histona desacetilasa)

IDF: International Diabetes Federation

IKK: *IκB kinase* (quinasa d'IκB)

IL-1β: interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

IMC: índex de massa corporal

IRS-1: *insulin receptor substrate 1* (substrat 1 del receptor d'insulina)

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KCNJ11: *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11*

LCA: àcid litocòlic

LPL: lipoproteïna lipasa

LPS: lipopolisacàrid

MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1* (proteïna quimioattractant de monòcits-1)

MI: microbiota intestinal

MTT: *meal test* (prova d'àpat mixt)

NF-κB: *nuclear factor kappa B* (factor nuclear kappa B)

PPARG: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PYY: pèptid YY

preDM: prediabetis

RE: reticle endoplasmàtic

RI: resistència a la insulina

SEEDO: Societat Espanyola per a l'Estudi de l'Obesitat

SG: *sleeve gastrectomy* (gastrectomia vertical)

SREBP-1: *sterol regulatory element-binding protein 1* (proteïna d'unió a l'element regulador d'esteroides 1)

TCF7L2: transcription factor 7-like 2

TGR5: *Takeda G-protein bile acid receptor 1* (receptor de l'àcid biliar unit a proteïna G)

TLR4: *toll-like receptor 4* (receptor tipus Toll 4)

TMAO: *trimethylamine N-oxide* (òxid de trimetilamina)

TNF-α: *tumor necrosis factor alpha* (factor de necrosi tumoral alfa)

TRPA1: *transient receptor potential ankyrin 1* (receptor potencial transitori de tipus A1)

WOF: Federació Mundial de l'Obesitat

ÍNDEX

RESUM	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓ	5
1.1. Context clínic de les malalties metabòliques: obesitat, resistència a la insulina i diabetis tipus 2	7
1.1.1. Obesitat: prevalença i bases fisiopatològiques	7
1.1.1. Diabetis tipus 2: magnitud del problema i implicacions clíniques	9
1.1.2. Relació entre obesitat i disfunció metabòlica: resistència a la insulina i progressió cap a la DM2	10
1.2. El paper funcional de la microbiota intestinal en la regulació metabòlica	12
1.2.1. Composició i funcions generals de la microbiota intestinal	12
1.2.2. Producció de metabòlits bacterians: AGCC i altres compostos actius	13
1.2.3. Interacció entre disbiosi, alteració de la barrera intestinal i inflamació de baix grau	17
1.2.4. Interacció entre microbiota i sistema endocrí intestinal	19
1.2.5. Relació entre microbiota intestinal i obesitat	22
1.2.6. Relació entre microbiota intestinal i diabetis tipus 2	25
1.3. La cirurgia bariàtrica com a model d'estudi de la interacció microbiota-incretines-metabolisme	29
1.3.1. Tipus de cirurgia bariàtrica i efectes metabòlics generals	29
1.3.2. Remodelació de la microbiota intestinal i resposta hormonal postquirúrgica	30
2. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESI	35
3. OBJECTIUS	39
4. COMPENDI DE PUBLICACIONS	41
4.1 Article 1	43
4.2 Article 2	63
4.3 Article 3	77
5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS	124
5.1. Perfil de microbiota i metabòlits bacterians en els diferents estadis de disfunció glucèmica	126
5.2. Remodelació microbiana i resposta incretínica després de la cirurgia bariàtrica en pacients amb DM2	128

5.3.	Relació de la resistència a la insulina en la resposta microbiana i hormonal després de la cirurgia	130
5.4.	Resultats integrats del conjunt d'estudis: patrons comuns en la relació microbiota-AGCC-incretines	132
6.	RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ	136
6.1.	Discussió general	139
6.2.	Discussió integrada dels resultats	140
6.2.1.	Disbiosi intestinal i alteracions dels AGCC en estadis precoços de disfunció glucèmica	140
6.2.2.	Remodelació microbiana, resposta incretínica i millora metabòlica després del bypass gàstric	141
6.2.3.	Impacte de la resistència a la insulina en la resposta incretínica i la remodelació microbiana després de la gastrectomia vertical	143
6.2.4.	Patrons comuns i interpretació mecànica.....	145
6.3.	Síntesi final i implicacions del conjunt d'estudis	146
7.	CONCLUSIONS	150
8.	LÍNIES FUTURES D'INVESTIGACIÓ	152
9.	BIBLIOGRAFIA.....	156

RESUM

Resum

L'obesitat i la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) constitueixen dos dels principals reptes de salut pública a escala mundial. En els darrers anys, la microbiota intestinal (MI) ha emergit com un factor clau en la regulació del metabolisme energètic i glucídic, així com en la patogènesi de la resistència a la insulina (RI) i de la disfunció metabòlica associada. Els àcids grassos de cadena curta (AGCC), metabòlits derivats de la fermentació bacteriana, exerceixen un paper rellevant en la modulació de la inflamació, la sensibilitat a la insulina i la secreció d'hormones intestinals com les incretines GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) i GLP-2 (*glucagon-like peptide 2*). Aquesta tesi doctoral analitza de manera integrada la relació entre la MI, els seus metabòlits i la resposta incretínica en diferents escenaris metabòlics, així com la seva modulació després de la cirurgia bariàtrica (CB).

En primer lloc, en una cohort poblacional mediterrània, es van caracteritzar les alteracions de la MI i dels AGCC al llarg del continu glucèmic, des de la normoglucèmia fins a la DM2. Es va observar una reducció progressiva d'espècies productores d'AGCC i de les concentracions fecals d'acetat i propiònic, juntament amb un augment de bacteris proinflamatoris com *Escherichia/Shigella*. En segon lloc, en pacients amb DM2 sotmesos a bypass gàstric (BPG), es van registrar millores significatives del control glucèmic i una major secreció de GLP-1 i GLP-2, en paral·lel a una remodelació profunda de la MI i a una reducció dels marcadors de permeabilitat intestinal. Finalment, en pacients amb obesitat sense diabetis sotmesos a gastrectomia vertical o *sleeve gastrectomy* (SG), es va constatar que el grau de RI condiciona tant la resposta incretínica com la remodelació microbiana: els individus amb menor RI van mostrar una resposta hormonal més robusta i un perfil bacterià orientat a la producció d'AGCC.

En conjunt, els resultats aporten evidència que la disbiosi intestinal i la reducció dels AGCC constitueixen esdeveniments precoços en la disfunció metabòlica, mentre que la CB pot revertir parcialment aquests desequilibris mitjançant la restauració de la MI i de la resposta incretínica. Aquesta tesi consolida el paper de l'eix microbiota-AGCC-incretines com a mecanisme fisiopatològic rellevant en la relació entre obesitat, RI i DM2, i obre noves perspectives per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques dirigides a modular la MI i els seus metabòlits per millorar la salut metabòlica.

Abstract

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are major global public health challenges. In recent years, gut microbiota (GM) has emerged as a key regulator of energy and glucose metabolism and as a contributor to insulin resistance and metabolic dysfunction. Short-chain fatty acids (SCFAs), metabolites derived from bacterial fermentation, play a critical role in modulating inflammation, insulin sensitivity, and the secretion of intestinal hormones such as the incretins GLP-1 and GLP-2. This doctoral thesis provides an integrated analysis of the relationships between GM, its metabolites, and the incretin response across different metabolic states, as well as their modulation following bariatric surgery (BS).

First, in a Mediterranean population cohort, alterations in GM composition and SCFA levels were characterized along the glycemic continuum, from normoglycemia to T2DM. A progressive reduction of SCFA-producing species and of fecal acetate and propionate concentrations was observed, together with an increase in pro-inflammatory bacteria such as *Escherichia/Shigella*. Second, in patients with T2DM undergoing Roux-en-Y gastric bypass, significant improvements in glycemic control and enhanced GLP-1 and GLP-2 secretion were accompanied by profound microbial remodeling and reduced intestinal permeability markers. Finally, in individuals with obesity but without diabetes undergoing sleeve gastrectomy, the degree of insulin resistance (IR) was found to modulate both the incretin response and microbial remodeling: participants with lower IR displayed a stronger hormonal response and a microbiota profile oriented towards SCFA production.

Overall, the findings indicate that intestinal dysbiosis and decreased SCFA production are early events in metabolic dysfunction, whereas BS may partially restore these imbalances through reconfiguration of the GM and enhancement of the incretin response. This thesis supports the role of the gut microbiota–SCFA–incretin axis as a key physiological mechanism linking obesity, IR, and T2DM, and highlights potential therapeutic strategies aimed at modulating the GM and its metabolites to improve metabolic health.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Context clínic de les malalties metabòliques: obesitat, resistència a la insulina i diabetis tipus 2

1.1.1. Obesitat: prevalença i bases fisiopatològiques

La MI humana constitueix un ecosistema dens i divers, amb una població estimada d'aproximadament $3,8 \times 10^{13}$ microorganismes i prop de 1.000 espècies diferents, que resideixen. L'obesitat és una malaltia crònica complexa i multifactorial caracteritzada per un excés de teixit adipós, i que associa un estat d'inflamació crònica de baix grau i sovint de RI, amb importants implicacions per a la salut.

Prevalença i impacte clínic

L'obesitat s'ha convertit en una malaltia crònica complexa amb una prevalença alarmant en augment tant a nivell mundial com nacional. D'acord amb la Societat Espanyola per a l'Estudi de l'Obesitat (SEEDO), la prevalença global de l'obesitat s'ha gairebé triplicat en els darrers cinquanta anys, i les projeccions actuals apunten a una tendència encara més accentuada en les pròximes dècades (1). En aquesta línia, l'Atlas 2025 de la Federació Mundial de l'Obesitat (WOF) estima que el nombre total d'adults amb obesitat augmentarà més d'un 115% entre 2010 i 2030, passant de 524 milions a 1.130 milions (2).

A Espanya, segons dades de l'Organització Mundial de la Salut, gairebé una de cada quatre persones adultes (23,8%) presenta obesitat, i el sobrepès afecta més del 60% de la població (3).

Aquest creixement en la prevalença té un impacte directe en la salut pública. Segons el mateix informe de la WOF, l'any 2021 es van registrar 1,6 milions de morts prematures (abans dels 70 anys) atribuïbles directament a un IMC elevat, la majoria per malalties no transmissibles com la diabetis, el càncer o els accidents cerebrovasculars (2).

Malgrat que a la pràctica clínica s'utilitza l'índex de massa corporal (IMC) per definir-la, sabem que la distribució del teixit adipós constitueix un factor de risc més determinant per a l'aparició de malalties metabòliques i cardiovasculars que l'excés d'adipositat global. En particular, l'acumulació de teixit adipós visceral —i, en menor mesura, l'expansió del teixit adipós subcutani profund— s'associa de manera positiva amb el desenvolupament de comorbiditats vinculades a l'obesitat i amb una major mortalitat per totes les causes (4).

Bases fisiopatològiques de l'obesitat

El teixit adipós no només actua com a reservori energètic, sinó que exerceix també funcions endocrines, immunològiques i metabòliques. Està format per una gran heterogeneïtat cel·lular, i inclou tant el teixit adipós blanc, especialitzat en l'emmagatzematge de triglicèrids, com el teixit adipós marró, implicat en la termogènesi adaptativa. Ambdós tipus mostren una gran capacitat plàstica i poden modificar la seva activitat segons les necessitats fisiològiques (5,6). Els adipòcits secreten diverses hormones i pèptids en diferents condicions fisiològiques i patològiques, coneguts globalment com a adipocines, que exerceixen un paper clau en la regulació de l'homeòstasi energètica i la inflamació, entre d'altres (7,8).

En condicions d'excés energètic, l'expansió del teixit adipós pot conduir a un estat de disfunció caracteritzat per lipòlisi desregulada, infiltració de lípids en altres òrgans condicionant la seva disfunció (lipotoxicitat), alteració del perfil d'adipocines i activació de la resposta inflamatòria. Aquest estat contribueix al desenvolupament de RI, DM2, malalties cardiovasculars, esteatosi hepàtica i altres trastorns associats degut a la infiltració de la major part d'òrgans i teixits per teixit adipós ectòpic i excessiu.

Diversos factors genètics i epigenètics influeixen en la predisposició a l'obesitat. Estudis familiars i d'associació del genoma complet (GWAS) han estimat que entre el 40% i el 70% de la variabilitat del pes corporal pot ser hereditària (9). La major part dels casos d'obesitat comuna són poligènics, i impliquen la interacció de múltiples variants genètiques amb factors ambientals (10). Però les variants genètiques identificades només expliquen part de la diferent susceptibilitat a l'obesitat. A més dels factors genètics, els mecanismes epigenètics, com la metilació del DNA, les modificacions d'histones i els microARNs, també influeixen en l'obesitat (11).

Els factors ambientals com la dieta, l'activitat física, els contaminants i l'estrès poden afavorir l'acumulació de greix i el desenvolupament de l'obesitat. Actuen com a desencadenants externs que poden superar la capacitat adaptativa del teixit adipós, especialment en individus amb una predisposició genètica. A més, poden ser els causants dels canvis epigenètics que s'han associat a l'obesitat (12).

Finalment, el sistema hormonal juga un paper central en la regulació de la gana i del balanç energètic. Hormones com la leptina, la grelina, la insulina i les incretines intestinals entre d'altres, participen en la comunicació entre el teixit adipós i altres òrgans metabòlicament actius. El seu desequilibri pot contribuir al desenvolupament i

manteniment de l'obesitat, i constitueix una diana terapèutica rellevant en el tractament actual i futur(7).

En resum, l'obesitat és una malaltia multifactorial i crònica en la qual interaccionen factors genètics, epigenètics i ambientals. El coneixement d'aquests mecanismes és essencial per al desenvolupament de noves estratègies de prevenció i tractament personalitzat de l'obesitat.

1.1.1. Diabetis tipus 2: magnitud del problema i implicacions clíniques

La DM2 és la forma més prevalent de diabetis, representa aproximadament el 90 % dels casos globals i s'ha consolidat com una de les principals causes de morbiditat i mortalitat prematura associada a malalties no transmissibles (13). El seu impacte creixent sobre la salut pública es deu tant al volum de casos com a les seves complicacions a llarg termini i a la càrrega econòmica que genera.

Prevalença i projeccions de futur

Segons l'IDF Diabetes Atlas 2025, s'estima que 589 milions d'adults d'entre 20 i 79 anys viuen amb diabetis arreu del món, dels quals més del 90 % pateixen DM2. D'aquest total, fins a un 43 % dels casos (aproximadament 252 milions de persones) no estan diagnosticats, la qual cosa incrementa el risc de complicacions evitables (14).

A Espanya, es calcula que 4,66 milions d'adults (20–79 anys) tenen diabetis, amb una prevalença estimada del 13,1 %. D'aquests, el 35,5 % estarien sense diagnosticar. Donat que la DM2 representa la major part dels casos, es pot inferir que més de 4 milions d'espanyols conviuen amb aquesta patologia, moltes vegades sense saber-ho. A més, l'any 2024, la diabetis va ser responsable de 22.125 morts al país en aquest mateix grup d'edat (14). Un estudi poblacional de seguiment realitzat a Espanya indica una incidència acumulada del 6,4 % en un període de 7,5 anys, amb una taxa ajustada de 11,6 casos per 1.000 persones-any, fet que subratlla l'elevat risc de desenvolupament de DM2 en la població general (15).

A escala mundial, les projeccions epidemiològiques apunten a un augment del 59,7 % en la prevalença estandarditzada per edat entre 2021 i 2050, arribant a superar els 1.310 milions de persones afectades. Aquest increment estarà impulsat principalment per l'expansió de la DM2 (amb un creixement estimat del 61,2 %) i per factors com l'obesitat i l'envelliment poblacional (13). Tot i que no es disposa de dades de projecció

específiques per a Espanya, es preveu una tendència ascendent també en aquest context, tenint en compte els elevats percentatges d'obesitat i l'envelliment demogràfic.

Implicacions clíniques i socioeconòmiques

Des del punt de vista clínic, la DM2 multiplica per 2 o 3 el risc de patir malalties cardiovasculars com l'infart agut de miocardi, l'ictus o la insuficiència cardíaca, responsables de prop de la meitat de les morts atribuïdes a la malaltia (16). Les complicacions microvasculars —retinopatia, nefropatia i neuropatia diabètica— són altament prevalents i contribueixen al deteriorament funcional i de la qualitat de vida (17).

També s'observa un impacte emocional significatiu, amb major risc d'ansietat i depressió associats a les complicacions i al mal control metabòlic que es pot agreujar per factors socials com el nivell educatiu baix o el sedentarisme (18). La baixa adherència terapèutica, condicionada per barreres socioeconòmiques i manca de suport continuat, n'agreuja el pronòstic.

En conjunt, la prevalença elevada, la naturalesa progressiva i la freqüència de complicacions prevenibles exerceixen una forta pressió sobre els sistemes sanitaris. Malgrat els avenços, la detecció precoç, el control multifactorial i l'accés equitatiu als tractaments efectius continuen essent reptes prioritaris, que reclamen un abordatge proactiu i personalitzat (19).

Des d'una perspectiva econòmica, la càrrega sanitària de la diabetis a Espanya és notable: s'estima una despesa anual de prop de 12.300 milions d'euros, equivalent a uns 2.640 € per persona amb diabetis, incloent-hi costos directes i indirectes derivats de les complicacions i la pèrdua de productivitat (14).

1.1.2. Relació entre obesitat i disfunció metabòlica: resistència a la insulina i progressió cap a la DM2

Des del punt de vista fisiopatològic, el desenvolupament de la DM2 s'explica per una interacció complexa entre la RI perifèrica, la disfunció progressiva de les cèl·lules β pancreàtiques i les alteracions derivades de la disfunció del teixit adipós. L'obesitat, en particular l'acumulació de teixit adipós visceral, actua com a factor iniciador d'aquesta cascada metabòlica, afavorint un estat pro inflamatori crònic i la secreció desregulada d'adipocines i àcids grassos lliures, que interfereixen amb la senyalització insulínica i promouen un entorn de lipotoxicitat sistèmica (20,21).

Els canvis estructurals i funcionals del teixit adipós, com la hipertròfia adipocitària, la hipòxia tissular i la fibrosi, comprometen la seva capacitat d'emmagatzematge energètic i afavoreixen l'abocament ectòpic de lípids cap a teixits com el fetge, el múscul esquelètic i el pàncrees. Paral·lelament, la infiltració de cèl·lules immunes proinflamàtores (com els macròfags M1) en el teixit adipós incrementa la producció local de citocines com TNF- α i IL-6, que perpetuen l'estat inflamatori i activen vies com el factor nuclear kappa B (NF- κ B) i la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), que interfereixen amb la transducció del senyal insulínic (21,22).

A nivell cel·lular, diversos mecanismes contribueixen a la RI. L'estrès del reticle endoplasmàtic (ER), induït per la sobrecàrrega secretora i l'excés de nutrients, activa la resposta a proteïnes desplegadas i compromet la funcionalitat dels substrats del receptor d'insulina (IRS) (22,23). La disfunció mitocondrial, habitual en l'obesitat, redueix la producció d'ATP i augmenta la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), afavorint l'estrès oxidatiu. A més, l'acumulació de lípids bioactius com ceramides i diacilglicerols activa quinases que bloquegen la senyalització insulínica, mentre que els àcids grassos saturats poden activar receptors tipus Toll (TLR4) i l'inflamasoma, exacerbant la inflamació metabòlica (24).

A mesura que la RI s'agreuja, les cèl·lules β pancreàtiques intenten compensar la pèrdua de sensibilitat perifèrica augmentant la secreció d'insulina. Aquesta fase compensatòria, però, pot fallar en individus amb predisposició genètica o exposicions metabòliques adverses, donant lloc a defectes funcionals precoços en la secreció d'insulina, fins i tot abans de produir-se una reducció significativa de la massa cel·lular (25). Amb el temps, la hiperglucèmia sostinguda genera un entorn de glucotoxicitat i lipotoxicitat que afavoreix l'estrès del ER, l'apoptosi cel·lular i la desdiferenciació de les cèl·lules β . L'activació de vies inflamàtores i la infiltració immune dels illots pancreàtics contribueixen encara més a la pèrdua de funció i massa β , determinant la transició cap a la diabetis manifesta (26–28).

La variabilitat interindividual en aquesta progressió metabòlica pot estar determinada per factors genètics que modulen la reserva funcional de les cèl·lules β i la seva capacitat adaptativa davant l'estrès metabòlic. S'han descrit variants en gens com *TCF7L2*, *KCNJ11* i *PPARG* associades a una major susceptibilitat a la DM2 (29). A més, factors ambientals com la dieta, l'activitat física i l'estrès psicosocial poden condicionar la velocitat de descompensació metabòlica i el moment d'aparició clínica de la malaltia (30).

1.2. El paper funcional de la microbiota intestinal en la regulació metabòlica

1.2.1. Composició i funcions generals de la microbiota intestinal

La MI humana constitueix un ecosistema dens i divers, amb una població estimada d'aproximadament $3,8 \times 10^{13}$ microorganismes i prop de 1.000 espècies diferents, que resideixen majoritàriament al còlon (31). Aquest ecosistema ha evolucionat en simbiosi amb l'hoste humà al llarg de milions d'anys, desenvolupant mecanismes sofisticats de comunicació bidireccional amb implicacions essencials en la regulació metabòlica, endocrina i immune (32).

Composició i diversitat microbiana

El genoma col·lectiu de la microbiota —conegut com a microbioma— conté aproximadament 3 milions de gens, enfront dels 23.000 del genoma humà, fet que reflecteix una capacitat metabòlica i funcional extraordinària (33). Els quatre fílums predominants són Firmicutes (60–80 %), Bacteroidetes (15–25 %), Actinobacteria (3–5 %) i Proteobacteria (<5 %) (34).

La composició i riquesa microbiana varien notablement entre individus i al llarg de la vida, influenciades per factors genètics, dietètics, ambientals, farmacològics i clínics. Durant la infància, la diversitat alfa —que mesura la riquesa i equitat d'espècies dins d'un individu— augmenta de forma progressiva fins a establitzar-se en l'edat adulta. La diversitat beta, que compara diferències entre individus o grups, permet identificar patrons associats a estils de vida, estats de salut o patologies (35).

Funcions metabòliques, endocrines i immunes

La MI exerceix múltiples funcions essencials:

- Fermentació de substrats no digerits (fibres i midons resistents), amb producció d'AGCC —acètic, propiònic i butíric—, que actuen com a fonts energètiques, moduladors de la sensibilitat insulínica i reguladors de la inflamació via receptors com *free fatty acid receptor 2/3* (FFAR2/GPR43 i FFAR3/GPR41) i com a inhibidors d'histona deacetilases (HDAC) (36,37).
- Síntesi de vitamines com riboflavina, niacina i folat, així com transformació d'àcids biliars, modulant l'activitat sobre receptors com el *farnesoid X receptor* (FXR) i

el *Takeda G-protein-coupled bile acid receptor 5* (TGR5, receptor d'àcids biliars unit a proteïna G), implicats en la regulació metabòlica i de la resposta inflamatòria (36).

- Estimulació de la secreció d'incrètines, com el GLP-1 i el pèptid YY (PYY), des de les cèl·lules enteroendocrines, amb efectes directes sobre la homeòstasi glucèmica i el control de la gana (37).
- Modulació del sistema immunitari, tant innat com adaptatiu, afavorint la maduració de la barrera epitelial intestinal i la tolerància immune (38).
- Producció de compostos neuroactius com serotonina, GABA, dopamina i endocannabinoides, que poden actuar a nivell local i sistèmic, contribuint a l'eix microbiota-intestí-cervell (39).

Implicacions per a la salut

En condicions d'eubiosi, la MI contribueix activament al manteniment de l'homeòstasi metabòlica, endocrina i immune. Tanmateix, alteracions en la seva composició i funcionalitat —conegudes com a disbiosi— poden comprometre aquestes funcions i s'han associat amb diverses malalties cròniques com l'obesitat, la diabetis tipus 2 i les malalties inflamatòries intestinals. Aquesta relació situa la microbiota com un element clau en la interacció entre nutrició, immunitat i metabolisme, així com un potencial objectiu terapèutic en l'abordatge de trastorns metabòlics i inflamatoris (35).

1.2.2. Producció de metabòlits bacterians: AGCC i altres compostos actius

La MI humana produeix una àmplia gamma de metabòlits bioactius, entre els quals els AGCC són els més abundants i fisiològicament rellevants (40,41). Els principals AGCC inclouen acetat, propionat i butirat, que representen aproximadament el 95 % del total produït al còlon. Aquests compostos actuen com a molècules de senyalització clau entre la microbiota i l'hoste, modulant processos metabòlics, immunitaris i endocrins essencials (40–42).

Acetat

És l'AGCC més abundant, amb més del 50 % del total detectat en femtes. Es forma principalment per fermentació de carbohidrats, tot i que un terç pot derivar de bacteris acetogènics a través de la via de Wood–Ljungdahl (40). Les vies de producció d'acetat estan àmpliament distribuïdes entre diferents grups bacterians (41).

Propionat

La seva síntesi es realitza mitjançant tres rutes principals: la via del succinat (dominant i característica de Bacteroidetes i algunes Firmicutes), la via de l'acrilat (a partir de lactat, en Veillonellaceae i Lachnospiraceae) i la via del propanodiol (a partir de desoxi-sucres) (40). L'abundància relativa de Bacteroidetes s'ha relacionat amb concentracions fecals de propionat, i espècies com *Akkermansia muciniphila* s'identifiquen com a productores clau associades a la degradació de mucina (41).

Butirat

Es produeix principalment a través de la via butiril-CoA:acetat CoA-transferasa, utilitzada per gèneres com *Faecalibacterium*, *Eubacterium* i *Roseburia*. La fermentació de midó resistent, dominada per *Ruminococcus bromii*, és una font clau de butirat. Malgrat la diversitat microbiana intestinal, només un petit nombre d'espècies sembla responsable de la major part de la seva producció (40,41).

Alimentació creuada bacteriana (cross-feeding)

Els AGCC també es generen gràcies a la cooperació metabòlica entre espècies. Per exemple, *Faecalibacterium prausnitzii* pot utilitzar l'acetat produït per *Bacteroides thetaiotaomicron*, mentre que els bifidobacteris generen lactat i acetat que serveixen de substrat per a bacteris butirogènics com *Roseburia* o *Eubacterium* (40). Aquest mecanisme garanteix una explotació més eficient dels substrats disponibles i contribueix a l'equilibri final d'AGCC.

Altres metabòlits bacterians

A més dels AGCC principals, la fermentació microbiana genera altres compostos rellevants. El lactat, produït per la fermentació de carbohidrats ràpidament fermentables, és utilitzat per altres espècies en vies de *cross-feeding*. El formiat participa en processos com la metanogènesi i augmenta en condicions inflamatòries. La fermentació dels aminoàcids provinents de les proteïnes dona lloc a la formació d'aminoàcids de cadena ramificada (BCAA), que poden intervenir en diversos processos de regulació metabòlica (41).

La informació resumida sobre els principals AGCC i altres metabòlits bacterians, incloent-ne les vies de producció, els efectes fisiològics i les referències clau, es presenta a la Taula 1.

Taula 1. Àcids grassos de cadena curta (AGCC) i altres metabòlits: síntesi i efectes principals

Metabòlit	Fonts principals	Funcions clau	Implicacions metabòliques i clíniques	Referències
Acetat	Fermentació de carbohidrats; via acetogènica	Substrat energètic; lipogènesi hepàtica; activació de GPCR	Regula la gana i la síntesi lipídica; increment circulant d'AGCC associat a millora metabòlica	(40–43)]
Propionat	Vies del succinat, acrilat i propanodiol; degradació de mucina (<i>A. muciniphila</i>)	Substrat gluconeogènic hepàtic; inhibició de lipogènesi	Redueix triglicèrids intrahepàtics; millora sensibilitat a la insulina	(40–43)
Butirat	Fermentació de midó resistent i fibres; productors clau (<i>F. prausnitzii</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Eubacterium</i>)	Font energètica de colonòcits; inhibidor d'HDAC; activació d'AMPK	Millora homeòstasi glucèmica, sensibilitat a la insulina i té efectes antiinflamatoris i protectors en obesitat i DM2	(41,42,44)
Lactat	<i>Bifidobacterium</i> i altres bacteris fermentadors	Metabòlit intermedi; substrat per a propionat i butirat	Modulació del pH intestinal; font per a <i>cross-feeding</i>	(41)
Formiat	Producte secundari de fermentació	Substrat per a metanògens com <i>M. smithii</i>	Contribueix a l'eliminació d'H ₂ i millora l'eficiència fermentativa	(45)
BCAA	Fermentació d'aminoàcids de cadena ramificada	Substrats alternatius; producció de compostos nitrogenats	Poden contribuir a inflamació intestinal i desregulació metabòlica	(41)

Nota. BCAA: aminoàcids ramificats; GLP-1: pèptid similar al glucagó tipus 1; GPCR: receptors acoblats a proteïna G; PYY: pèptid YY; HDAC: histona desacetilasa; DM2: diabetis mellitus tipus 2.

Metanogènesi i *Methanobrevibacter smithii*

L'arquea *Methanobrevibacter smithii* és el principal metanògen intestinal i té un paper crucial en l'eliminació d'hidrogen i altres subproductes de la fermentació, millorant així l'eficiència energètica global de la microbiota. Aquesta espècie pot consumir format, H₂, metanol i etanol, i estableix interaccions sintròfiques amb bacteris com *B. thetaiotaomicron*, afavorint la producció d'acetat (45).

Mecanismes moleculars d'acció

Els AGCC, especialment el butirat, actuen com a moduladors epigenètics, inhibint HDAC i regulant així l'expressió gènica immune i metabòlica (42). A més, activen receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) com FFAR2/GPR43 i FFAR3/GPR41, presents en cèl·lules immunitàries, adipòcits i cèl·lules enteroendocrines, modulant la secreció d'hormones intestinals, també anomenades Incretines, com el GLP-1 i el PYY (42,46). Finalment, presenten funcions específiques en el metabolisme energètic: el butirat és la font energètica preferida dels colonòcits, el propionat s'utilitza al fetge com a substrat gluconeogènic i l'acetat és l'AGCC més abundant en circulació (42).

Efectes fisiològics i implicacions clíniques

Els AGCC impacten en múltiples dimensions de la salut metabòlica. En l'àmbit hormonal, com s'ha mencionat, afavoreixen la secreció de GLP-1 i PYY, contribuint a la regulació de la glucèmia i de la ingesta alimentària (46,47). En el metabolisme de la glucosa, el propionat redueix triglicèrids intrahepàtics i millora la sensibilitat insulínica, mentre que el butirat redueix la glucèmia i millora el control ponderal (41,44). En relació amb el metabolisme lipídic, el propionat inhibeix la lipogènesi de novo i la colesterogènesi, mentre que l'acetat hi contribueix (41). Finalment, el butirat exerceix efectes antiinflamatoris a través de la inhibició de NF- κ B i HDAC, i redueix citocines proinflamatòries com TNF- α , MCP-1 i IL-1 β en models animals (41,44).

Aquests mecanismes expliquen per què nivells reduïts de bacteris productors de butirat i alteracions en el perfil d'AGCC s'han associat amb obesitat, diabetis tipus 2 i malaltia renal diabètica (44,48,49). A més, estudis recents mostren que la dieta mediterrània pot potenciar la producció d'AGCC i reforçar la integritat de la barrera intestinal mitjançant la millora de les unions estretes epitelials i la reducció de la permeabilitat intestinal, mecanismes directament dependents de l'activitat del butirat (50,51).

1.2.3. Interacció entre disbiosi, alteració de la barrera intestinal i inflamació de baix grau

La interacció entre la MI, la integritat de la barrera epitelial i la inflamació sistèmica constitueix un eix fisiopatològic fonamental en el desenvolupament de malalties metabòliques com l'obesitat i la DM2 (52,53). La disbiosi afavoreix la disrupció de la barrera intestinal i així, la translocació de productes microbians, que actuen com a inductors d'inflamació crònica de baix grau i contribueixen a la RI i a la disfunció metabòlica (54).

Disbiosi i composició microbiana

La disbiosi es defineix com una alteració qualitativa i quantitativa de la comunitat intestinal que compromet la seva funció metabòlica i immune. En condicions d'obesitat, s'ha descrit un increment de Firmicutes i Actinobacteria i una disminució concomitant de Bacteroidetes, un patró que afavoreix una major extracció d'energia de la dieta i l'acumulació lipídica en el teixit adipós (54).

Integritat de la barrera intestinal i translocació bacteriana

La barrera intestinal és la primera línia de defensa contra la translocació bacteriana. La seva integritat depèn de proteïnes de les unions estretes (*tight junction proteins*), com la zonula occludens-1 (ZO-1) i la occludina, que es veuen alterades en models animals d'obesitat i DM2 (52). Aquesta disrupció augmenta la permeabilitat paracel·lular i permet el pas de lipopolisacàrids (LPS) i altres productes microbians cap a la circulació sistèmica, procés que es coneix com a endotoxèmia metabòlica, caracteritzada per nivells crònicament elevats de LPS (53,54). Estudis en ratolins mostren que una dieta rica en greixos augmenta la translocació bacteriana, amb detecció de bacteris Gram-negatius i *E. coli* en mucosa ileal, sang i teixit adipós mesentèric (55).

La incretina GLP-2, secretat per cèl·lules enteroendocrines, juga un paper clau en aquest procés: la suplementació amb fructooligosacàrids (FOS) en ratolins obesos augmenta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, restaura la permeabilitat intestinal i redueix la endotoxèmia, efecte que desapareix quan s'administra un antagonista del GLP-2. L'administració directa de GLP-2 millora de manera similar la permeabilitat i la inflamació sistèmica (56).

Mecanismes moleculars implicats

Diversos mecanismes connecten disbiosi, alteració de la barrera i inflamació sistèmica:

- **Sistema endocannabinoide (eCB):** en obesitat, l'eCB es troba sobreactivat tant a l'intestí com al teixit adipós, amb augments d'anandamida (AEA), activació del receptor CB1 i reducció de l'enzim degradador FAAH. El bloqueig del receptor CB1 redueix la permeabilitat intestinal, els nivells plasmàtics de LPS i la inflamació hepàtica, mentre que la seva activació té efectes contraris (52,53,56). Tanmateix, resultats en models KO de CB1 suggereixen que el seu paper pot dependre del context, ja que aquests animals presenten disfunció addicional de la barrera colònica (56).
- **AGCC:** especialment el butirat, mantenen l'energia dels enteròcits, estimulen l'expressió de proteïnes de les unions estretes regulant la barrera intestinal i exerceixen efectes antiinflamatoris via inhibició de HDAC. La disbiosi redueix la producció d'AGCC i debilita la funció de barrera intestinal (53).
- **Activació immune via TLR4/NF- κ B:** durant la endotoxèmia sistèmica el LPS translocat activa receptors TLR4 en cèl·lules immunitàries i parenquimals, iniciant una cascada que culmina en l'activació de NF- κ B i en la producció de citocines proinflamatòries (TNF- α , IL-6, IL-1 β). La cooperació entre TLR2 i TLR4 afavoreix l'activació de quinases inflamatòries (JNK, IKK β), que interfereixen amb la senyalització insulínica mitjançant la fosforilació inhibidora de l'IRS-1 (substrat 1 del receptor d'insulina) (54).
- **Alteració de defenses epitelials:** la disbiosi pot afectar les cèl·lules de Paneth, productores de pèptids antimicrobians com les defensines i la lisozima, afavorint l'expansió de Proteobacteria i perpetuant el cercle de permeabilitat intestinal-endotoxèmia-inflamació sistèmica (53).

Conseqüències metabòliques i sistèmiques

Aquest eix microbiota–alteració de la barrera intestinal–inflamació promou un estat d'inflamació crònica de baix grau que deteriora la senyalització insulínica i contribueix a la progressió cap a la DM2 (54). L'impacte metabòlic s'estén també al teixit adipós: ratolins lliures de gèrmens presenten un 40 % menys de massa grassa que els convencionalitzats, mentre que la transferència de microbiota d'individus amb obesitat indueix un augment de la quantitat de massa grassa (53). A més, biomarcadors indicatius d'una permeabilitat intestinal elevada s'han associat a inflamació sistèmica i deteriorament cognitiu en cohorts humanes (32).

En conjunt, aquests mecanismes evidencien com la disbiosi i la pèrdua d'integritat de la barrera intestinal estableixen una dinàmica de retroalimentació d'inflamació i disfunció metabòlica, que obre la porta a noves estratègies terapèutiques basades en la modulació de la microbiota.

1.2.4. Interacció entre microbiota i sistema endocrí intestinal

La MI exerceix un paper clau en la regulació del sistema endocrí intestinal a través de la modulació de les cèl·lules enteroendocrines i la secreció d'hormones intestinals, establint un eix de comunicació essencial per al control de l'homeòstasi energètica i glucèmica.

Cèl·lules enteroendocrines: interfície microbiota-hoste

Les cèl·lules enteroendocrines (EECs) constitueixen el major òrgan endocrí del cos humà i són responsables de la secreció de més de 20 hormones diferents al llarg del tracte gastrointestinal (57). Actuen com a sensors químics, detectant nutrients i metabòlits derivats de la MI mitjançant receptors a les membranes apical i basolateral, i responen amb la secreció d'hormones que regulen el metabolisme energètic i glucídica. La MI influeix de manera decisiva en la maduració, densitat i funció de les EECs, modulant els perfils de secreció hormonal (57,58). Els estudis amb ratolins lliures de gèrmens han mostrat alteracions en la detecció de nutrients i en la secreció de GLP-1 i PYY, demostrant la importància de la microbiota en la fisiologia enteroendocrina (58).

Metabòlits microbians com a reguladors horminals

Els productes metabòlics de la microbiota actuen com a senyals clau en la regulació endocrina intestinal:

- **AGCC:** acetat, propionat i butirat estimulen la secreció de GLP-1 i PYY a través dels receptors FFAR2/GPR43 i FFAR3/GPR41 en cèl·lules L intestinals, així com mitjançant mecanismes intracel·lulars dependents d'ATP i calci (36,46,57).
- **Àcids biliars modificats:** els àcids biliars secundaris, com l'àcid desoxicòlic (DCA) i l'àcid litocòlic (LCA), activen TGR5, estimulants la secreció de GLP-1 i PYY i millorant la tolerància a la glucosa. En canvi, l'activació de FXR principalment per l'àcid quenodesoxicòlic (CDCA), redueix la secreció de GLP-1 mitjançant la regulació a la baixa del gen del proglucagó (36,37,57).
- **Metabòlits del triptòfan:** Els derivats indòlics activen el receptor d'hidrocarburs arílics (AhR, *aryl hydrocarbon receptor*), estimulants la secreció de GLP-1 i

exercint efectes antiinflamatoris hepàtics (36). Paral·lelament, l'indol activa el receptor potencial transitori de tipus A1 (TRPA1, *transient receptor potential ankyrin 1*) a les cèl·lules enterocromafins, afavorint l'alliberament de serotonina (5-HT), un neurotransmissor intestinal clau en la motilitat (57,58).

Hormones intestinals clau i disbiosi

- **GLP-1:** incretina secretada per les cèl·lules L intestinals que estimula la secreció d'insulina, inhibeix la secreció de glucagó i retarda el buidatge gàstric. La microbiota modula el seu alliberament a través dels AGCC i dels àcids biliars (37,46,57).
- **PYY:** co-secretat amb GLP-1, redueix la ingesta alimentària i la motilitat intestinal mitjançant l'activació dels receptors Y2 localitzats principalment a l'hipotàlem i a les aferències vagals. Els AGCC i els àcids biliars també en regulen la secreció (46,57).
- **GIP:** secretat per les cèl·lules K intestinals, respon especialment als greixos de la dieta. El butirat i el propionat poden estimular-ne l'alliberament, tot i que el seu paper en l'obesitat i la DM2 continua en discussió (37,57).
- **GLP-2:** co-secretat amb GLP-1, té efectes tròfics sobre la mucosa intestinal, millorant la integritat de la barrera i reduint la permeabilitat (59).
- **Serotonina (5-HT):** produïda per les cèl·lules enterocromafins, està fortament modulada per la microbiota, especialment per bacteris productors d'espores com Clostridiales (57,58).

En la disbiosi associada a l'obesitat i DM2, es redueix la producció d'AGCC i la secreció de GLP-1 i PYY, afavorint un estat de RI, hiperfàgia i acumulació de greix visceral (20,58).

Per sintetitzar els principals mecanismes descrits, a la Taula 2 es resumeixen les principals hormones intestinals regulades per la microbiota, els seus efectes metabòlics i els metabòlits bacterians implicats.

Taula 2. Regulació hormonal intestinal per metabòlits derivats de la microbiota

Metabòlit microbià	Receptor/s implicat/s	Hormona/s regulades	Efectes metabòlics principals	Ref.
AGCC (acetat, propionat, butirat)	FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41), mecanismes intracel·lulars dependents d'ATP	GLP-1, PYY, GIP	↑ secreció d'insulina, ↑ sacietat, ↓ buidament gàstric, millora sensibilitat insulínica	(36,46, 57,58)
Àcids biliars secundaris (LCA, DCA)	TGR5, FXR	GLP-1, PYY (TGR5); inhibició GLP-1 (FXR)	↑ tolerància a la glucosa, ↑ oxidació lipídica, millora funció barrera intestinal	(36,37, 57)
Derivats del triptòfan (indol, indol-3-acetat, IPA)	AhR, TRPA1	Serotonina (5-HT), GLP-1	↑ motilitat intestinal, modulació inflamació hepàtica, preservació funció β-pancreàtica	(36,57, 58)
5-HT (produïda per bacteris Clostridial i EECs)	Receptors 5-HT (entèrics i centrals)	5-HT	↑ motilitat intestinal, regulació glucosa i lípids en teixits perifèrics	(57,58)
Prebiòtics (inulina, oligofructans) → producció AGCC i modulació microbiota	FFAR2, GLP-1R	GLP-1, PYY, GLP-2	↑ sacietat, ↑ funció barrera intestinal, ↓ inflamació sistèmica	(58,60)

AGCC: àcids grassos de cadena curta; LCA: àcid litocòlic; DCA: àcid desoxicòlic; FFAR2/3: receptors d'àcids grassos lliures 2 i 3 (GPR43/GPR41); FXR: receptor farnesoide X; AhR: receptor d'hidrocarburs arílics; TRPA1: receptor potencial transitori de tipus A1; 5-HT: serotonina; EECs: cèl·lules enteroendocrines; GLP-1: peptid similar al glucagó tipus 1; GLP-2: peptid similar al glucagó tipus 2; PYY: peptid YY; GIP: peptid insulínotrop dependent de glucosa; GLP-1R: receptor de GLP-1.

Implicacions clíniques i terapèutiques

La modulació de la microbiota podria restaurar l'eix incretines-intestí-metabolisme. Els prebiòtics, com la inulina i els oligofructans, promouen el creixement de bacteris productors d'AGCC i milloren la secreció de GLP-1 i PYY, afavorint així la sacietat i la reducció de la ingesta (58). De manera similar, la dieta mediterrània, rica en fibra i polifenols, augmenta la diversitat microbiana i potencia la producció d'AGCC, amb efectes beneficiosos sobre la regulació hormonal i la resposta inflamatòria (60). Finalment, la CB, especialment el BPG, s'associa amb un augment sostingut de GLP-1 i GLP-2, que contribueix a la millora metabòlica observada després de la intervenció (59).

Així, la interacció bidireccional microbiota–sistema endocrí intestinal s'ha consolidat com un eix fonamental en la regulació metabòlica i representa una diana terapèutica prometedora i segurament important per a l'obesitat i la DM2.

1.2.5. Relació entre microbiota intestinal i obesitat

L'obesitat es caracteritza per una etiologia complexa que inclou factors dietètics, genètics i ambientals. Entre aquests, la MI ha emergit com un modulador clau del balanç energètic i del metabolisme lipídic i glucídic (61,62). Els estudis en animals i en humans han demostrat diferències característiques tan en la composició com en la funció microbiana entre individus amb obesitat i individus amb normopès (43,63).

Canvis de composició microbiana associats a obesitat

La MI està constituïda bàsicament per cinc fílums principals: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria i Verrucomicrobia (64). En l'obesitat, sovint s'observa un augment relatiu de Firmicutes i una reducció de Bacteroidetes, tot i que aquest patró no és universal en totes les cohorts (61,65). En models animals, els ratolins amb obesitat (ob/ob) mostren una proporció de Bacteroidetes un 50% inferior i un augment relatiu de Firmicutes en comparació amb els controls normopès (61). De manera similar, alguns estudis en humans han associat un increment de la relació Firmicutes/Bacteroidetes amb una major capacitat d'extracció energètica dels nutrients, és a dir, una eficiència més gran en la fermentació i aprofitament calòric dels substrats no digeribles (64).

Bacteris associats a un perfil metabòlic saludable

Akkermansia muciniphila és un bacteri degradador de mucina inversament correlacionat amb obesitat i síndrome metabòlica (66,67). La seva abundància s'associa a un perfil inflamatori i metabòlic més favorable, ja que restaura la capa de mucina intestinal, millorant la integritat de la barrera intestinal, reduint l'endotoxèmia metabòlica, inhibeix el sistema endocannabinoide estimulando l'alliberament de GLP-1 i GLP-2, i incrementa la secreció de pèptids antimicrobians. Aquest efecte només s'observa amb bacteris vius, no amb cèl·lules inactivades (67).

La família Christensenellaceae (dins el fílum Firmicutes) també s'ha relacionat amb un fenotip més magre. És el tàxon més heretable de la MI ($h^2 = 0,39$), i es troba en major abundància en individus primis i en menor proporció en persones amb obesitat o síndrome metabòlica. L'addició experimental de *Christensenella minuta* a mostres fecals humanes va reduir guany ponderal i adipositat en ratolins, reforçant el seu paper protector (68).

Disminució de bacteris productors de butirat

Un tret comú en l'obesitat és la reducció d'espècies productores de butirat, especialment *Faecalibacterium prausnitzii* (64,69). El butirat té efectes antiinflamatoris i preserva la integritat de la barrera intestinal (69). Així mateix, també s'ha observat una reducció de *Roseburia spp.*, un altre gènere productor de butirat, i la seva restauració mitjançant prebiòtics s'ha associat amb millores en la sensibilitat insulínica, la homeòstasi glucèmica i el perfil inflamatori (53).

Mecanismes fisiopatològics

- **Extracció energètica augmentada:** la microbiota d'individus amb obesitat és més eficient en degradar polisacàrids complexos i generar AGCC, augmentant la disponibilitat energètica (61,62).
- **Regulació lipogènica:** la colonització microbiana induïx l'expressió d'enzims lipogènics hepàtics com l'acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) i la sintasa d'àcids grassos (FAS), així com de factors de transcripció com el *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1* (SREBP-1) i el *Carbohydrate Response Element-Binding Protein* (ChREBP), afavorint l'acumulació de triglicèrids. A més, la supressió del *fasting-induced adipose factor* (FIAF), també conegut com a *angiopoietina-like 4* (ANGPTL4), a l'epiteli intestinal augmenta l'activitat de la lipoproteïna lipasa (LPL) en adipòcits (62).

- **Inflamació i endotoxèmia metabòlica:** la disbiosi afavoreix la translocació de LPS, que activa TLR4 i la cascada NF- κ B, promovent la producció de citocines proinflamatòries (TNF- α , IL-6, IL-1 β). L'activació concomitant de JNK i IKK (IkB quinasa) altera la senyalització de la insulina mitjançant la fosforilació de l'IRS-1 (63).
- **Regulació hormonal:** les alteracions en la secreció de GLP-1, PYY i GLP-2, així com de serotonina, contribueixen a l'augment de la ingesta i la RI (53,64).

Evidència en models animals i humans

Els trasplantaments fecals han demostrat que la microbiota d'individus amb obesitat pot transferir el fenotip obesitat a ratolins lliures de gèrmens (61). Estudis de bessons discordants i cohorts humanes mostren que una baixa diversitat microbiana es correlaciona amb obesitat, RI i inflamació sistèmica (68,70). A més, perfils microbians específics, com l'enriquiment en *Prevotella copri*, s'han associat amb major risc de progressió de NAFLD a NASH (71).

Estudis recents suggereixen que dins de la població amb obesitat poden identificar-se subgrups diferenciats segons el perfil de MI, amb diferències en paràmetres metabòlics i inflamatoris. Un treball basat en el perfilatge de vesícules extracel·lulars fecals (EVs) va descriure dos enterotips principals: un de predominat per *Prevotellaceae*, associat a menor diversitat microbiana i nivells més elevats d'IL-1 β , i un altre de predominat per *Akkermansia/Bacteroides*, vinculat a menor inflamació sistèmica i perfils metabòlics més favorables (72). Aquestes dades reforcen la idea que la composició i activitat funcional de la microbiota pot ajudar a explicar la heterogeneïtat clínica de l'obesitat i a estratificar el risc metabòlic entre individus aparentment similars.

Factors moduladors

- **Dieta:** una dieta alta en greixos i sucres afavoreix disbiosi i endotoxèmia metabòlica (64,70).
- **Fibra i dieta mediterrània:** dietes riques en fibra, com la mediterrània, promouen la producció d'AGCC i milloren la salut metabòlica (70).
- **Prebiòtics:** compostos com la inulina i els arabinòxilans afavoreixen bacteris beneficiosos (*Bifidobacterium spp.*, *Akkermansia muciniphila*, *F. prausnitzii*) i redueixen l'endotoxèmia (53).

Síntesi i implicacions clíniques

La relació entre microbiota i obesitat és bidireccional: l'obesitat altera la comunitat microbiana, mentre que la disbiosi contribueix a l'acumulació de greix i a la disfunció metabòlica. Els trets més característics inclouen un augment relatiu de *Firmicutes*, una reducció de *Bacteroidetes*, la pèrdua d'espècies productores de butirat i una menor diversitat microbiana. Aquests canvis afavoreixen una extracció energètica més eficient dels nutrients, un estat inflamatori de baix grau i alteracions en la regulació hormonal i de la barrera intestinal, situant la microbiota com un actor clau en la fisiopatologia de l'obesitat i les seves complicacions metabòliques (53,66,67,70).

Tanmateix, la relació entre microbiota i obesitat no és homogènia. Els patrons microbians varien entre individus i poden explicar diferències en el risc metabòlic i inflamatori. Aquesta heterogeneïtat reforça la idea que el perfil de la MI pot ser una eina útil per estratificar subtipus d'obesitat i orientar intervencions més personalitzades.

1.2.6. Relació entre microbiota intestinal i diabetis tipus 2

La DM2 s'ha associat de manera consistent amb alteracions en la composició i funció de la MI. Aquestes alteracions impacten en mecanismes clau com la producció d'AGCC, la modulació de la inflamació de baix grau, la regulació de la permeabilitat intestinal i la secreció d'incretines, establint un eix microbiota-intestí-hoste que contribueix a la patogènesi de la malaltia (20,73).

Canvis composicionals i pèrdua de diversitat

Les primeres evidències metagenòmiques van mostrar que la DM2 s'associa amb una pèrdua de diversitat i una disbiosi caracteritzada per una reducció de *Bacteroides* i un augment de gèneres com *Dorea*, *Prevotella* i *Collinsella* (74). Estudis posteriors van confirmar una disminució de bacteris productors de butirat (*Clostridium spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*) i un augment d'espècies de *Lactobacillus*, correlacionats amb pitjors perfils metabòlics (75). La reducció de bacteris butirogènics és especialment rellevant, ja que el butirat reforça la barrera intestinal i té efectes antiinflamatoris (76).

En estudis longitudinals, la diversitat microbiana es veu disminuïda en pacients amb DM2 recentment diagnosticada, mentre que millora parcialment amb el tractament farmacològic, coincidint amb la recuperació de gèneres com *Akkermansia* i *Blautia* (77). Això suggereix que alguns trets de disbiosi podrien ser reversibles.

Evidència en prediabetis

Les alteracions microbianes apareixen ja en fases de prediabetis (preDM), amb una reducció de *A. muciniphila* i espècies de *Clostridium*, juntament amb un augment de gèneres com *Dorea*, *Ruminococcus* i *Streptococcus* (78). Aquesta disbiosi primerenca s'ha vinculat a inflamació sistèmica de baix grau, la qual cosa reforça la seva possible implicació en la transició cap a DM2.

Espècies clau i rols funcionals

Faecalibacterium prausnitzii i *Roseburia* són bacteris butirogènics que es troben sistemàticament reduïts en la DM2, la qual cosa compromet la producció d'AGCC i la regulació epigenètica i endocrina intestinal (75,76).

Akkermansia muciniphila presenta una abundància disminuïda en preDM, però estudis recents han evidenciat un paper protector: secreta la proteïna P9, capaç d'induir GLP-1 i millorar la termogènesi, a més de modular vies com PI3K–Akt (relacionada amb la RI) i FGF19 (homeòstasi àcids biliars i metabolisme hepàtic) (79,80). Tant la suplementació amb *Akkermansia* viva com pasteuritzada millora la funció de la barrera intestinal i l'endotoxèmia metabòlica, i la seva abundància augmenta sota tractament amb metformina (77,79,80).

Prevotella copri té un paper controvertit: mentre algunes soques produeixen AGCC beneficiosos, altres sintetitzen BCAA, LPS i metabòlits del triptòfan, associant-se a RI i inflamació (81,82). Aquesta heterogeneïtat suggereix que l'impacte de *P. copri* depèn de la soca dominant en cada microbioma.

Mecanismes fisiopatològics

- **Reducció d'AGCC:** menor producció de butirat i propionat → menys estímul incretínic (GLP-1, PYY), alteració del metabolisme glucídic i pèrdua d'efectes antiinflamatoris (73,76).
- **Endotoxèmia metabòlica:** augment de LPS de bacteris gramnegatius (Proteobacteria) → activació TLR4/NF-κB → secreció de citocines (IL-1, IL-6, TNF-α) → RI i inflamació sistèmica (73).
- **Alteració d'àcids biliars:** reducció d'àcids biliars secundaris → desregulació de FXR/TGR5 → impacte en metabolisme glucídic, lipídic i inflamació (76).
- **Metabolisme de carbohidrats:** pacients amb RI mostren un augment de monosacàrids fecals (fructosa, galactosa, manosa, xilosa) i alteració de glicosidases bacterianes, amb correlació negativa amb bacteris com *Bacteroides* i *Alistipes* (83).

La Figura 1 il·lustra de manera esquemàtica l'impacte de la disbiosi intestinal sobre la salut metabòlica mitjançant diversos mecanismes interrelacionats.

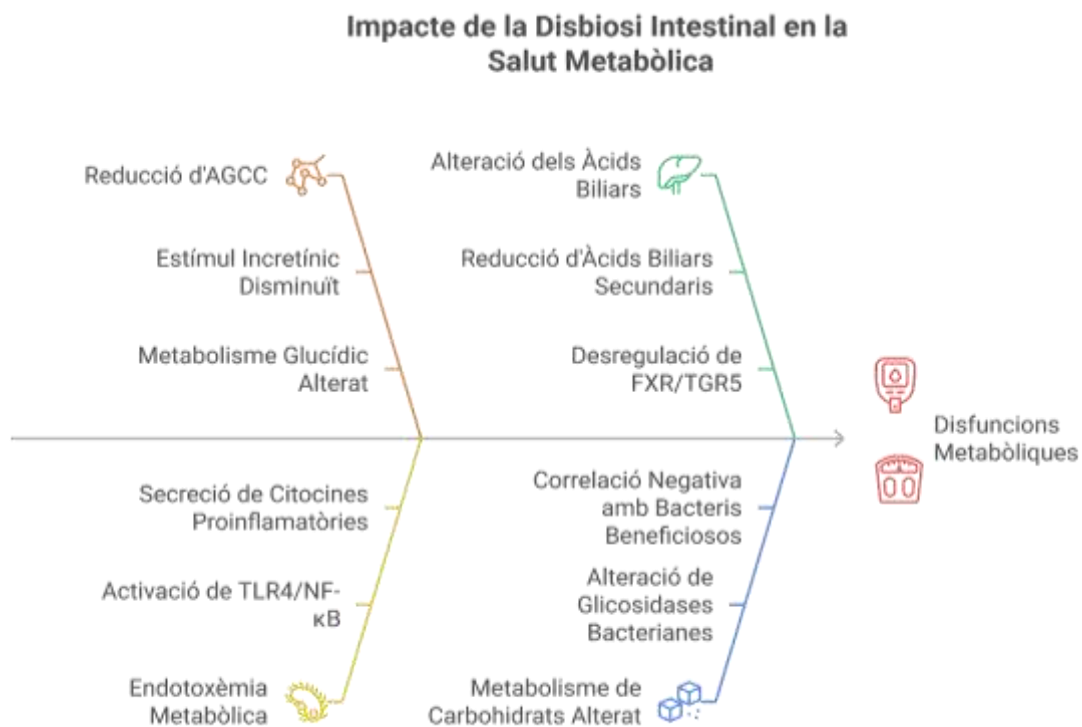


Figura 1. Impacte de la disbiosi intestinal en la salut metabòlica. La reducció d'AGCC, l'alteració dels àcids biliars i l'activació de vies inflamatòries contribueixen al desenvolupament de disfuncions metabòliques. *Figura elaborada per l'autora amb Napkin.*

Evidència experimental i clínica

Els trasplantaments fecals han confirmat que la microbiota d'individus amb RI pot transferir el fenotip metabòlic a ratolins, augmentant BCAA circulants i reduint la sensibilitat a la insulina (81). En humans, diversos assaigs mostren que el trasplantament fecal de donants sans millora paràmetres glucèmics en pacients amb DM2, tot i que els resultats són encara heterogenis (84).

Implicacions clíniques i terapèutiques

La metformina, a més del seu efecte directe, actua modulant la microbiota, afavorint l'expansió d'*Akkermansia* i millorant la producció d'AGCC (80). La dieta mediterrània i la fibra fermentable promouen la diversitat microbiana i els bacteris beneficiosos, mentre que els prebiòtics (com la inulina) i probiòtics específics han mostrat millores en la secreció d'incretines i la RI (79,84). El desenvolupament de postbiòtics (per exemple, la

proteïna P9) i d'intervencions personalitzades segons signatures microbianes constitueix una de les línies més prometedores de recerca.

La DM2 s'associa amb una disbiosi intestinal caracteritzada per la pèrdua de bacteris beneficiosos productors de butirat, alteracions en espècies clau com *A. muciniphila* i *P. copri*, reducció d'AGCC i endotoxèmia metabòlica. Malgrat la variabilitat interindividual i metodològica, aquestes troballes consoliden la microbiota intestinal com un actor central en la fisiopatologia de la DM2 i com una potencial diana terapèutica.

L'eix microbiota–intestí–metabolisme i els seus desequilibris en disbiosi es representen a la Figura 2.

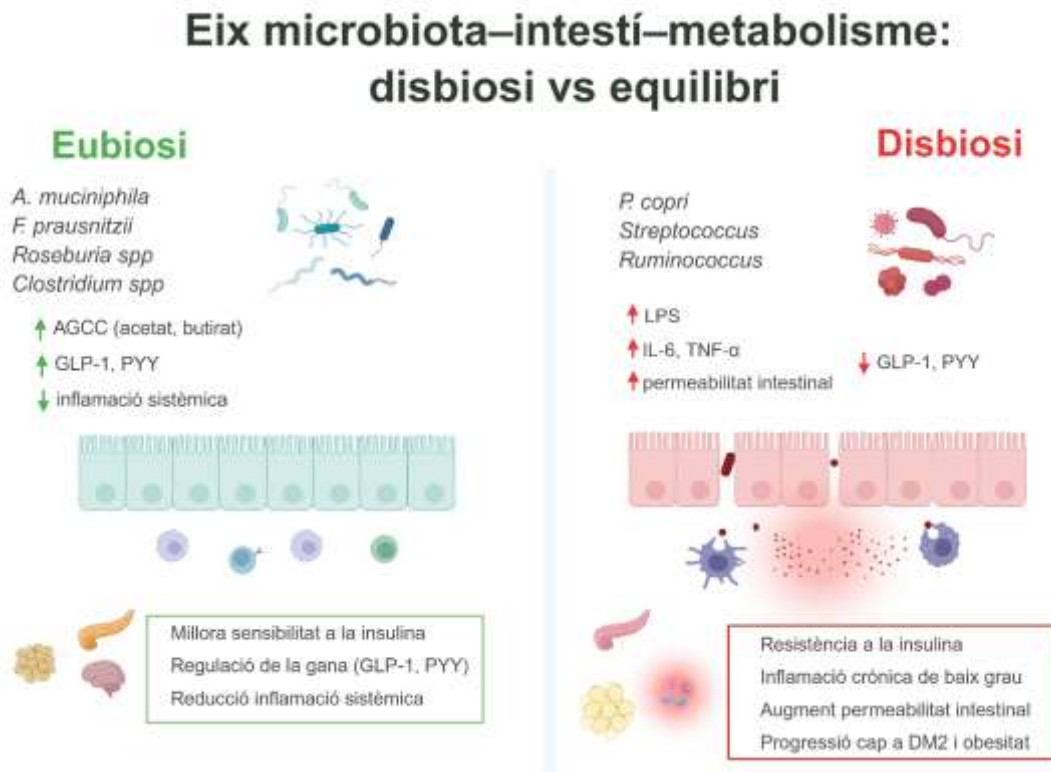


Figura 2. Eix microbiota–intestí–metabolisme en condicions d'eubiosi i disbiosi.

En l'eubiosi, els bacteris productors d'AGCC estimulen la secreció d'hormones intestinals com GLP-1 i PYY, afavorint la sacietat, la sensibilitat a la insulina i la integritat de la barrera intestinal. En la disbiosi, la reducció d'aquests bacteris i l'augment de LPS proinflamatoris promouen la secreció de citocines (IL-6, TNF-α) i la resistència insulínica, contribuint al desenvolupament de DM2. AGCC, àcids grassos de cadena curta; GLP-1, glucagon-like peptide 1; PYY, pèptid YY; LPS, lipopolisacàrid; IL-6, interleucina 6; TNF-α, factor de necrosi tumoral alfa; DM2, diabetis mellitus tipus 2. *Figura elaborada per l'autora amb BioRender.*

1.3. La cirurgia bariàtrica com a model d'estudi de la interacció microbiota-incretines-metabolisme

Entre les modalitats de tractament disponibles per a l'obesitat, la CB ha demostrat de manera consistent una eficàcia superior en la reducció de la morbiditat associada, resultant en una pèrdua de pes significativa i sostinguda, una millora del metabolisme de la glucosa i una disminució de la inflamació sistèmica (85,86). A diferència de les estratègies convencionals —farmacològiques o dietètiques—, la CB modifica de manera directa la fisiologia gastrointestinal i endocrina, produint canvis metabòlics profunds que van més enllà de la simple restricció calòrica i que possiblement contribueixen a l'efecte terapèutic principal que és la pèrdua de pes(87,88).

Els efectes beneficiosos s'observen sovint en el període postoperatori immediat, abans d'una pèrdua ponderal rellevant, la qual cosa suggereix l'existència de mecanismes independents de la pèrdua de pes corporal (59,89). Tanmateix, diversos estudis han posat de manifest resultats divergents en els efectes a llarg termini dels diferents procediments sobre les comorbiditats metabòliques, incloent la DM2, la dislipèmia i la hipertensió arterial (89,90).

En aquest context, és essencial comprendre com els diferents tipus de CB —principalment el BPG i la SG— actuen sobre la fisiologia digestiva i endocrina per generar aquests efectes metabòlics profunds.

Els següents apartats descriuen, en primer lloc, els mecanismes i resultats globals d'aquestes tècniques i, posteriorment, la seva interacció amb la microbiota intestinal i la resposta hormonal postquirúrgica.

1.3.1. Tipus de cirurgia bariàtrica i efectes metabòlics generals

La CB engloba un conjunt de procediments amb mecanismes fisiològics diferenciats que actuen més enllà de la simple restricció calòrica. A diferència de les estratègies convencionals, la CB modifica profundament la funció gastrointestinal i endocrina, provocant millores metabòliques que sovint es manifesten abans d'una pèrdua ponderal rellevant (87,88).

Les dues tècniques principals —el BPG i la SG— combinen en diferents proporcions efectes restrictius, malabsortius i hormonals. El BPG crea una petita bossa gàstrica i deriva el flux alimentari cap a l'intestí distal, afavorint l'estimulació de les cèl·lules L secretores d'incretines (59). En canvi, la SG redueix el volum gàstric en aproximadament

un 80%, eliminant el fundus —principal font de grelina— i modificant el flux de nutrients sense desviació intestinal (85,90).

Aquestes transformacions anatòmiques desencadenen canvis immediats en la secreció d'hormones intestinals, la sensibilitat a la insulina i la composició de la microbiota, configurant un nou estat metabòlic que sovint precedeix la pèrdua de pes (88,89).

Les millores en el control glucèmic són especialment rellevants: les concentracions postprandials de GLP-1 i PYY poden augmentar entre 10 i 20 vegades després del BPG, contribuint a normalitzar els seus valors, a la restauració de la secreció d'insulina dependent de glucosa i a la reducció de la gana (59). Paral·lelament, s'observen també efectes favorables sobre el perfil lipídic (↓ triglicèrids, ↑ HDL), la tensió arterial i els marcadors inflamatoris sistèmics (86,89).

Les taxes de remissió de la DM2 es situen habitualment entre el 60–80% als dos anys (85,87). En estudis comparatius, el BPG mostra una resposta hormonal més pronunciada i una millora superior de la sensibilitat a la insulina que la SG, tot i que aquesta última presenta resultats similars de resolució o millora glucèmica i una recuperació més ràpida de la teràpia antidiabètica (89,91).

1.3.2. Remodelació de la microbiota intestinal i resposta hormonal postquirúrgica

Més enllà dels canvis anatòmics i hormonals descrits, la CB indueix una transformació profunda en la microbiota intestinal que contribueix de manera decisiva als seus efectes metabòlics i endocrins (87,88).

Després de procediments com el BPG i la SG, s'observa una remodelació significativa de la composició i diversitat microbiana. Alguns estudis mostren un augment de gèneres com *Akkermansia*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i altres bacteris aerotolerants, juntament amb un increment notable d'*Escherichia coli* i del grup *Bacteroides/Prevotella*. En el cas del BPG, destaca l'increment del fílum *Proteobacteria* —que pot representar prop del 37% de l'increment bacterià total— i de la família *Bacteroidaceae*, amb una disminució concomitant del fílum *Firmicutes* (92,93). En canvi, la SG s'ha associat a un augment de *Blautia*, *Eubacterium*, *Haemophilus* i del fílum *Actinobacteria*, així com de les famílies *Rikenellaceae* i *Christensenellaceae* (92,94).

La reducció de *Prevotella* i d'espècies associades a RI és un patró comú en ambdós procediments (93). Aquestes modificacions s'associen amb un augment de la diversitat

alfa i amb una major producció de metabòlits beneficiosos, com els AGCC i els àcids biliars secundaris (92,94). D'entre els bacteris beneficiosos, *Faecalibacterium prausnitzii* augmenta significativament després de la cirurgia i es correlaciona negativament amb marcadors inflamatoris com la proteïna C reactiva, la IL-6 i l'orosomucoide, independentment dels canvis en la ingesta alimentària (93).

Respostes hormonals post quirúrgiques

La CB provoca un increment sostingut de les hormones intestinals GLP-1, GLP-2 i PYY, principalment per l'estimulació directa de les cèl·lules L distals deguda a l'arribada accelerada de nutrients no digerits als segments intestinals amb alta densitat d'aquestes cèl·lules (59,90). El GLP-1 pot augmentar fins a 30 vegades els valors basals i mantenir-se elevat fins a dues dècades després de la cirurgia, mentre que el GLP-2 actua com a factor tròfic intestinal responsable de la hiperplàsia de la mucosa i de la millora de la funció de barrera. El PYY (en la seva forma activa PYY3-36) mostra una secreció marcadament exagerada i, juntament amb el GLP-1, contribueix de manera clau a la reducció de la ingesta alimentària i a la regulació de la sacietat (59). A més, l'increment de GLP-2 redueix la permeabilitat intestinal i la inflamació sistèmica (87), mentre que el GLP-1 millora la sensibilitat a la insulina i restaura la secreció d'insulina de primera fase, fortament deteriorada en la DM 2 (88,89).

Interacció causal microbiota–incretines–metabolisme

Les millores metabòliques observades després de la CB no es deuen únicament a la pèrdua de pes, sinó a una reconfiguració funcional de l'eix intestí–microbiota–cervell (87,88).

Els experiments de trasplantament fecal han demostrat que la microbiota post-BPG pot transferir parcialment el fenotip metabòlic beneficiós a models animals, fet que evidencia un paper causal directe de la microbiota en els efectes metabòlics de la cirurgia (87).

Els canvis en la composició i la funció de la MI després de la CB modifiquen el metabolisme dels àcids biliars, incrementant-ne la circulació enterohepàtica i alterant el balanç entre àcids biliars conjugats i desconjugats. Aquestes modificacions afavoreixen l'activació dels receptors TGR5 i FXR, que contribueixen de manera rellevant a l'augment de la secreció de GLP-1 i a la millora de la homeòstasi glucèmica (87,88).

A més, la concentració total d'àcids biliars fecals s'ha associat negativament amb la pèrdua de pes excessiva i positivament amb marcadors com l'HbA1c i l'HOMA-R,

suggerint un paper regulador d'aquests metabòlits en la resposta metabòlica post quirúrgica (94). L'augment de famílies bacterianes com Rikenellaceae i Christensenellaceae també s'associa amb nivells reduïts d'àcids biliars fecals, reforçant la connexió entre microbiota i metabolisme (94). Finalment, aquestes modificacions, juntament amb alteracions en BCAA i en el metabòlit òxid de trimetilamina (TMAO), s'han vinculat a la remissió de la DM2 i a la magnitud de la pèrdua de pes aconseguida (87).

Per sintetitzar els principals canvis observats en la composició microbiana i els seus mecanismes metabòlics associats després de la CB, la Taula 3 resumeix les diferències més rellevants entre BPG i la SG.

Taula 3. Principals canvis en la microbiota intestinal després de cirurgia bariàtrica

Paràmetre	Bypass gàstric (BPG)	Gastrectomia vertical (SG)	Referències
Gèneres que augmenten			
<i>Akkermansia</i> (<i>A. muciniphila</i>)	Augment pronunciat; millora de la barrera intestinal	Augment similar, correlacionat amb sensibilitat a la insulina	(92,94)
<i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i>	Increment del grup, especialment <i>Bacteroides</i> ; correlació negativa amb IMC	Augment moderat; patró més equilibrat	(92,93)
<i>Escherichia coli</i>	Augment marcat (fins al 37% de l'increment total bacterià)	Augment moderat, més transitori	(93)
<i>Veillonella</i> , <i>Streptococcus</i>	Augment d'espècies aerotolerants i fermentadores	Augment similar, però menys persistent	(92)
<i>Rikenellaceae</i> , <i>Christensenellaceae</i>	Augment moderat; correlació amb pèrdua de pes	Augment més pronunciat; associació amb reducció d'àcids biliars fecals	(92,94)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Augmentat; correlació negativa amb IL-6 i PCR	Increment menor però consistent	(93)
Gèneres que disminueixen			

<i>Prevotella spp.</i>	Disminució marcada; associada a menor RI	Disminució similar	(93)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Disminució transitòria	Disminució moderada	(92,93)
Canvis en filums principals			
<i>Proteobacteria</i>	Augment marcat	Augment moderat	(92,93)
<i>Firmicutes</i>	Disminució significativa; millora de la ràtio F/B	Disminució moderada	(92,93)
<i>Bacteroidetes</i>	Augment pronunciat	Augment moderat	(92,94)
<i>Actinobacteria</i>	Augment moderat	Augment pronunciat	(92)
Diversitat microbiana			
Alfa-diversitat (índex Shannon, Chao1)	Augment sostingut postcirurgia (>6 mesos)	Augment sostingut	(92,94)
Riquesa gènica	Augment i estabilització a 6–12 mesos	Augment mantingut a llarg termini	(93,94)
Marcadors inflamatoris	↓ IL-6, PCR; correlació amb <i>F. prausnitzii</i>	↓ IL-6, PCR	(93)
% EWL (excés pèrdua de pes)	Associat amb <i>Rikenellaceae</i> i <i>Bacteroidaceae</i>	Associat amb <i>Christensenellaceae</i>	(92,94)
Àcids biliars fecals	Reducció significativa post-BPG	Reducció temporal post-SG	(94)
AGCC	Producció augmentada; activació FFAR2/GPR43	Augment significatiu	(92,94)

BPG: bypass gàstric; SG: gastrectomia vertical; AGCC: àcids grassos de cadena curta; FFAR2/GPR43: receptors d'àcids grassos lliures 2 i 3; F/B: ràtio Firmicutes/Bacteroidetes; IL-6: interleucina 6; PCR: proteïna C reactiva; EWL: percentatge de pèrdua del pes excedent.

En conjunt, la CB constitueix un model translacional excepcional per estudiar en humans la interacció entre microbiota intestinal, hormones incretíniques i metabolisme energètic. L'anàlisi conjunta d'aquests processos ofereix una via privilegiada per comprendre els mecanismes que sustenten la millora metabòlica postquirúrgica i per inspirar noves estratègies terapèutiques orientades a la modulació del microbioma intestinal.

2. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESI

L'obesitat i la DM2 representen dos dels principals reptes de salut pública global, amb una incidència creixent i una elevada càrrega de morbiditat associada. Malgrat compartir factors de risc metabòlics i ambientals, ambdues entitats presenten una fisiopatologia complexa i heterogènia, en la qual la microbiota intestinal ha emergit com un actor clau en la regulació del metabolisme energètic i glucídic.

En els darrers anys, nombrosos estudis han posat de manifest que la disbiosi intestinal —caracteritzada per una reducció de la diversitat microbiana, pèrdua d'espècies productores d'AGCC i un augment de bacteris proinflamatoris— s'associa a RI, inflamació sistèmica de baix grau i alteració de la secreció hormonal intestinal. Aquests mecanismes poden contribuir de manera significativa a la desregulació metabòlica prèvia a l'aparició de la DM2.

Tanmateix, la naturalesa i la seqüència d'aquests canvis al llarg del contínuum metabòlic —des de la normoglucèmia fins a la preDM i la DM2— no han estat completament definides. La majoria dels estudis existents es centren en poblacions amb obesitat o diabetis establerta, mentre que els estadis intermedis, com la RI o la preDM, continuen insuficientment caracteritzats tot i representar fases clau per a la prevenció i la intervenció primerenca.

D'altra banda, la CB constitueix un model clínic idoni per a l'estudi de la interacció microbiota–incretines–metabolisme. Més enllà de la pèrdua de pes, els seus efectes beneficiosos sobre la sensibilitat a la insulina i el control glucèmic apareixen de manera precoç i s'associen a profunds canvis en la composició microbiana i en la secreció d'hormones intestinals com GLP-1 i GLP-2. Aquesta resposta permet analitzar els mecanismes fisiopatològics implicats i distingir aquells que són dependents o independents de la pèrdua ponderal.

Malgrat aquests avenços, persisteixen importants incògnites sobre el paper específic de la microbiota i dels seus metabòlits derivats en els diferents estadis de disfunció metabòlica, així com sobre els mecanismes pels quals la CB pot modular aquesta interacció i contribuir a la restauració de l'homeòstasi metabòlica en els pacients amb obesitat.

A partir d'aquestes evidències, es planteja que les alteracions de la MI i dels seus metabòlits bacterians —en especial els AGCC— juguen un paper determinant en la disfunció metabòlica associada a la RI i a la preDM, contribuint posteriorment al desenvolupament de la DM2. Així mateix, la CB ofereix un escenari únic per explorar aquests mecanismes, ja que pot revertir parcialment la disbiosi intestinal i restaurar la resposta incretínica, afavorint la millora metabòlica global.

En conjunt, es formula la hipòtesi que:

La disbiosi intestinal i l'alteració dels seus metabòlits bacterians, especialment els AGCC, participen en els mecanismes que vinculen l'obesitat amb la RI i la progressió cap a la DM2. La CB constitueix un model fisiopatològic idoni per analitzar la reversibilitat d'aquests processos, atès que induïx modificacions profundes en la composició i la funcionalitat de la MI, en la producció d'AGCC i en la resposta incretínica, contribuint així a la comprensió dels mecanismes inicials de la disfunció metabòlica associada a l'obesitat.

3. OBJECTIUS

Objectiu principal

Analitzar el paper de la MI i dels seus metabòlits, especialment els AGCC, en la disfunció metabòlica associada a la RI i a la progressió cap a la DM2, així com la seva modulació després de la CB, per identificar mecanismes microbiota–incretines–metabolisme implicats en la regulació de l'homeòstasi glucèmica.

Objectius secundaris

1. Caracteritzar els perfils de microbiota i els nivells fecals d'AGCC en individus amb normoglucèmia, preDM i DM2, i avaluar-ne el valor predictiu sobre l'estat glucèmic mitjançant models multivariants ajustats per factors clínics i metabòlics.
2. Avaluar els canvis en la composició de la MI i en la resposta incretínica (GLP-1 i GLP-2) després de la CB (BPG) en pacients amb obesitat i DM2, i identificar signatures microbianes associades a la millora metabòlica i a la remissió de la diabetis.
3. Analitzar com el grau de RI s'associa amb la remodelació de la microbiota i la resposta incretínica, així com amb els canvis metabòlics i la pèrdua de pes observats després de la CB.
4. Integrar les evidències dels tres models d'estudi (continu glucèmic, DM2 post-cirurgia i obesitat sense DM2) per proposar un model mecanístic que expliqui la interacció entre microbiota, AGCC i resposta incretínica en la disfunció metabòlica i la seva possible reversibilitat amb la CB.

4. COMPENDI DE PUBLICACIONS

4.1 Article 1

Títol: Fecal Short-Chain Fatty Acids to Predict Prediabetes and Type 2 Diabetes Risk: An Exploratory Cross-Sectional Study.

Autors: Rocío Puig, Marina Idalia Rojo-López, Josep Julve, Esmeralda Castelblanco, Julia Ponomarenko, Susana Amézqueta, Joan Vendrell, Josep Franch-Nadal, Josep Lluís Torres, Dídac Mauricio, Sara Ramos-Romero.

Revista: Nutrients. 2025;17(18):3003. doi:10.3390/nu17183003.



Article

Fecal Short-Chain Fatty Acids to Predict Prediabetes and Type 2 Diabetes Risk: An Exploratory Cross-Sectional Study

Rocío Puig ^{1,2,3,†}, Marina Idalia Rojo-López ^{2,4,†}, Josep Julve ^{2,5}, Esmeralda Castelblanco ⁶, Julia Ponomarenko ⁷, Susana Amézqueta ⁸, Joan Vendrell ^{5,9,10}, Josep Franch-Nadal ^{5,11}, Josep Lluís Torres ^{12,13}, Dídac Mauricio ^{1,2,5,14,*} and Sara Ramos-Romero ^{13,15,†}

- ¹ Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; rpuig@santpau.cat
 - ² Group of Endocrinology, Diabetes & Nutrition, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Sant Quintí 77-79, 08041 Barcelona, Spain; nut.marina.rojo.1@gmail.com (M.I.R.-L.); jjuve@santpau.cat (J.J.)
 - ³ Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain
 - ⁴ DAP-Cat Group, Unitat de Suport a la Recerca Barcelona, Fundació Institut Universitari per a la Recerca a l'Atenció Primària de Salut Jordi Gol i Gurina (IDIAPJGol), 08007 Barcelona, Spain
 - ⁵ Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 08041 Barcelona, Spain; juanjose.vendrell@urv.cat (J.V.); josep.franch@gmail.com (J.F.-N.)
 - ⁶ Endocrinology, Metabolism and Lipid Research Division, Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA; esmeraldacas@gmail.com
 - ⁷ Centre for Genomic Regulation, The Barcelona Institute of Science and Technology, Universitat Pompeu Fabra (UPF), 08003 Barcelona, Spain; julia.ponomarenko@bcrp.eu
 - ⁸ Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; samezqueta@ub.edu
 - ⁹ Departament of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), 43005 Tarragona, Spain
 - ¹⁰ Medicine School, Universitat Rovira i Virgili (URV), 43204 Reus, Spain
 - ¹¹ Primary Health Care Center Raval Sud, Gerència d'Atenció Primària, Institut Català de la Salut, 08001 Barcelona, Spain
 - ¹² Department of Biological Chemistry, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), 08034 Barcelona, Spain; josepluis.torres@iqac.csic.es
 - ¹³ Nutrition & Food Safety Research Institute (INSA-UB), Maria de Maeztu Unit of Excellence, 08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain
 - ¹⁴ Faculty of Medicine, University of Vic—Central University of Catalonia, 08500 Vic, Spain
 - ¹⁵ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
- * Correspondence: didacmauricio@gmail.com (D.M.); sara.ramosromero@ub.edu (S.R.-R.)
 † These authors contributed equally to this work.



Academic Editor: Annunziata Lapolla

Received: 15 August 2023

Revised: 11 September 2023

Accepted: 15 September 2023

Published: 19 September 2023

Citation: Puig, R.; Rojo-López, M.I.; Julve, J.; Castelblanco, E.; Ponomarenko, J.; Amézqueta, S.; Vendrell, J.; Franch-Nadal, J.; Torres, J.L.; Mauricio, D.; et al. Fecal Short-Chain Fatty Acids to Predict Prediabetes and Type 2 Diabetes Risk: An Exploratory Cross-Sectional Study. *Nutrients* **2023**, *17*, 3003. <https://doi.org/10.3390/nu17183003>

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Background/Objectives: Gut microbiota is profoundly influenced by dysglycemic states, including prediabetes (preDM) and type 2 diabetes (T2D). Although short-chain fatty acids (SCFAs) may serve as proxies reflecting these microbial changes, their predictive role remains elusive. This study aimed to evaluate the association between fecal SCFA concentrations and glycemic status (preDM and T2D), using individuals with normoglycemia (NonDM) as the reference group in a Mediterranean adult population. **Methods:** This study included a total of 88 participants from the Di@bet.es study who were classified into three groups according to the American Diabetes Association criteria: NonDM (45%), preDM (27%), and T2D (28%), respectively. We evaluated gut microbiota populations through massive sequencing and determined SCFAs concentration using gas chromatography–mass spectrometry. Adjusted multiple logistic regression models were used to estimate associations between SCFAs and metabolic status. **Results:** The mean age of subjects with preDM and T2D was approximately 68 years, older than that of NonDM participants (about 60 years). About 50% of the subjects in the NonDM and preDM groups were female,

whereas in the T2D group, females represented about 25%. The analysis revealed that only fecal acetic acid was significantly reduced in T2D compared to NonDM ($p = 0.036$) and preDM ($p = 0.018$) groups. Remarkably, fecal acetic acid was negatively associated with T2D risk when taking preDM as the reference state (OR = 0.561 [95% CI: 0.371–0.846], $p = 0.009$). Intriguingly, fecal acetic acid was identified as a significant positive predictor of preDM risk, taking the NonDM group as reference (OR = 1.422; $p = 0.028$), while propionic acid was inversely associated with preDM (OR = 0.714; $p = 0.028$). **Conclusions:** Our analysis showed that fecal acetic acid levels were associated with a reduced risk of T2D but also with an increased risk of preDM; however, the biological relevance of these findings remains uncertain.

Keywords: dysglycemia; dietary intake; clinical studies; microbial metabolites; gut microbiota; SCFA profiles; metabolic risk factors

1. Introduction

The worldwide incidence of prediabetes (preDM), recognized as the preclinical phase of type 2 diabetes (T2D), has shown a steady increase over time, representing a substantial public health challenge. The occurrence of preDM is contingent upon the demographic characteristics of the studied cohort as well as the diagnostic criteria employed [1]. The International Diabetes Federation (IDF) projected that in the year 2021, approximately 541 million individuals globally were afflicted with impaired glucose tolerance [2]. Roughly nine out of ten diabetes diagnoses correspond to T2D [3].

PreDM and T2D result from a complex interplay of modifiable and non-modifiable individual, social, and environmental factors [4]. Understanding these factors and their interplay is crucial for developing effective prevention and management strategies. Both conditions have a strong genetic component and are closely associated with obesity and a sedentary lifestyle. A dietary pattern characteristic of Western populations—high in refined carbohydrates, red/processed meats, and added sugars—has been consistently linked to higher risk of preDM and T2D [5]. Conversely, healthier dietary patterns, such as those rich in vegetables, fruits, and whole grains, have been shown to reduce the incidence of preDM, and therefore the risk of T2D [6]. Genetic factors also influence the relationship between diet and T2D risk, making individuals with specific genetic backgrounds more susceptible to the adverse effects of unhealthy dietary patterns [7]. Moreover, the relationship between insulin resistance and obesity is well recognized, with central obesity acting as a key driver in the onset of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), a disorder commonly seen in preDM and T2D [8].

Emerging evidence highlights the key role of gut microbiota (GM) in regulating energy balance and metabolism through compounds like short-chain fatty acids (SCFAs), which interact with host tissues [9]. SCFAs play a key role in energy and lipid metabolism, with research showing that butyric supplementation in high-fat diets reduces obesity and insulin resistance in experimental animals [10]; however, these results cannot be directly extrapolated to humans [11]. Moreover, alterations in gut microbial composition have been linked to the development of obesity and T2D, primarily through mechanisms involving inflammation, metabolic endotoxemia, and disrupted nutrient metabolism [12]. Studies have observed reduced gut microbial diversity in individuals with prediabetes and newly diagnosed T2D compared to those without diabetes [13]. However, knowledge about gut dysbiosis in the early stages of glucose intolerance remains limited. Previous research has shown variations in the gut microbiome of preDM and individuals with established

T2D compared to healthy individuals, with distinct microbial profiles associated with the disease [13]. Furthermore, longitudinal and cross-sectional studies have demonstrated a complex, stage-dependent interaction between the GM and the host during the progression from prediabetes to type 2 diabetes [14,15]. In this context, the Mediterranean dietary pattern has been associated with higher fecal SCFA concentrations and lower levels of intestinal permeability markers, suggesting a clear mechanistic link between SCFAs, intestinal barrier integrity, and diet [16].

Clarifying the interplay between gut microbial composition, SCFA production, and the development of prediabetes and type 2 diabetes could provide key insights into disease mechanisms. We hypothesized that distinct fecal SCFA patterns are associated with glycemic status and reflect underlying alterations in gut microbiota composition. Therefore, this study aimed to evaluate the associations between gut microbiota composition, fecal SCFAs, and glycemic status (normoglycemia, preDM, and T2D) in adults from a Mediterranean population.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Subjects

This work is a cross-sectional sub-study of the Di@bet.es cohort, a population-based study conducted in Spain to investigate the epidemiology and risk factors of diabetes [17].

For the present study, 88 individuals from the Mediterranean region participating in the Di@bet.es study were selected based on the availability of complete clinical data and fecal, urine, and plasma samples [18]. Participants were distributed into three groups according to glycemic status: NonDM ($n = 39$, 45%), preDM ($n = 24$, 27%), and T2D ($n = 25$, 28%). The mean age of participants with preDM and T2D was approximately 68 years, higher than that of NonDM (~60 years). About half of the NonDM and preDM groups were female, whereas only 25% of the T2D group were women. Exclusion criteria, as defined in the original Di@bet.es study, included being institutionalized, severe illness, pregnancy, or recent delivery. The study was approved by the Ethics and Clinical Research Committee of IDIAP Jordi Gol (P17/085, 26 April 2017), with written informed consent acquired from all individuals involved.

Urine and fecal samples from participants were frozen at -80°C until analysis and thawed on the day of processing.

2.2. Study Procedures

Clinical and biochemical variables, including serum lipid profile, waist circumference, body mass index (BMI), and other anthropometric measures, were obtained following the methodology of the Di@bet.es study, as previously described [17,18].

2.3. Classification of Glycemic Status

Participants were categorized as NonDM, preDM, or T2D based on American Diabetes Association (ADA) diagnostic thresholds [19].

2.4. Food Frequency Questionnaire

A qualified nutritionist administered a qualitative food frequency questionnaire (FFQ), which had been previously employed in a population-based investigation conducted in Spain [20]. The nutritionists were informed of the participants' prior diabetic condition. The FFQ was facilitated face-to-face, and participants provided a single response for each food item indicating the frequency of consumption. The questionnaire assessed the annual frequency of consumption of 50 food items categorized into 11 groups: never/seldom, 1 and 2–3 times/month, 1, 2–3, and 4–6 times/week, and 1, 2, 3, 4, and >4 times/day. For the

present analysis, food items were grouped into the following categories: vegetables, fruit, dairy, potatoes, legumes, nuts, non-refined cereals, fish, red meat, white meat, wine, beer, coffee, and sweeteners.

2.5. Urinary Sugar Excretion Analysis

Sucrose, glucose, and fructose were quantified in first-morning urine using a commercial enzymatic assay (Saccharose/D-Glucose/D-Fructose kit; Boehringer Mannheim, R-Biopharm, Darmstadt, Germany; No. 10716260035) and measured with a UV-VIS spectrophotometer (SP8001, Dinko Instruments, Barcelona, Spain). On the assay day, urine samples were homogenized and centrifuged (15,000 rpm, 4 °C, 4 min) prior to measurement. Only those samples with glucose concentrations above the detection range of the enzymatic kit were diluted 1/10 (*v/v*) with water.

Glucose, creatinine, and albumin measures were further determined using commercial kits (Roche Diagnostics) adapted to a COBAS c501 autoanalyzer (Roche Diagnostics Cobas 6000 c501 GmbH, Mannheim, Germany) for verification purposes.

2.6. Fecal DNA Extraction and Sequencing for Microbiota Populations Analysis

Extraction of total DNA from fecal material was performed with the QIAamp™ DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The V3–V4 segments of the 16S rRNA gene were subsequently amplified and sequenced using Illumina MiSeq technology (paired-end 2 × 300 bp). Bioinformatic analysis of sequencing data was performed using the mothur software (v1.44.1) [21], with taxonomic classification based on the SILVA v132 database [22] and clustering at the genus level into operational taxonomic units (OTUs). Chimeric and non-bacterial sequences were removed prior to statistical analysis. Further methodological details are provided in the Supplementary Methods.

2.7. Fecal Short-Chain Fatty Acids

SCFAs in stool were quantified with gas chromatography using a Trace2000 system coupled to a flame ionization detector (ThermoFinnigan, Waltham, MA, USA) and an HP-FFAP capillary column (30 m × 0.53 mm × 1 µm; Agilent, Santa Clara, CA, USA). Helium was employed as carrier gas at 5 mL/min. The oven temperature program started at 80 °C (1 min), then increased to 120 °C at 15 °C/min (4 min), followed by 130 °C at 5 °C/min (4 min), and finally to 235 °C at 8 °C/min (4 min). The final detector temperature was 240 °C. External calibration was performed for six SCFAs (acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate, isovalerate) using ethylbutyric acid as internal standard. Extraction from feces was performed with acetonitrile/water/oxalic acid, and quantification was based on the respective calibration curves. Total SCFA concentration was obtained as the sum of individual acids.

2.8. Statistical Analyses

All analyses were performed using R software (version 4.3.1), with data cleaning, management, and visualization conducted in an R Markdown notebook to ensure full traceability and reproducibility. The packages dplyr, tidyr, and purrr were used for data manipulation; mice for imputing missing values; compareGroups for group comparisons; broom and FSA for inferential statistics; and ggplot2 and kableExtra for tables and plots.

Categorical variables were tested using Chi-square tests, and continuous variables with Wilcoxon or Kruskal–Wallis tests when non-normal distributions were present. Results are reported as mean ± SD or median with interquartile range.

The 16S rRNA OTUs counts were analyzed using the R package Phyloseq (version 1.36.0) [23] in R version 4.1.0. Statistical significance of the relative abundances of taxa (>0.01) was evaluated using the Wald test of the DESeq2, version 1.32.0. [24]. In addi-

tion, the R package microbiome (version 1.13.12) [25] was used to calculate indexes to estimate within-sample α -diversity, which is the distribution of taxonomic units' relative abundances in a given sample into a single number, including those for richness (i.e., Chao1 index), evenness (i.e., Pielou, Simpson, and Bulla indexes), dominance (i.e., Simpson, Berger–Parker, Relative, and Gini indexes), rarity (i.e., low abundance index), and diversity (i.e., Shannon and Inverse Simpson indexes). Furthermore, representation of similarities or distances between samples, referred to as between-sample β -diversity (i.e., principal coordinate analysis of unweighted and weighted Unifrac distance), and its significance to differentiate groups (Permanova analysis with Adonis) were calculated using the R packages Phyloseq and vegan (version 2.5.7) [26].

Multiple logistic regression models (glm, family = “binomial”) were used to estimate associations between independent variables (e.g., dietary patterns, clinical markers, bacterial composition) and metabolic status, adjusting for confounders. Results are presented as odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals, using *broom* for output.

Correlations between bacterial taxa and clinical or dietary factors were assessed with Spearman coefficients. Volcano plots (ggplot2) were generated to visualize correlation strength and statistical significance ($-\log_{10}(p\text{-value})$).

Several figures, including plots of the logistic regression models, correlation heatmaps, and relative abundance barplots, were generated using Python in Google Colab (matplotlib 3.8.0, seaborn 0.12.2), ensuring reproducibility through a shared Python notebook.

3. Results

3.1. Demographic and Clinical Characteristics

The clinical and metabolic characteristics of subjects included in the study are shown in Table 1.

Table 1. Demographic, clinical, and analytical data.

Variable	NonDM (n = 39)	PreDM (n = 24)	T2D (n = 25)	p-Value (Global)	NonDM vs. PreDM	NonDM vs. T2D	PreDM vs. T2D
Clinical variables							
Age (y)	60.1 ± 13.8	67.4 ± 8.2	70.5 ± 9.4	<0.01	0.156	<0.01	0.907
Sex, women	19 (48.7%)	11 (45.8%)	6 (24.2%)	0.124	0.823	0.047	0.108
BMI (kg/m ²)	27.4 ± 3.7	29.2 ± 4.5	29.5 ± 4.2	0.087	0.496	0.142	1.000
Waist circumference	88.1 ± 11.8	95.9 ± 12.6	100 ± 12.6	<0.01	0.122	<0.01	0.502
Smoking habit	5 (23.8%)	5 (38.5%)	6 (42.9%)	0.465	0.362	0.234	0.816
Hypertension, n (%)	13 (33.3%)	14 (58.3%)	16 (64.0%)	0.031	0.051	0.016	0.684
Dyslipidemia, n (%)	7 (17.9%)	8 (33.3%)	14 (56.0%)	0.007	0.163	0.001	0.110
Medication use							
Antidiabetic drugs (ADD) (%)				<0.001			
yes	0 (0.00%)	1 (4.17%)	21 (84.0%)				
no	39 (100%)	23 (95.8%)	4 (16.0%)				
Insulin therapy (%)				0.010			
yes	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (16.0%)				
no	39 (100%)	23 (100%)	21 (84.0%)				
Serum biochemistry							
Glucose (mg/dL)	96.2 ± 9.9	108.9 ± 18.6	151.2 ± 51.0	<0.0001	0.007	<0.001	<0.001
Insulin (mIU/L)	11.8 ± 8.4	12.4 ± 12.0	9.5 ± 4.8	0.486	1.000	1.000	1.000

Table 1. Cont.

Variable	NonDM (n = 39)	PreDM (n = 24)	T2D (n = 25)	p-Value (Global)	NonDM vs. PreDM	NonDM vs. T2D	PreDM vs. T2D
HbA1c (%)	5.3 ± 0.3	5.8 ± 0.3	7.0 ± 0.6	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Cholesterol (mg/dL)	201.0 ± 37.5	213.0 ± 36.0	181.0 ± 35.9	0.010	1.000	0.072	0.012
LDLc (mg/dL)	126.0 ± 31.8	133 ± 31.1	106 ± 27.2	0.006	1.000	0.018	0.013
HDLc (mg/dL)	54.2 ± 11.6	52.6 ± 13.6	45.3 ± 10.3	0.013	1.000	0.022	0.160
Triglycerides (mg/dL)	106 ± 50.5	139 ± 66.1	151 ± 90.0	0.024	0.054	0.055	1.000
AST	19.8 ± 5.1	18.6 ± 8.0	22.3 ± 8.6	0.604	0.888	0.854	0.601
GGT	42.3 (45.9)	36.5 (39.8)	24.0 (12.3)	0.616	0.397	0.239	0.684
Fatty liver index (FLI)	67.2 ± 25.4	78.5 ± 14.5	77.3 ± 25.4	0.515	1.000	1.000	1.000
Urinary biochemistry							
Glucose (g/L)	0.45 (1.42)	0.08 (0.05)	2.31 (6.21)	0.051	1.000	0.199	0.812
Fructose (g/L)	0.03 (0.06)	0.01 (0.02)	0.68 (2.83)	0.360	1.000	0.568	0.481
Sucrose (g/L)	0.08 (0.22)	0.06 (0.14)	1.91 (5.99)	0.134	1.000	1.000	1.000

Continuous variables are summarized as mean (SD) and categorical variables as counts with percentages. Differences across groups were evaluated with Chi-square for categorical data and with Wilcoxon or Kruskal–Wallis tests for continuous data, implemented through the compare Groups package in R. AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; GGT, gamma-glutamyl transferase; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; NonDM, individuals with normoglycemia; preDM, prediabetes; T2D, type 2 diabetes.

The waist circumference was significantly higher only in the group of subjects with T2D when compared with NonDM ($p < 0.01$). Both glucose and HbA1c were increasingly higher across the groups of subjects with preDM and T2D and were significantly elevated compared with NonDM subjects. Lipid analysis revealed that total cholesterol was significantly reduced in the group of subjects with T2D compared with the preDM group and, though marginally, with the NonDM group. The latter was mainly due to concomitant reductions in the low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the T2D group compared with the other two groups. Total triglycerides were marginally elevated in the preDM and T2D groups compared with the NonDM group. As expected, urinary glucose was higher in individuals with T2D (2.31 ± 6.21 g/L) compared to those with preDM (0.08 ± 0.05 g/L) and NonDM (0.45 ± 1.42 g/L), with a p -value close to significance ($p = 0.051$). Fructose and sucrose levels were also higher in T2D, although differences did not reach statistical significance.

3.2. Dietary Intake Patterns

The frequency of intake of fiber-rich food groups (e.g., vegetables, legumes, whole grains), fish, red meat or nuts did not differ among groups (Supplementary Table S1). By contrast, some food groups and beverages showed significant differences across glycemic categories (Table 2).

Table 2. Dietary variables showing significant differences between glycemic groups.

Food Group	NonDM n = 39	PreDM n = 24	T2D n = 25	p-All	NonDM vs. PreDM	NonDM vs. T2D	PreDM vs. T2D
Dairy	42.7 ± 31.4	57.1 ± 28.2	49.2 ± 20.5	0.079	0.040	0.154	0.347
White meat	13.4 ± 7.1	12.7 ± 7.5	24.3 ± 22.7	0.060	0.614	0.055	0.027
Beer	7.3 ± 11.8	4.7 ± 10.2	4.1 ± 7.2	0.047	0.019	0.177	0.237
Coffee	42.3 ± 32.4	63.3 ± 31.0	48.0 ± 21.4	0.021	0.010	0.269	0.056

Data are expressed as consumption frequency (times per month). Values are presented as mean ± standard deviation (SD). NonDM, individuals with normoglycemia; preDM, prediabetes; T2D, Type 2 diabetes.

The complete dietary dataset, including variables without significant differences, is available in Supplementary Table S1.

Dairy consumption was higher in individuals with preDM compared to NonDM subjects ($p = 0.040$). Intake of white meat was significantly higher in individuals with T2D compared to those with preDM ($p = 0.027$) and marginally higher compared to NonDM ($p = 0.055$). Among beverages, coffee consumption was significantly higher in the preDM group compared to NonDM ($p = 0.010$) and approached statistical significance between preDM and T2D ($p = 0.056$). Beer intake was lower in individuals with preDM and T2D compared to NonDM ($p = 0.047$), with a significant difference between NonDM and preDM ($p = 0.019$).

3.3. Composition of Gut Microbiota in Feces

Microbial alpha diversity did not differ significantly between glycemic status groups ($\chi^2 = 1.02$, $p = 0.60$). Microbial beta diversity analysis showed a marginally significant difference in overall community composition across groups ($R^2 = 0.033$, $p = 0.05$). The relative abundance of the main bacterial phyla—Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, and others—across glycemic groups (NonDM, preDM, and T2D) is summarized in Supplementary Figure S1 and detailed in Supplementary Table S2.

At the phylum level, Firmicutes were predominant in all groups, representing over 75% of the total. No statistically significant differences were found between groups for any phylum.

At the genus level, several bacterial genera showed significant differences across glycemic groups (Figure 1 and Supplementary Table S3).

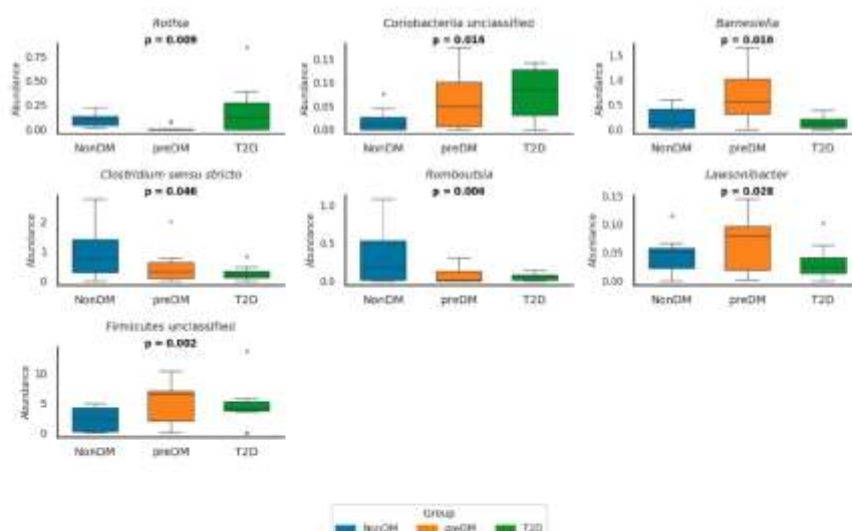


Figure 1. Relative abundance of seven bacterial genera in NonDM (blue), preDM (orange), and T2D (green) groups. Boxplots show simulated individual values based on reported means and SDs. Genera with relative abundance values close to zero were omitted for clarity. p -values indicate overall group differences ($p < 0.05$). The circles in the box plots represent outliers. These are individual data points that fall outside the main distribution of the data shown by the box. NonDM, individuals with normoglycemia; preDM, prediabetes; T2D, type 2 diabetes.

In preDM, the abundance of Firmicutes unclassified was significantly higher compared to NonDM ($p = 0.014$) and T2D ($p = 0.012$) groups. Conversely, *Romboutsia* was already significantly reduced in preDM compared to NonDM ($p = 0.010$) and further decreased in T2D ($p < 0.001$) was significantly reduced in preDM compared to NonDM ($p = 0.010$) and further decreased in T2D ($p < 0.001$). *Lawsonibacter* abundance was also significantly lower in T2D compared to preDM ($p = 0.030$). In contrast, Alphaproteobacteria unclassified was significantly enriched in preDM compared to NonDM ($p = 0.004$), while *Granulicatella* showed a decreasing trend in preDM that reversed in T2D ($p = 0.027$).

In T2D, *Clostridium sensu stricto* and *Romboutsia* were both significantly reduced compared to NonDM ($p = 0.011$ and $p < 0.001$, respectively), whereas *Lactobacillus* was significantly enriched ($p = 0.002$). *Escherichia/Shigella* abundance was significantly higher in T2D compared to both NonDM and preDM ($p = 0.007$ for both comparisons), although no difference was observed between NonDM and preDM. *Rothia* abundance was globally different across groups ($p = 0.009$), but post hoc comparisons did not reach significance.

3.4. Fecal Short-Chain Fatty Acids (SCFAs)

We further examined the fecal concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs) across groups as a proxy for shifts in gut microbial activity (Table 3). Among the measured SCFAs, only fecal acetic acid concentrations were significantly lower in individuals living with T2D compared to both NonDM ($p = 0.036$) and those with preDM ($p = 0.018$). Fecal propionic and butyric acid levels showed a trend towards lower concentrations in people with T2D compared either to NonDM ($p = 0.091$) and preDM ($p = 0.090$), respectively; however, these differences did not reach statistical significance. Lastly, none of the branched-chain SCFAs (isobutyric, isovaleric) or valeric acid differed significantly among groups.

Table 3. Fecal SCFA concentrations (mmol/kg) by diagnostic group.

SCFA (mmol/kg)	NonDM (n = 39)	PreDM (n = 24)	T2D (n = 25)	p-Value (Overall)	NonDM vs. preDM	NonDM vs. T2D	PreDM vs. T2D
Acetic	173 ± 121	179 ± 109	115 ± 64.6	0.061	0.853	0.036	0.018
Propionic	52.5 ± 35.9	45.0 ± 31.1	38.1 ± 24.8	0.230	0.433	0.091	0.409
Isobutyric	5.58 ± 3.44	5.54 ± 2.80	5.34 ± 2.96	0.954	0.956	0.774	0.817
Butyric	42.7 ± 30.3	43.5 ± 27.8	31.5 ± 19.2	0.206	0.914	0.112	0.090
Isovaleric	9.16 ± 7.85	8.00 ± 4.44	8.28 ± 5.09	0.772	0.539	0.628	0.842
Valeric	7.61 ± 4.37	6.96 ± 2.26	7.72 ± 5.69	0.826	0.536	0.934	0.572

Data are presented as mean (standard deviation, SD) in mmol/kg feces. Overall and pairwise p -values were calculated using the Kruskal–Wallis test, with post hoc pairwise comparisons adjusted for multiple testing. Bolded p -values indicate statistical significance ($p < 0.05$). NonDM, Normoglycemic individuals; preDM, prediabetes; T2D, type 2 diabetes.

3.5. Correlation Between SCFAs and Gut Microbial Genera

To explore the associations between gut microbiota and fecal SCFAs, a correlation heatmap was generated (Figure 2).

The analysis identified several statistically relevant genus-level correlations with SCFAs concentrations. For instance, *Clostridium sensu stricto* showed a positive correlation with butyric acid, while *Lactonifactor* was positively associated with propionic acid. In contrast, we found that Coriobacteriia unclassified correlated negatively with both acetic and butyric acid levels. Notably, *Romboutsia* exhibited a positive correlation with propionic acid and was significantly reduced in individuals with established diabetes (Figure 1, Supplementary Table S3), whereas Coriobacteriia unclassified was increased in diabetes (Figure 1, Supplementary Table S3) and showed a negative correlation with acetic acid. Correlations between *Akkermansia* abundance and fecal SCFA concentrations could not be estimated due to insufficient variability in this genus within our dataset (NA in

correlation output). A complete list of significant correlations between individual SCFA species and bacterial genera is provided in Supplementary Table S4.

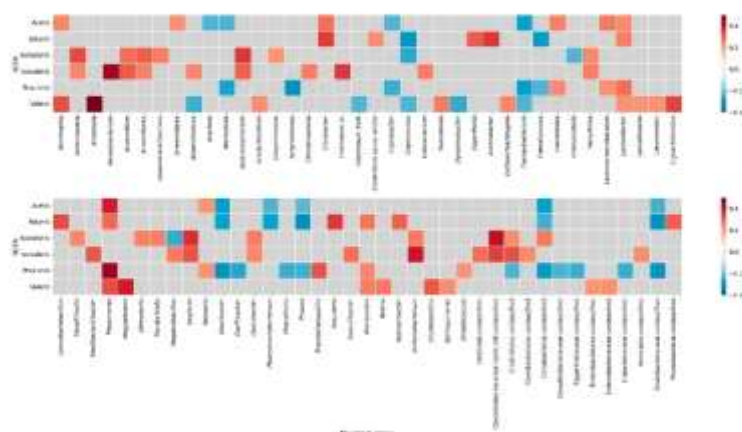


Figure 2. Correlation heatmap between short-chain fatty acids and gut microbial genera. Spearman correlation coefficients between SCFAs (acetic, butyric, isobutyric, isovaleric, propionic, and valeric acids) and the relative abundance of microbial genera. Positive correlations are shown in red and negative correlations in blue; gray cells indicate non-significant associations ($p \geq 0.05$). The heatmap was generated using the complete sample set (all participants combined), without stratification by study groups. SCFAs, short-chain fatty acids.

3.6. Microbial and Metabolic Predictors of Dysglycemia

We designed different adjusted multivariable logistic regression models to assess the potential of various fecal SCFA species to predict either preDM or T2D, after adjustment for clinical covariates commonly associated with altered glycemic status and metabolic risk. All main results presented below are based on models using normalized SCFA data to ensure comparability across individuals; detailed results from these normalized models are provided in Supplementary Table S5 and illustrated in Figure 3.

3.6.1. PreDM vs. NonDM

Using normoglycemia as the reference category, the full-adjusted logistic regression analysis based on normalized SCFA values showed that higher levels of acetic acid were positively associated with preDM (Model 2: OR = 1.4219 [95% CI: 1.049–1.9273], $p = 0.028$), while propionic acid levels were inversely associated with this condition (OR = 0.714 [95% CI: 0.5338–0.9551], $p = 0.028$). No significant associations were observed for other SCFAs. Waist circumference was also independently associated with higher odds of preDM (OR = 1.0164 [95% CI: 1.0029–1.0301], $p = 0.0215$), whereas sex, age, and triglyceride levels were not significant predictors (Figure 3a).

3.6.2. T2D vs. NonDM

In the fully adjusted multivariable model comparing T2D to NonDM, no SCFA species showed statistically significant associations. Age was the only independent variable significantly associated with higher odds of T2D, with each additional year increasing the odds by approximately 1.2% (OR = 1.012 [95% CI: 1.013–1.0228]; $p = 0.033$) (Figure 3b).

3.6.3. T2D vs. PreDM

Using preDM as the reference category revealed that higher levels of acetic acid concentration were associated with lower odds of T2D (OR = 0.5605 [95% CI: 0.3713–0.8461]; $p = 0.009$). None of the other SCFA species or clinical covariates demonstrated statistically significant associations. Furthermore, none of the clinical variables, including age, were significantly associated with T2D status in this model (Figure 3c).

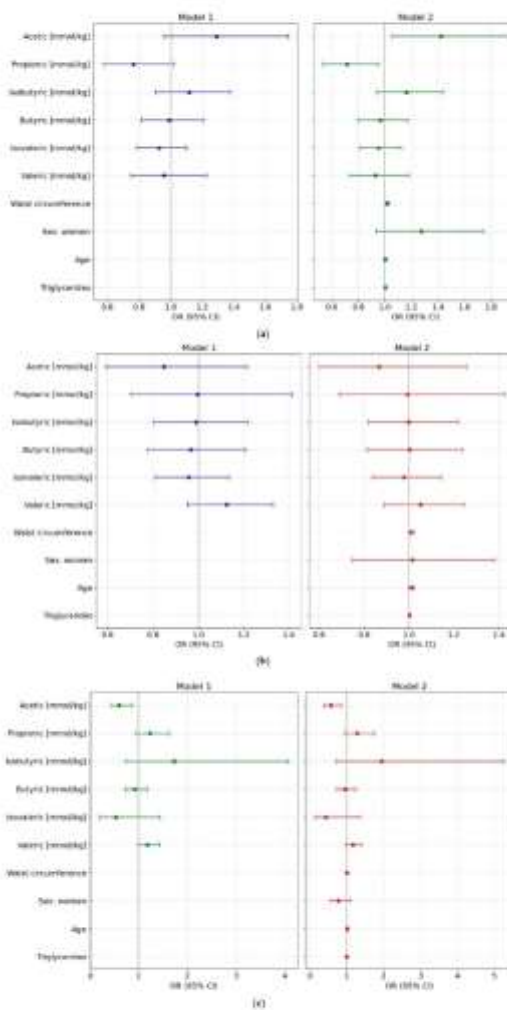


Figure 3. Forest plots showing odds ratios (ORs, 95% CI) from multivariable logistic regression models assessing the association of normalized fecal SCFA concentrations with glycemic status. Both unadjusted (Model 1) and adjusted models (Model 2, adjusted for waist circumference, sex, age, and triglyceride levels) are shown for each comparison: (a) Prediabetes vs. Normoglycemia; (b) Type 2 Diabetes (T2D) vs. Normoglycemia (NonDM); and (c) T2D vs. Prediabetes (PreDM).

4. Discussion

An accumulating body of evidence suggests that the GM profoundly influences glucose metabolism and may contribute to glucose intolerance and T2D progression [13,27]. While most of the studies have been focused on the identification of gut microbial alterations in T2D, the understanding of specific changes in GM in subclinical stages of glucose intolerance remains largely elusive [28,29]. Additionally, the potential of using circulating or fecal SCFAs as functional readouts of microbial composition under dysglycemic conditions is still under investigation, with conflicting findings reported in the literature [30].

In the current study, we sought to address these gaps by comparing microbiota composition and SCFA concentrations across normoglycemia, prediabetes and T2D. We found a significant increase in *Escherichia/Shigella* abundance in subjects with T2D compared to those without T2D individuals with prediabetes, consistent with previous studies linking these taxa to increased gut permeability and metabolic endotoxemia in T2D [31,32]. Conversely, acetic-producing genera, such as *Romboutsia* and *Clostridium sensu stricto*, exhibited a consistent and significant decline from normoglycemia to prediabetes and further in T2D, supporting the hypothesis of a loss of beneficial SCFA producers associated with impaired glucose metabolism [32–35]. Interestingly, individuals with prediabetes displayed a distinct microbiota profile, with significant increases in taxa such as Firmicutes unclassified and Alphaproteobacteria unclassified compared to non-diabetic individuals. However, Firmicutes unclassified levels dropped significantly in T2D, returning to levels similar to those observed in normoglycemia. This non-linear pattern suggests that some microbiota alterations may be specific to the prediabetic state rather than reflecting a progressive shift across glycemic stages. These patterns suggest that GM shifts may precede the progression to T2D at least in part by contributing to metabolic dysregulation in subjects with prediabetes [13,36].

Consistent with these compositional changes—namely, a significant increase in *Escherichia/Shigella* and a marked reduction in acetic-producing genera such as *Romboutsia* and *Clostridium sensu stricto*—individuals with T2D showed significantly lower fecal acetic concentrations compared to both NonDM and those with preDM, while propionic and butyric concentrations were at best marginally lower, when T2D is compared with participants without diabetes and with prediabetes, respectively. Our observations align with previous studies reporting reduced acetic production in individuals with T2D, reflecting impaired fermentative capacity and dysbiosis associated with metabolic deterioration [37–41]. While fatty acid profiles can be influenced by both diet and host factors [11], our analysis revealed some group-specific differences in dietary intake, such as higher dairy consumption in individuals with prediabetes and increased white meat intake in those with T2D. However, these dietary differences were modest and do not fully align with the observed reductions in fecal acetic acid concentrations. This suggests that alterations in gut microbiota composition may play a more prominent role in shaping SCFA profiles than dietary patterns alone. Nevertheless, it is important to consider the Mediterranean background of all study participants, which is generally characterized by higher fiber and olive oil intake. While dietary intake was assessed in our cohort and no major differences in food group consumption were observed across glycemic status groups, the overall dietary pattern may still shape gut microbiota composition and SCFA profiles. These population-specific characteristics highlight the need for cross-population validation studies to confirm the generalizability of our findings.

Beyond their key roles in maintaining gut barrier integrity and modulating metabolic inflammation, SCFAs—especially acetic and butyric—may also target glucose metabolism [42–44]. Our analysis revealed that higher fecal concentrations of acetic acid were associated with a

reduced risk for T2D. This observation is in line with the notion that acetic is the main fermentative product and the main circulating SCFA form in humans and rodents [45]. Consistently, oral administration of acetic acid in drinking water protected against T2D in mice without obesity [44]. Intriguingly, fecal acetic acid was linked to increased risk for prediabetes. The biological significance of this finding remains unclear, particularly given the lack of significant differences in acetic acid concentrations between normoglycemic and subjects with prediabetes. This observation should be regarded as preliminary and hypothesis-generating, and the positive association observed in the preDM model could be revealing hidden relationships not apparent in simple group comparisons even after covariate adjustment or could simply result from statistical fluctuation rather than a true biological effect.

Our analysis also showed that elevations of fecal levels of propionic acid were associated with lower odds of prediabetes, suggesting a potential protective role of this SCFA during early stages of glucose dysregulation. This observation is consistent with previous evidence indicating that propionic acid may enhance insulin sensitivity and exert anti-inflammatory effects, which together may delay or prevent metabolic deterioration [46,47].

In contrast, fecal butyric concentrations did not differ significantly across groups, and they were not predictive of prediabetes or T2D in any of the models. These findings stand in contrast to the prevailing hypothesis that the GM of subjects with T2D exhibits a decreased representation of butyric-producing taxa [33]. Furthermore, our findings also differed from those of a recent prospective study based on the same Di@betes cohort, which evaluated the predictive value of circulating SCFA for incident T2D over a 7-year follow-up period [48]. Notably, in that study, elevated circulating butyric levels were significantly associated with increased risk of developing T2D. These inconsistent associations across studies may, at least in part, reflect differences between the blood and fecal concentrations of specific SCFA species [49], which are likely influenced by the biological compartment assessed. In fact, whereas fecal SCFA levels may primarily reflect microbial production, plasma concentrations also capture absorption dynamics, host metabolic utilization, or compensatory physiological responses. Collectively, these findings highlight the involvement of SCFA-related pathways in glucose dysregulation, although their interpretation appears to be highly dependent on the physiological context or disease stage.

To further investigate functional relationships, genus-level correlation analyses revealed several meaningful associations. For instance, *Romboutsia* correlated positively with propionic levels and was significantly reduced in subjects with T2D. In contrast, *Escherichia/Shigella*—primarily recognized as acetic consumers [50]—were more abundant in subjects with T2D, supporting their potential role in contributing to gut dysbiosis and reduced SCFA availability. Notably, the relative abundance of *Akkermansia* did not differ significantly across glycemic groups, underscoring the functional and ecological heterogeneity of this genus, despite its frequently proposed protective role in metabolic health [51–53].

Taken together, our findings reinforce the hypothesis that specific compositional shifts—characterized by a loss of beneficial fermenters and an enrichment of proinflammatory or opportunistic bacteria—may directly impair the gut microbiota’s metabolic capacity to produce SCFAs. These results further suggest that interventions aimed at restoring SCFA-producing bacteria or attenuating the abundance of detrimental taxa could represent promising microbiota-targeted strategies to support metabolic health in subjects with dysglycemia.

Our study has several limitations. Most notably, the relatively small sample size restricts the generalizability of the findings. Although the limited sample size reduces the statistical power and increases the potential influence of random error, these findings provide preliminary insights and should be regarded as hypothesis-generating, pending confirmation in larger studies. Nevertheless, our results are consistent with previous reports describing similar microbial and metabolic alterations in dysglycemia [35,41], which

reinforces the plausibility of our observations despite the limited sample size. Moreover, the absence of detailed information on specific classes of antidiabetic and lipid-lowering medications may represent an important confounding factor, as such treatments can modulate GM composition and fecal SCFA levels. In addition, SCFAs were quantified exclusively in fecal samples, which primarily reflect excreted intestinal microbial production and may not accurately reflect actual colonic production or systemic absorption. Another limitation of our study concerns dietary data. While intake was recorded for major food groups, the lack of detailed nutrient-level information, such as total energy, fiber, or micronutrient content, prevents a precise assessment of how these dietary factors may have influenced gut microbial composition and SCFA production. Finally, the small sample size also limited our ability to use predictive metabolic pathway tools like PICRUSt or HUMAnN2, which require larger cohorts and multi-omics data for reliable results. This limits functional interpretation of microbiota–SCFA relationships. Future research with larger datasets and integrated approaches is warranted to explore functional links between microbiota and SCFA production. Nevertheless, a key strength of this study is the inclusion of detailed dietary intake data. While some differences were observed, these were modest and unlikely to fully explain the microbial and SCFA differences. Future research should prioritize longitudinal and mechanistic approaches, ideally including both fecal and circulating SCFA measurements, detailed pharmacological data, and targeted interventions to modify gut microbiota composition or SCFA production, in order to clarify causal relationships and explore their therapeutic potential. Furthermore, *in vitro* and animal model studies will be interesting to clarify the specific mechanisms through which SCFAs, such as acetic and propionic acid, affect insulin sensitivity, glucose homeostasis, and inflammatory responses.

5. Conclusions

Our findings suggest that fecal SCFAs—particularly acetic—may serve as protective biomarkers for T2D. Unexpectedly, acetic acid was revealed to predict prediabetes. However, in this last case, the physiological relevance remains unclear. Interestingly, higher fecal levels of propionic acid were inversely associated with prediabetes, pointing to a potential protective role in early glucose dysregulation. Further longitudinal research is needed to clarify the role of SCFA concentrations as indicators of gut microbial metabolic activity and to assess their potential in predicting the development and progression to T2D over time.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu17183003/s1>. Table S1: Dietary intake characteristics by glycemic status groups. Table S2: Relative abundance of bacterial phyla across glycemic status groups. Table S3: Genus-level taxa with significant differences in relative abundance between glycemic status groups. Table S4: Significant correlations between fecal SCFA concentrations and genus-level gut microbiota. Table S5: Association between fecal SCFAs and prediabetes (vs. normoglycemia). Table S6: Association between fecal SCFAs and diabetes (vs. normoglycemia). Table S7: Association between fecal SCFAs and diabetes (vs. prediabetes). Figure S1: Relative abundance of the main bacterial phyla across glycemic groups.

Author Contributions: Conceptualization, S.R.-R. and D.M.; methodology, E.C., J.P., S.A.; software, J.P., S.A.; formal analysis, J.P., S.A.; investigation, S.R.-R., J.J., M.L.R.-L.; writing—original draft preparation, R.P., M.L.R.-L., J.J.; writing—review and editing, R.P., M.L.R.-L., J.J., E.C., J.P., S.A., J.V., J.F.-N., J.L.T., D.M. and S.R.-R.; visualization, M.L.R.-L.; supervision, S.R.-R., D.M., J.V., J.L.T.; funding acquisition, D.M., J.J., J.V. and S.R.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain) grants PI21/00770 and PI24/00156 (to J.J.), PI15/0625 (to D.M. and E.C.), PI18/0328

(to D.M.), and (PI20/00338 and PI23/01133 (to J.V.). S.R.-R. has received financial support from Spanish Ministry of Science and Innovation (grant number PID2020-117009RB-I00). J.J. has received financial support from Agencia Estatal de Investigación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and European Union “NextGeneration EU”/PRTR) within the action “Consolidación Investigadora 2022” (CNS2022-133559). Additionally, this study also received support from CIBER-Consortio Centro de Investigación Biomédica en Red en Diabetes y enfermedades metabólicas asociadas (CIBERDEM) (leading group CB15/00071, PI: D.M., Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. Institut de Recerca de l’Hospital de la Santa Creu i Sant Pau is accredited by the Generalitat de Catalunya as Centre de Recerca de Catalunya (CERCA). J.J., D.M. J.F.N. and M.L.R.-L. also belong to the XARTEC Salut network and are part of the coordinated consolidated group AGAUR (2021 SGR 00857, and 2021 SGR 01211). S.R.-R. and J.L.T. are part of the consolidated group AGAUR (2021 SGR 01110). This work was also supported by the PERIS program 2016–2018 (project Incidència de la diabetes tipus 2 a Catalunya (estudio di@bet.es), PI: J.F.-N., Instituto IDIAP Jordi Gol, grant PERIS SLT002/16/00107).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Clinical Investigation Committee of IDIAP Jordi Gol (P17/085, 26 April 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Pau Vendrell for performing the statistical analysis of the data.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

preDM	Prediabetes
T2D	Type 2 Diabetes
SCFA	Short-Chain Fatty Acids
NonDM	individuals with normoglycemia
Di@bet.es	Spanish national diabetes epidemiological study
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
FPG	Fasting Plasma Glucose
HbA1c	Glycated Hemoglobin
ADA	American Diabetes Association
FFQ	Food Frequency Questionnaire
GM	Gut Microbiota
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease
LDL	Low-Density Lipoprotein
HDL	High-Density Lipoprotein
AST	Aspartate Aminotransferase
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
FLI	Fatty Liver Index
16S rRNA	16S Ribosomal Ribonucleic Acid
OTU	Operational Taxonomic Unit
R	R statistical software
SD	Standard Deviation
CI	Confidence Interval

References

- Hostalek, U. Global epidemiology of prediabetes—Present and future perspectives. *Clin. Diabetes Endocrinol.* **2019**, *5*, 5. [\[CrossRef\]](#)
- Magliano, D.J.; Boyko, E.J.; IDF Diabetes Atlas 10th Edition Scientific Committee. *IDF Diabetes Atlas*, 10th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2021; ISBN 9782930229980.
- Ong, K.L.; Stafford, L.K.; McLaughlin, S.A.; Boyko, E.J.; Vollset, S.E.; Smith, A.E.; Dalton, B.E.; Duprey, J.; Cruz, J.A.; Hagins, H.; et al. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet* **2023**, *402*, 203–234. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mohan, V. Lessons learned from epidemiology of type 2 diabetes in South Asians: Kelly West Award Lecture 2024. *Diabetes Care* **2025**, *48*, 153–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Malik, V.S.; Fung, T.T.; van Dam, R.M.; Rimm, E.B.; Rosner, B.; Hu, F.B. Dietary patterns during adolescence and risk of type 2 diabetes in middle-aged women. *Diabetes Care* **2012**, *35*, 12–18. [\[CrossRef\]](#)
- Jayedi, A.; Soltani, S.; Abdolshahi, A.; Shab-Bidar, S. Healthy and unhealthy dietary patterns and the risk of chronic disease: An umbrella review of meta-analyses of prospective cohort studies. *Br. J. Nutr.* **2020**, *124*, 1133–1144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kim, H.; Westerman, K.E.; Smith, K.; Chiou, J.; Cole, J.B.; Majarian, T.; von Grothuss, M.; Kwak, S.H.; Kim, J.; Mercader, J.M.; et al. High-throughput genetic clustering of type 2 diabetes loci reveals heterogeneous mechanistic pathways of metabolic disease. *Diabetologia* **2023**, *66*, 495–507. [\[CrossRef\]](#)
- Chianelli, M.; Armellini, M.; Carpentieri, M.; Coccaro, C.; Cuttica, C.M.; Fusco, A.; Marucci, S.; Nelva, A.; Nizzoli, M.; Ponziani, M.C.; et al. Obesity in prediabetic patients: Management of metabolic complications and strategies for prevention of overt diabetes. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2025**, *25*, 8–36. [\[CrossRef\]](#)
- Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1–24. [\[CrossRef\]](#)
- Gao, Z.; Yin, J.; Zhang, J.; Ward, R.E.; Martin, R.J.; Lefevre, M.; Cefalu, W.T.; Ye, J. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* **2009**, *58*, 1509–1517. [\[CrossRef\]](#)
- Rios-Covián, D.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; De los Reyes-Gavilán, C.G.; Salazar, N. Intestinal short-chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 185. [\[CrossRef\]](#)
- Almugadam, B.S.; Liu, Y.; Chen, S.M.; Wang, C.H.; Shao, C.Y.; Ren, B.W.; Tang, L. Alterations of gut microbiota in type 2 diabetes individuals and the confounding effect of antidiabetic agents. *J. Diabetes Res.* **2020**, *2020*, 7253978. [\[CrossRef\]](#)
- Letchumanan, G.; Abdullah, N.; Marlini, M.; Baharom, N.; Lawley, B.; Omar, M.R.; Mohideen, F.B.S.; Addnan, F.H.; Nur Fariha, M.M.; Ismail, Z.; et al. Gut microbiota composition in prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A systematic review of observational studies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 943427. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhong, H.; Ren, H.; Lu, Y.; Fang, C.; Hou, G.; Yang, Z.; Chen, B.; Yang, F.; Zhao, Y.; Shi, Z.; et al. Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. *EBioMedicine* **2019**, *47*, 373–383. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lyu, L.; Fan, Y.; Vogt, J.K.; Clos-García, M.; Bonnefond, A.; Pedersen, H.K.; Dutta, A.; Koivula, R.; Sharma, S.; Allin, K.H.; et al. The dynamics of the gut microbiota in prediabetes during a four-year follow-up among European patients—An IMI-DIRECT prospective study. *Genome Med.* **2025**, *17*, 78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Seethaler, B.; Nguyen, N.K.; Basrai, M.; Kiechle, M.; Walter, J.; Delzenne, N.M.; Bischoff, S.C. Short-chain fatty acids are key mediators of the favorable effects of the Mediterranean diet on intestinal barrier integrity: Data from the randomized controlled LIBRE trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2022**, *116*, 928–942. [\[CrossRef\]](#)
- Rojo-Martínez, G.; Valdés, S.; Soriguer, F.; Vendrell, J.; Urrutia, I.; Pérez, V.; Ortega, E.; Ocón, P.; Montanya, E.; Menéndez, E.; et al. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort Di@betes study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 2765. [\[CrossRef\]](#)
- Soriguer, F.; Goday, A.; Bosch-Comas, A.; Bordiú, E.; Calle-Pascual, A.; Carmona, R.; Casamitjana, R.; Castaño, L.; Castell, C.; Catalá, M.; et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: The Di@betes study. *Diabetologia* **2012**, *55*, 88–93. [\[CrossRef\]](#)
- American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Diagnosis and classification of diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care* **2024**, *47* (Suppl. 1), S20–S42. [\[CrossRef\]](#)
- Ortega, E.; Franch, J.; Castell, C.; Goday, A.; Ribas-Barba, L.; Soriguer, F.; Vendrell, J.; Casamitjana, R.; Bosch-Comas, A.; Bordiú, E.; et al. Mediterranean Diet Adherence in Individuals with Prediabetes and Unknown Diabetes: The Di@betes Study. *Ann. Nutr. Metab.* **2013**, *62*, 339–346. [\[CrossRef\]](#)
- Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541. [\[CrossRef\]](#)
- Pruesse, E.; Quast, C.; Knittel, K.; Fuchs, B.M.; Ludwig, W.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7188–7196. [\[CrossRef\]](#)

23. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef]
24. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [CrossRef]
25. Lahti, L.; Shetty, S.; Blake, T.; Salojärvi, J. Tools for Microbiome Analysis in R, Version 2.1.28. Available online: <https://microbiome.github.io/tutorials/> (accessed on 5 September 2025).
26. Oksanen, J.; Simpson, G.L.; Blanchet, F.G.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Solymos, P.; Stevens, M.H.H.; Szöcs, E.; et al. Vegan: Community Ecology Package. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (accessed on 5 September 2025).
27. Gaikhe, A.H.; Paul, D.; Bhute, S.; Dhotre, D.P.; Pande, P.; Upadhyaya, S.; Reddy, Y.; Sampath, R.; Ghosh, D.; Chandraprabha, D.; et al. The gut microbial diversity of newly diagnosed diabetics but not of prediabetics is significantly different from that of healthy nondiabetics. *mSystems* **2020**, *5*, e00578-19. [CrossRef]
28. Allin, K.H.; Tremaroli, V.; Caesar, R.; Jensen, B.A.H.; Damgaard, M.T.F.; Bahl, M.I.; Licht, T.R.; Hansen, T.H.; Nielsen, T.; Dantoft, T.M.; et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia* **2018**, *61*, 810–820. [CrossRef]
29. Org, E.; Blum, Y.; Kasela, S.; Mehrabian, M.; Kuusisto, J.; Kangas, A.J.; Soininen, P.; Wang, Z.; Ala-Korpela, M.; Hazen, S.L.; et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol.* **2017**, *18*, 70. [CrossRef]
30. Pedersen, H.K.; Gudmundsdóttir, V.; Nielsen, H.B.; Hyötyläinen, T.; Nielsen, T.; Jensen, B.A.H.; Forslund, K.; Hildebrand, F.; Prifti, E.; Falony, G.; et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* **2016**, *535*, 376–381. [CrossRef] [PubMed]
31. Matz, L.M.; Shah, N.S.; Porterfield, L.; Stuyck, O.M.; Jochum, M.D.; Kaye, R.; Taglialetela, G.; Urban, R.J.; Buffington, S.A. Gut pathobiont enrichment observed in a population predisposed to dementia, type 2 diabetics of Mexican descent living in South Texas. *Front. Microbiomes* **2024**, *3*, 1456642. [CrossRef]
32. Maskarinec, G.; Raquinio, P.; Kristal, B.S.; Setiawan, V.W.; Wilkens, L.R.; Franke, A.A.; Lim, U.; Le Marchand, L.; Randolph, T.W.; Lampe, J.W.; et al. The gut microbiome and type 2 diabetes status in the Multiethnic Cohort. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0250855. [CrossRef] [PubMed]
33. Mayorga-Ramos, A.; Barba-Ostria, C.; Simancas-Racines, D.; Guzmán, L.P. Protective role of butyrate in obesity and diabetes: New insights. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 1067647. [CrossRef]
34. Gerritsen, J.; Fuentes, S.; Grievink, W.; van Niftrik, L.; Tindall, B.J.; Timmerman, H.M.; Rijkers, G.T.; Smidt, H. Characterization of *Romboutsia ilialis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2014**, *64*, 1600–1616. [CrossRef]
35. Chen, Z.; Radjabzadeh, D.; Chen, L.; Kurilshikov, A.; Kavousi, M.; Ahmadizar, F.; Ikram, M.A.; Uitterlinden, A.G.; Zernakova, A.; Fu, J.; et al. Association of insulin resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity: A microbiome-wide analysis from population studies. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4*, e2118811. [CrossRef]
36. Gravdal, K.; Kirste, K.H.; Grzelak, K.; Kirubakaran, G.T.; Leissner, P.; Saliou, A.; Casén, C. Exploring the gut microbiota in patients with pre-diabetes and treatment naïve type 2 diabetes—A pilot study. *BMC Endocr. Disord.* **2023**, *23*, 179. [CrossRef]
37. Zhao, L.; Lou, H.; Peng, Y.; Chen, S.; Zhang, Y.; Li, X. Comprehensive relationships between gut microbiome and faecal metabolome in individuals with type 2 diabetes and its complications. *Endocrine* **2019**, *66*, 526–537. [CrossRef]
38. Zhong, C.; Dai, Z.; Chai, L.; Wu, L.; Li, J.; Guo, W.; Zhang, J.; Zhang, Q.; Xue, C.; Lin, H.; et al. The change of gut microbiota-derived short-chain fatty acids in diabetic kidney disease. *J. Clin. Lab. Anal.* **2021**, *35*, e24062. [CrossRef] [PubMed]
39. Wu, H.; Tremaroli, V.; Schmidt, C.; Lundqvist, A.; Olsson, L.M.; Krämer, M.; Gummesson, A.; Perkins, R.; Bergström, G.; Bäckhed, F. The gut microbiota in prediabetes and diabetes: A population-based cross-sectional study. *Cell Metab.* **2020**, *32*, 379–390.e3. [CrossRef] [PubMed]
40. Zhang, X.; Shen, D.; Fang, Z.; Jie, Z.; Qiu, X.; Zhang, C.; Chen, Y.; Ji, L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71108. [CrossRef]
41. Li, J.; Li, Y.; Zhang, S.; Wang, C.; Mao, Z.; Huo, W.; Yang, T.; Li, Y.; Xing, W.; Li, L. Association of the short-chain fatty acid levels and dietary quality with type 2 diabetes: A case-control study based on Henan Rural Cohort. *Br. J. Nutr.* **2024**, *131*, 1668–1677. [CrossRef]
42. Rastelli, M.; Cani, P.D.; Knauf, C. The gut microbiome influences host endocrine functions. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 1271–1284. [CrossRef]
43. Wijdeveld, M.; Schrean, A.; Hagemeijer, A.; Nederveen, A.J.; Scheithauer, T.P.M.; Levels, J.H.M.; Predan, A.; de Vos, W.M.; Nieuwoudorp, M.; Ijzerman, R.G. Intestinal acetate and butyrate availability is associated with glucose metabolism in healthy individuals. *iScience* **2023**, *26*, 108478. [CrossRef]

44. Mariño, E.; Richards, J.L.; McLeod, K.H.; Stanley, D.; Yap, Y.A.; Knight, J.; McKenzie, C.; Kranich, J.; Oliveira, A.C.; Rossello, F.J.; et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 552–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Topping, D.L.; Clifton, P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and non-starch polysaccharides. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1031–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chambers, E.S.; Viardot, A.; Psichas, A.; Morrison, D.J.; Murphy, K.G.; Zac-Varghese, S.E.K.; MacDougall, K.; Preston, T.; Tedford, C.; Finlayson, G.S.; et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* **2015**, *64*, 1744–1754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. De Vadder, F.; Kovatcheva-Datchary, P.; Goncalves, D.; Vinera, J.; Zitoun, C.; Duchamp, A.; Backhed, F.; Mithieux, G. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* **2014**, *156*, 84–96. [[CrossRef](#)]
48. Llauradó, G.; Cedó, L.; Climent, E.; Badia, J.; Rojo-Martínez, G.; Flores-Le Roux, J.; Yanes, O.; Vinaixa, M.; Granado-Casas, M.; Mauricio, D.; et al. Circulating short-chain fatty acids and Mediterranean food patterns. A potential role for the Prediction of Type 2 Diabetes Risk: The Di@betes Study. *BMC Med.* **2025**, *23*, 337. [[CrossRef](#)]
49. Deng, K.; Xu, J.; Shen, L.; Zhao, H.; Gou, W.; Xu, F.; Fu, Y.; Jiang, Z.; Shuai, M.; Li, B.; et al. Comparison of fecal and blood metabolome reveals inconsistent associations of the gut microbiota with cardiometabolic diseases. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 571. [[CrossRef](#)]
50. Costin, I.D. Utilization of sodium acetate by *Shigella* and *Escherichia*. *J. Gen. Microbiol.* **1965**, *41*, 23–27. [[CrossRef](#)]
51. Zhao, S.; Liu, W.; Wang, J.; Shi, J.; Sun, Y.; Wang, W.; Ning, G.; Liu, R.; Hong, J. *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. *J. Mol. Endocrinol.* **2017**, *58*, 1–14. [[CrossRef](#)]
52. Liu, E.; Ji, X.; Zhou, K. *Akkermansia muciniphila* for the prevention of type 2 diabetes and obesity: A meta-analysis of animal studies. *Nutrients* **2024**, *16*, 3440. [[CrossRef](#)]
53. Ejtahed, H.S.; Hoseini-Tavassol, Z.; Khatami, S.; Zangeneh, M.; Behrouzi, A.; Ahmadi Badi, S.; Moshiri, A.; Hasani-Ranjbar, S.; Soroush, A.R.; Vaziri, F.; et al. Main gut bacterial composition differs between patients with type 1 and type 2 diabetes and non-diabetic adults. *J. Diabetes Metab. Disord.* **2020**, *19*, 265–271. [[CrossRef](#)]

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

4.2 Article 2

Títol: A specific gut microbiota signature is associated with an enhanced GLP-1 and GLP-2 secretion and improved metabolic control in patients with type 2 diabetes after metabolic Roux-en-Y gastric bypass.

Autors: Laura Hernández-Montoliu, M^a Mar Rodríguez-Peña, Rocío Puig, Brenno Astiarraga, Fernando Guerrero-Pérez, Nuria Virgili, Rafael López-Urdiales, Javier Osorio, Rosa Monseny, Claudio Lazzara, Lucía Sobrino, Manuel Pérez-Maraver, María Pérez-Prieto, Silvia Pellitero, Sonia Fernández-Veledo, Joan Vendrell, Nuria Vilarrasa.

Revista: Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Oct 17;14:1181744.
doi:10.3389/fendo.2023.1181744.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Ahmad Al-Mrabeh,
University of Edinburgh, United KingdomREVIEWED BY
Lorenzo Nasti,
University of Pisa, Italy
Tsvetelina Valkova,
Softa University, Bulgaria
Priyanka Banerjee,
Texas A&M Health Science Center,
United States*CORRESPONDENCE
Joan Vendrell joan.vendrell@isipiv.cat
jvartega@isipiv.cat
Nuria Vilarrasa
nuravilarrasa@yahoo.es[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship[‡]These authors have contributed
equally to this work and share
last authorshipRECEIVED 07 March 2023
ACCEPTED 22 September 2023
PUBLISHED 17 October 2023CITATION
Hernández-Montoliu L,
Rodríguez-Peña M-M, Puig R,
Astarraga B, Guerrero-Pérez F,
Virgili N, López-Urdiales R,
Osorio J, Monseny R, Lazzara C,
Sobrinho L, Pérez-Maraver M,
Pérez-Prieto M, Pellitero S,
Fernández-Veledo S, Vendrell J and
Vilarrasa N (2023) A specific gut microbiota
signature is associated with an enhanced
GLP-1 and GLP-2 secretion and improved
metabolic control in patients with type 2
diabetes after metabolic Roux-en-Y
gastric bypass.
Front. Endocrinol. 14:1181744.
doi: 10.3389/fendo.2023.1181744COPYRIGHT
© 2023 Hernández-Montoliu,
Rodríguez-Peña, Puig, Astarraga,
Guerrero-Pérez, Virgili, López-Urdiales,
Osorio, Monseny, Lazzara, Sobrinho,
Pérez-Maraver, Pérez-Prieto, Pellitero,
Fernández-Veledo, Vendrell and Vilarrasa.
This is an open-access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution License (CC BY). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

A specific gut microbiota signature is associated with an enhanced GLP-1 and GLP-2 secretion and improved metabolic control in patients with type 2 diabetes after metabolic Roux-en-Y gastric bypass

Laura Hernández-Montoliu^{1†}, M-Mar Rodríguez-Peña^{2,3†},
Rocío Puig^{4,5}, Brenno Astarraga^{2,3}, Fernando Guerrero-Pérez¹,
Nuria Virgili¹, Rafael López-Urdiales¹, Javier Osorio⁶,
Rosa Monseny⁷, Claudio Lazzara⁸, Lucía Sobrinho⁶, Manuel
Pérez-Maraver¹, María Pérez-Prieto¹, Silvia Pellitero⁸, Sonia
Fernández-Veledo^{2,3}, Joan Vendrell^{2,3,9*} and Nuria Vilarrasa^{1,3*}¹Department of Endocrinology and Nutrition, Bellvitge University Hospital-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ²Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona, Institut d'Investigació Santària Pere Virgili (ISPV), Tarragona, Spain; ³ICIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (ICIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain; ⁴Department of Endocrinology and Nutrition Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁵Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶Department of General and Gastrointestinal Surgery, Bellvitge University Hospital-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁷Clinical Nutrition Unit, Bellvitge University Hospital-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; ⁸Department of Endocrinology and Nutrition and Health Sciences Research Institute and University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁹Department of Medicine and Surgery, Universitat Rovira i Virgili (URV), Reus, Spain**Objective:** To determine changes in incretins, systemic inflammation, intestinal permeability and microbiome modifications 12 months after metabolic RYGB (mRYGB) in patients with type 2 diabetes (T2D) and their relationship with metabolic improvement.**Materials and methods:** Prospective single-center non-randomized controlled study, including patients with class II-III obesity and T2D undergoing mRYGB. At baseline and one year after surgery we performed body composition measurements, biochemical analysis, a meal tolerance test (MTT) and lipid test (LT) with determination of the area under the curve (AUC) for insulin, C-peptide, GLP-1, GLP-2, and fasting determinations of succinate, zonulin, IL-6 and study of gut microbiota.

Results: Thirteen patients aged 52.6 ± 6.5 years, BMI 39.3 ± 1.4 kg/m², HbA_{1c} $7.62 \pm 1.5\%$ were evaluated. After mRYGB, zonulin decreased and an increase in AUC after MTT was observed for GLP-1 (pre 9371 ± 5973 vs post 15788 ± 8021 pM, $P < 0.05$), GLP-2 (pre 732 ± 182 vs post 1190 ± 447 ng/ml, $P < 0.001$) and C-peptide, as well as after LT. Species belonging to Streptococcaceae, Akkermansiaceae, Rikenellaceae, Sutterellaceae, Enterobacteriaceae, Oscillospiraceae, Veillonellaceae, Enterobacteriales_uc, and Fusobacteriaceae families increased after intervention and correlated positively with AUC of GLP-1 and GLP-2, and negatively with glucose, HbA_{1c}, triglycerides and adiposity markers. *Clostridium perfringens* and *Roseburia* sp. 40_7 behaved similarly. In contrast, some species belonging to Lachnospiraceae, Erysipelotricaceae, and Ruminococcaceae families decreased and showed opposite correlations. Higher initial C-peptide was the only predictor for T2D remission, which was achieved in 69% of patients.

Conclusions: Patients with obesity and T2D submitted to mRYGB show an enhanced incretin response, a reduced gut permeability and a metabolic improvement, associated with a specific microbiota signature.

KEYWORDS

incretin, microbiota, type 2 diabetes remission, severe obesity, bariatric surgery

1 Introduction

Bariatric surgery (BS) is a highly effective therapy for patients with obesity and type 2 diabetes mellitus (T2D), and many mechanisms have been proposed for its metabolic benefits (1). One of the main drivers of T2D improvement is the enhanced delivery of nutrients and bile to the distal gastrointestinal (GI) tract as a consequence of anatomical rearrangement, along with a rapid gastric emptying leading to increased nutrient-stimulated secretion of such gut hormones as glucagon-like peptide 1 (GLP-1), peptide YY and oxyntomodulin, implicated in the improvement of β cell function and food intake regulation (2) (3) (4). Also, caloric restriction, weight loss, reduction in insulin resistance (IR) and decreased pancreatic and hepatic fat deposits have been implicated in T2D remission. More recently, bile acid diversion and gut microbiome have been recognized as important factors in the complex network of glucose homeostasis after BS (5) (6) (7) (8) (9). Although current knowledge links gut microbiota to host glucose metabolism, the mechanisms are still unclear (10) (11).

Low concentrations of Firmicutes and an increase in the relative abundance of Gammaproteobacteria and Akkermansia muciniphila after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) have been observed among

humans (12) (13) (14) (15) and rodents (16) (17) (18). These changes seem to contribute to decreased intestinal permeability, improving IR. Few previous studies have characterized the microbiota directly linked to metabolic improvement and T2D remission after RYGB, although findings have been heterogeneous. In some, a more significant number of Actinobacteria was observed (19). In others, there was a higher abundance of *Eubacteriaceae* and *Alistipes putredinis* pre-surgery, and *Lachnospiraceae* and *Roseburia* 12 months after surgery, in patients achieving T2D remission (20). However, studies analyzing the direct relationship between incretin secretion and specific gut microbiota species are scarce in human subjects with obesity (21) and absent in subjects with severe obesity and T2D.

In this scenario, we aimed to determine the changes in enteroendocrine hormones, systemic inflammation, intestinal permeability and microbiome modifications 12 months after metabolic RYGB (mRYGB) in patients with obesity and T2D. Also, we studied the relationship between these changes and the metabolic improvement. The follow-up time was set at 12 months since this is the point where the weight reaches its nadir after bariatric surgery and then stabilizes (22). For this reason, we consider that it is the best time to study changes in body composition, metabolism, and microbiota.

2 Materials and methods

A prospective single-center, non-blinded non-randomized controlled trial study was conducted, including patients with classes II and III obesity and T2D undergoing mRYGB. Patients

Abbreviations: RYGB: Metabolic Roux-en-Y gastric bypass; T2D: Type 2 diabetes; MTT: Meal tolerance test; LT: Lipid test; AUC: Area under the curve; GLP-1: Glucagon-like peptide-1; GLP2: Glucagon-like peptide-2; IL-6: interleukin-6; IR: Insulin resistance; LPS: Lipopolysaccharide; RYGB: Roux-en-Y gastric bypass; SG: Sleeve gastrectomy; BMI: Body mass index; TWL: Total weight loss.

were consecutively recruited from the obesity outpatient clinic of Bellvitge University Hospital. The inclusion criteria were as follows: age between 18 and 60 years old, body mass index (BMI) 35–43 kg/m², T2D on hypoglycemic agents, insulin, or both. The exclusion criteria were the following: type 1 diabetes or positivity for glutamic acid decarboxylase autoantibodies, secondary forms of diabetes, acute metabolic complications in the previous 6 months, liver disease, renal dysfunction, previous BS, pregnancy, breastfeeding, or desired pregnancy in the 12 months following inclusion, and corticoid use by oral or intravenous route for more than 14 consecutive days in the previous three months. All patients signed informed consent, the protocol study (PI14/01997) was approved by the Clinical Research Ethics Committee (reference PR 198/14) and conducted in according with the principles of the Declaration of Helsinki.

At baseline and one year after surgery, patients underwent an anthropometric and body composition analysis with DEXA (HoQDR 4500; Hologic Inc., Waltham, MA), a complete biochemical examination, a standardized meal tolerance test (MTT), and a lipid test (LT). MTT consisted in the intake of 200ml of a standard meal (16% proteins, 49% carbohydrates, and 30% lipids [320 kcal]; IsoSource Energy[®], Nestle Health Science) over 5 min. Blood was sampled before meal ingestion (time 0 min) and at 15, 30, 60, and 120 min after meal ingestion. The LT was performed using an oral lipid solution ingested over 5 min, containing 50 g of fat in 100 mL of solution, of which 30% was saturated, 49% was monounsaturated, and 21% was polyunsaturated. Blood samples were drawn at fasting state (time 0 min) and at 60, 120, and 180 min after lipid ingestion.

All pharmacological treatment was stopped three days before the functional tests, except insulin treatment which was stopped 12 hours before the tests. Proton pump inhibitors were prescribed after surgery for only three months. In the month preceding the surgical procedure, all patients adhered to a very low-calorie diet, characterized by an intake of <800 kcal/day. This dietary regimen was achieved through the implementation of meal replacement with Optifast[®] Nestle HealthScience, which is composed of 0.7 kcal/ml with a macronutrient distribution of 40% proteins, 30% carbohydrates, and 30% fats. Following the surgical intervention, diligent oversight was maintained over all patients by licensed dietitians, who provided guidance on adhering to a well-balanced diet, inclusive of all essential nutrients as stipulated by clinical guidelines for gastric bypass surgery (23). Probiotics were not administered to any of the patients to prevent potential interference with the microbiota analysis outcomes.

During the MTT and LT, plasma, insulin, C-peptide, GLP-1 and GLP-2 were determined at all-time points, whereas succinate, IL-6 and zonulin concentrations were only determined in the fasting state. Plasma insulin and C-peptide were determined by immunochemiluminometric assay (ADVIA Centaur, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany), total plasma GLP-1 and GLP-2 by ELISA technique (respectively, EZGLP1T-36K and EZGLP-2-37K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, respectively) and plasma succinate on plasma filtrate (10,000 kD) using a fluorometric assay (EnzyChrom[™] Succinate Assay Kit, BioAssay Systems, USA). Fasting IL-6 and zonulin were analyzed by using ELISA high

sensitivity kit (HS600C, USA R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) and ELISA (K5601, Immundiagnostik AG, Bensheim, German), respectively. Glucose and cholesterol were quantified using molecular absorption spectrometry, employing the Cobas[®] 8000 system by Roche Diagnostics. Specifically, glucose levels were determined using the GLUC3 Gen.3 assay on the cobas c503 platform (Roche Diagnostics, reference number 08057800190), while LDL cholesterol levels were assessed with the HiCo Gen.2 assay, comprising 2100 tests on the cobas C platform (Roche Diagnostics, reference number 5168538190). Additionally, HDL cholesterol levels were measured using the Cobas C-Col HDL rct 500d assay (Roche Diagnostics, reference number 07328582190).

2.1 Surgical procedures

mRYGB combined restriction, creating a small gastric pouch of 100 ml, with hypo absorption that was accomplished by a 200 cm biliopancreatic limb and an alimentary limb of 100 cm.

2.2 T2D Remission

After one year of follow-up, complete remission was defined as an HbA_{1c} <6% in the absence of hypoglycemic treatment (24). To consider that the patients achieved complete remission, we verified that they had an HbA_{1c} <6% one year after surgery and without hypoglycemic treatment for at least 3 months previous to follow-up evaluation.

2.3 Stool sample collection, DNA extraction, and metagenomic sequencing

To assess taxonomic and functional changes in fecal samples collected we used shotgun sequencing of stool DNA for whole metagenome analysis. Patients collected their fresh stool samples at home, which were then immediately frozen in their home freezer at -20°C. Frozen samples were delivered to the hospital within two days using insulating polystyrene foam containers and were kept at -80°C until analysis. DNA extraction was performed using the QIAamp DNA stool kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA quantification was performed using a Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), and one ng of each sample (0.2 ng/μL) was used for shotgun library preparation using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA). Sequencing was carried out on a NextSeq 500 sequencer (Illumina) with 150-bp paired-end chemistry at the Sequencing and Bioinformatic Service of FISABIO (Valencia, Spain).

Taxonomic assignments of total DNA metagenomic sequencing were carried out through Kaiju (25), a program for computationally efficient and sensitive taxonomic classification of high-throughput sequencing reads from metagenomics sequencing experiments, by which each sequencing read is assigned to a taxon in the NCBI taxonomy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) by

comparing it to the microbial subset of the NCBI BLAST non-redundant protein database, not including fungi and microbial eukaryotes.

2.4 Statistical analysis of taxonomical and clinical features

Sequence data were analyzed using the phyloseqR (version 1.28.0) (26), vegan (version 2.5-5) (27), metagenomeSeq (version 1.26.2) (28) and ggsplot2 packages implemented in R. Taxonomical analysis reached species level if possible unless otherwise stated (–uc annotated).

Abundance raw-data counts were normalized using the cumulative sum scaling (CSS) method (28). The zero-inflated Gaussian mixture model (FitZig), was applied over the cumulative sum scaling-normalized data to account for abundance differences of species between pre- and post-treatment, by including the patient identifier variable (IDPAT) as a covariate in the analysis to account for the paired nature of the data. This approach has proven to be more effective than comparable differential abundance methods such as DESeq, edgeR or Voom (29).

To evaluate alpha diversity of bacterial communities, Shannon's index and OTUs (Observed species) were calculated using the phyloseqR package. The proportion and composition of the most abundant species in the data was aggregated at both Phylum and Family levels. The beta diversity was computed under the Bray-Curtis dissimilarity index (30) and linked to clinical variables using the distance-based Adonis procedure (31). Implementation in the principal component analysis (PCA) on the CSS normalized data was applied to represent the percentage of explained data variation in the most relevant clinical variables, as well as to identify potential outliers and rare species. Clinical variables were tested for normality using the Shapiro-Wilk test before running inferential statistics. Non-parametric data were evaluated by the Wilcoxon rank-sum test, while normally distributed variables were examined by Student's t-test. P-values less than 0.05 were considered significant after applying the Benjamini-Hochberg multiple testing procedure. The relationship between clinical variables and alpha diversity measures was evaluated using a linear mixed effect model, considering the alpha diversity as response variable, the clinical variable as fixed effect and the patient as random effect. Spearman's rank correlation was used to investigate associations between microbial data and reported clinical variables using a customized z-score metric supported by a global signature correction approach (32) (33) (34).

Spearman's rank correlation was also used to investigate associations between normalized microbial abundance counts, at a species level, with reported clinical variables. P-values were then adjusted with the false rate discovery method. Correlations and adjusted P-values were computed with R package stats (version 4.0.5).

2.5 Statistical analysis

Data are presented as mean ($\pm$ SD) or percentage for normally distributed quantitative variables or median and interquartile range for non-normally distributed quantitative variables. The categorical

variables were described as the number of cases and the percentage concerning the total. When necessary, the correlation between quantitative variables was calculated using Pearson's or Spearman's test. Paired t-tests and Wilcoxon signed-rank tests were used to evaluate the impact between groups according to each metabolic distribution. The area under the time concentration curve (AUC) for GLP-1, GLP-2, insulin, and glucose, was calculated using the trapezoidal rule (35).

Logistic regression analysis was used to determine variables associated with T2D remission. The model included the following variables: initial C-peptide levels, HbA_{1c}, succinate concentrations, time of T2D duration, insulin treatment, total weight loss, and GLP-1 and 2 responses. Spearman's rank correlation was used to investigate associations between normalized microbial abundance counts, at a species level, with reported clinical variables. P-values were then adjusted with the false rate discovery method. Correlations and adjusted P-values were computed with R package stats (version 4.0.5).

3 Results

From June 2016 to June 2017, 15 patients with severe obesity and T2D were consecutively recruited and included in the study; two could not complete the follow-up due to sudden death (n=1) and severe pneumonia with prolonged hospitalization in another patient (n=1). Finally, 13 patients were included in the analysis. The studied cohort had a mean age of 52.6 $\pm$ 6.5 years, a mean BMI of 39.3 $\pm$ 1.4 kg/m², and an initial HbA_{1c} of 7.62 $\pm$ 1.5%, with 69.2% of patients under insulin treatment. Table 1 summarizes the characteristics of the participants.

3.1 Metabolic profile changes after surgery

Twelve months after mRYGB, a dramatic reduction was observed in weight with 34.2 $\pm$ 6.1% of total weight loss (TWL) at the expense of a fat mass of 36.1 $\pm$ 5.1%. As expected, a significant metabolic improvement after surgery was found with a decrease in fasting plasma glucose, HOMA-IR, HbA_{1c} levels, and lipid profile (Table 1). T2D remission was achieved in 69% of patients.

Following MTT, AUC for glucose significantly decreased after the intervention (pre 1677 vs post 1049 mmol/L, $P < 0.05$), whereas an increase in C-peptide AUC was observed (pre 277 vs post 325 mmol/L, $P < 0.001$) (Figure 1). Postprandial serum C-peptide to plasma glucose concentration ratio significantly increased after surgery 0.24 $\pm$ 0.27 vs 0.98 $\pm$ 0.91, $P < 0.05$.

As markers of systemic inflammation, IL-6 showed a trend to decrease after surgery, but without reaching statistical significance, and fasting plasma succinate was significantly reduced after surgery at 79.74 $\pm$ 28.8 vs. 50.97 $\pm$ 15.3 μ mol/L, $P = 0.001$.

3.2 Evaluation of intestinal permeability

Zonulin plasmatic levels are a reliable biomarker of the intestinal barrier integrity of the small intestine (36). It circulates

TABLE 1. Participant characteristics at baseline and 1 year post-surgery.

	Pre-surgery N=13	Post-surgery N=13	P overall
Sex (male/female)	4/9	4/9	
Age (years)	52.6 ±6.56	53.8 ±6.56	
Weight (kg)	103 ±15.2	68.1 ±14.2	<0.001
BMI (kg/m ²)	19.3 ±1.44	25.8 ±2.08	<0.001
Waist (cm)	125 ±16.4	92.4 ±11.3	<0.001
Hip (cm)	125 ±15.1	100 ±6.62	<0.001
Fat Mass (%)	31.5 ±12.6	20.1 ±4.95	0.01
Lean Mass (%)	46.7 ±8.7	46.2 ±10.9	0.57
Body Fat (%)	43.1 ±5.30	29.6 ±6.13	<0.001
Insulin treatment, N (%)			
Yes (%)	9 (69.2)	1 (7.69)	
No (%)	4 (30.8)	12 (92.3)	
PPG (mmol/L)	9.8 ±4.6	5.29 ±1.4	0.03
HbA _{1c} (%)	7.62 ±1.5	5.44 ±0.85	<0.001
HOMA-IR	8.67 ±6.45	1.50 ±0.75	<0.001
Total Cholesterol (mmol/L)	4.90 ±1.01	4.97 ±0.66	0.02
HDL (mmol/L)	1.18 ±0.43	1.28 ±0.23	0.20
LDL (mmol/L)	2.93 ±0.87	2.30 ±0.6	0.08
Triglycerides (mmol/L)	2.93 ±2.97	1.25 ±0.58	0.07
IL-6 (pg/mL)	3.49 ±1.74	2.49 ±2.01	0.20
Zonulin (ng/mL)	3.13 ±0.45	2.49 ±0.41	<0.001
Seccinate (nMol)	79.74 ±28.8	50.97 ±15.3	<0.001

Data are expressed as mean ± SD. P values were calculated using paired t-test. Fat, lean and body mass were measured by DEXA. BMI, Body mass index; PPG, Fasting plasma glucose; HOMA-IR, Homeostatic model assessment of insulin resistance; IL-6, Interleukin 6.

in the blood and binds to a receptor in the enterocytes leading to dysfunction of tight junctions that finally increases small intestine permeability (37).

Zonulin significantly decreased after mRYGB 3.13 ± 0.45 vs 2.49 ± 0.41 ng/mL, ($P=0.01$).

3.3 Incretin profile changes with surgery

When analyzing the incretin profile after MTT, a restoration of the typical slope for GLP-1 and GLP-2 was observed with the corresponding increase in AUC for both hormones after surgery: GLP-1 AUC pre 9731 vs post 15788 pM, $P<0.05$ and GLP-2 AUC pre 732 vs post 1190 ng/ml, $P<0.001$ (Figure 2). The same behavior

was found after LT for both GLP-1 (AUC pre 13751 vs. post 21070 pM, $P=0.01$) and GLP-2 (AUC pre-1160 vs. post-1654 ng/ml, $P=0.01$).

Within the study sample comprising 13 participants, of which 9 were female, representing over 50% of the cohort, an investigation into potential differences in GLP-1 and GLP-2 levels before and after surgical intervention was conducted among the female subgroup, consisting of 4 pre-menopausal and 5 post-menopausal individuals. The analysis revealed that there were no statistically significant distinctions in GLP-1 and GLP-2 levels between the pre-menopausal and post-menopausal groups before and after the surgical procedure.

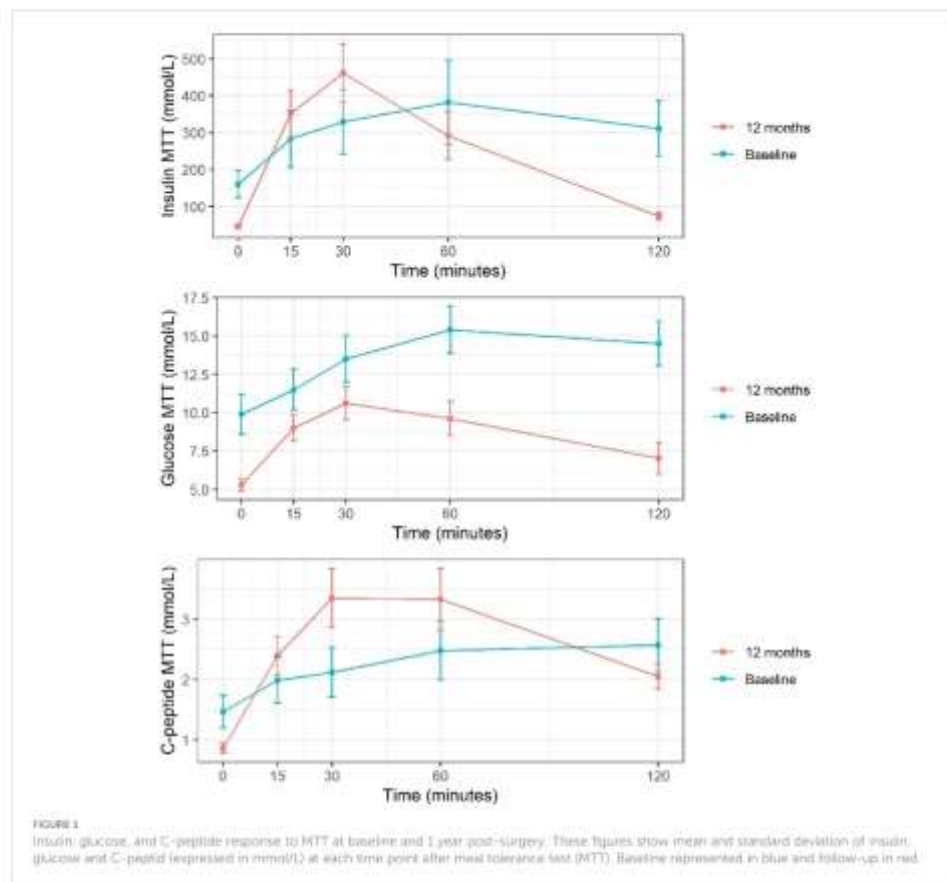
3.4 Changes in gut microbiota and relationship with anthropometric parameters

The surgical intervention had no significant impact on richness and evenness, measured by the Shannon diversity index. Nonetheless, it affected beta diversity ($P=0.005$) estimated by the Bray distance as a metric to describe overall microbiota structure. A common feature of microbiome data analysis was the statistical sparsity and the lack of homogeneously distributed variables among individuals. This limitation was overcome by applying the FitZig mixture model (28). This analysis of the elapsed studied time revealed that 111 different species significantly increased ($P_{adj}<0.05$) after the follow-up, and 67 other species reduced considerably ($P_{adj}<0.05$) in abundance after the intervention.

Most of the significantly increased taxa after the follow-up belonged to the Streptococcaceae (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus_uc*, *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus parvusanguinis*), Akkermansiaceae (*Akkermansia* sp. CAG344), Rikenellaceae (*Alistipes* sp. HGB5 and *Alistipes finegoldii* CAG:68), Sutterellaceae (*Sutterella_uc* and *Sutterella wadsworthensis*), Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella_uc*), Oscillatoriaceae (*Oscillatoria* sp. 57_20), Veillonellaceae (*Veillonella_uc*, *Veillonella atypica*, *Veillonella dispar* and *Veillonella parvula*), Enterobacterales_uc, and Fusobacteriaceae (*Fusobacterium_uc*) families. They showed a significant negative correlation ($P_{adj}<0.05$) with some clinical and metabolic parameters studied (weight, BMI, waist circumference, body fat, HbA_{1c}, glucose and triglycerides). (Figure 3)

Of note, *Clostridium perfringens* (Clostridiaceae family) and *Roseburia* sp. 40_7 (Lachnospiraceae family) that increased after follow-up showed a significant negative correlation with body fat and BMI, even belonging to families that generally decreased after the intervention and had opposite correlations.

On the other hand, downregulated species after surgery belong to the Clostridiaceae family (*Clostridium* sp. CAG:169, *Clostridium* sp. KLE 1755, and *Clostridium phocensis*), Lachnospiraceae family (*Blautia* sp. CAG257, *Lachnospiraceae bacterium* 1_4_56FAA, *Blautia Marseille-P3201T*), Erysipelotricaceae (*Holdemanella_uc* and *Coprobacillus_uc*), Clostridia_uc, and Ruminococcaceae (uncultured *Faecalibacterium* sp., *Subdoligranulum variabile*,



Faecalibacterium sp. CAG:82, *Ruminococcus* sp. 37_24, *Ruthenibacterium lactatiformans*, *Faecalibacterium_uc*, *Ruminococcus* sp. CAG:177 and *Ruminococcaceae_uc*) showed a significant positive correlation with some clinical and metabolic parameters reported (Figure 3).

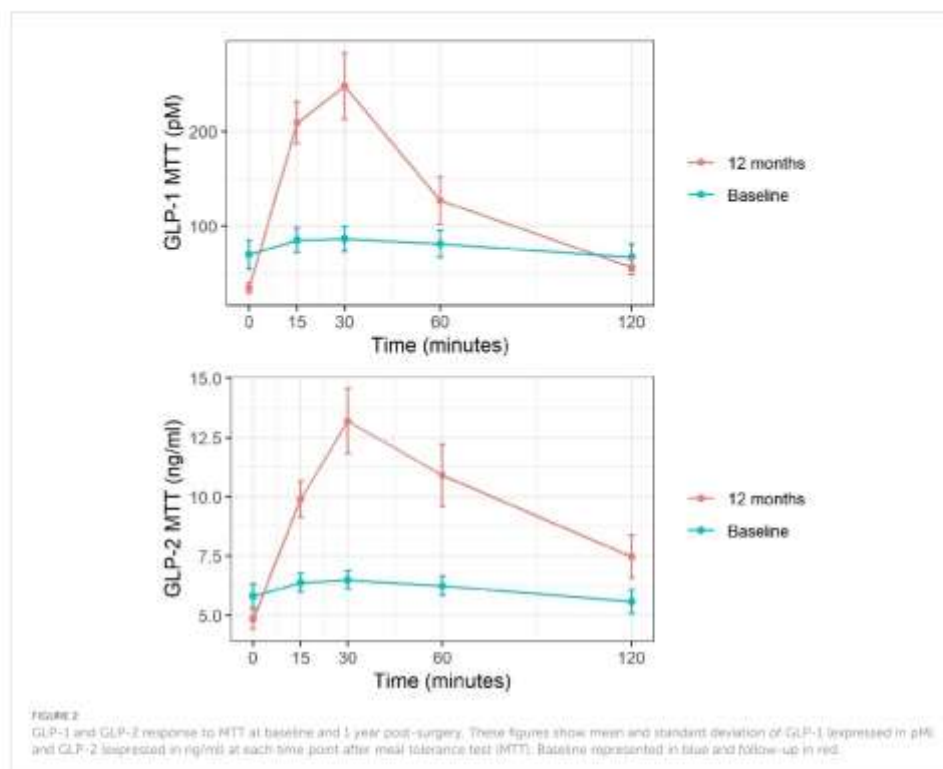
We also analyzed the correlation of microbiota families with other variables, such as gut permeability markers (zonulin) but found no association. Of note, pre-surgical zonulin correlated positively with weight ($r=0.61$, $P=0.027$), and with pre-surgical AUC glucose ($r=0.750$, $P=0.03$).

3.5 Gut microbiota and incretin response

A close relationship between gut microbiota and incretin response after BS was found in our study. Most of the species that increased after BS that were previously mentioned belonged to

the Streptococcaceae (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus_uc*, *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus parasanguinis*), Akkermansiaceae (*Akkermansia* sp. CAG:344), Rikenellaceae (*Alistipes* sp. HGB5 and *Alistipes finegoldii* CAG:68), Sutterellaceae (*Sutterella_uc* and *Sutterella wadsworthensis*), Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella_uc*), Oscillospiraceae (*Oscillibacter* sp. 57_20), Veillonellaceae (*Veillonella_uc*, *Veillonella atypical*, *Veillonella dispar* and *Veillonella parvula*), Enterobacteriales_uc, and Fusobacteriaceae (*Fusobacterium_uc*) families, revealed a significant positive correlation ($P_{adj}<0.05$) with AUC of GLP-1 and/or GLP-2 after MTT and IT. Moreover, *Clostridium perfringens* (Clostridiaceae family) and *Roseburia* sp. 40_7 (Lachnospiraceae family) that increased after follow-up showed a positive correlation with AUC GLP-1 during the MTT (Figure 3).

By contrast, some species that were downregulated after surgery belong to Lachnospiraceae (*Lachnospiraceae bacterium*



1_4_56FAA, *Blautia* sp. Marseille-P3201T), *Erysipelotricaceae* (*Coprothobacteriaceae*), *Ruminococcaceae* (*Subdoligranulum variabile* and *Faecalibacterium* sp. CAG-82) families, and showed a significant negative correlation with AUC for GLP-1 and/or GLP-2 after MTT and LT (Figure 3).

3.6 T2D remission

Patients achieving complete T2D remission (69% of the sample) had higher initial C-peptide 1.83 ± 0.95 vs 0.67 ± 0.26 nmol/L ($P=0.040$), higher postprandial serum C-peptide to plasma glucose concentration ratio 1.28 ± 0.93 vs 0.30 ± 0.22 ($P=0.015$), lower T2D duration 9.6 ± 8.3 vs 16.2 ± 8.4 years ($P=0.216$), but similar proportion of insulin treatment compared to non-remitters. Higher pre-surgical and post-surgical AUC for C-peptide and insulin after MTT were observed in patients achieving T2D remission. However, AUC for GLP-1 and GLP-2 before and after surgery were similar, independently of metabolic outcomes.

In the multiple regression analysis, only higher initial C-peptide levels predicted better metabolic outcomes ($R^2 = 0.331$, $P=0.040$), whereas pre-surgery HbA_{1c} , TWL , AUC for GLP-1, GLP-2, or

succinate were not found to be determinants of T2D remission. Despite the association of the above species with some metabolic parameters, no specific species were linked to T2D remission.

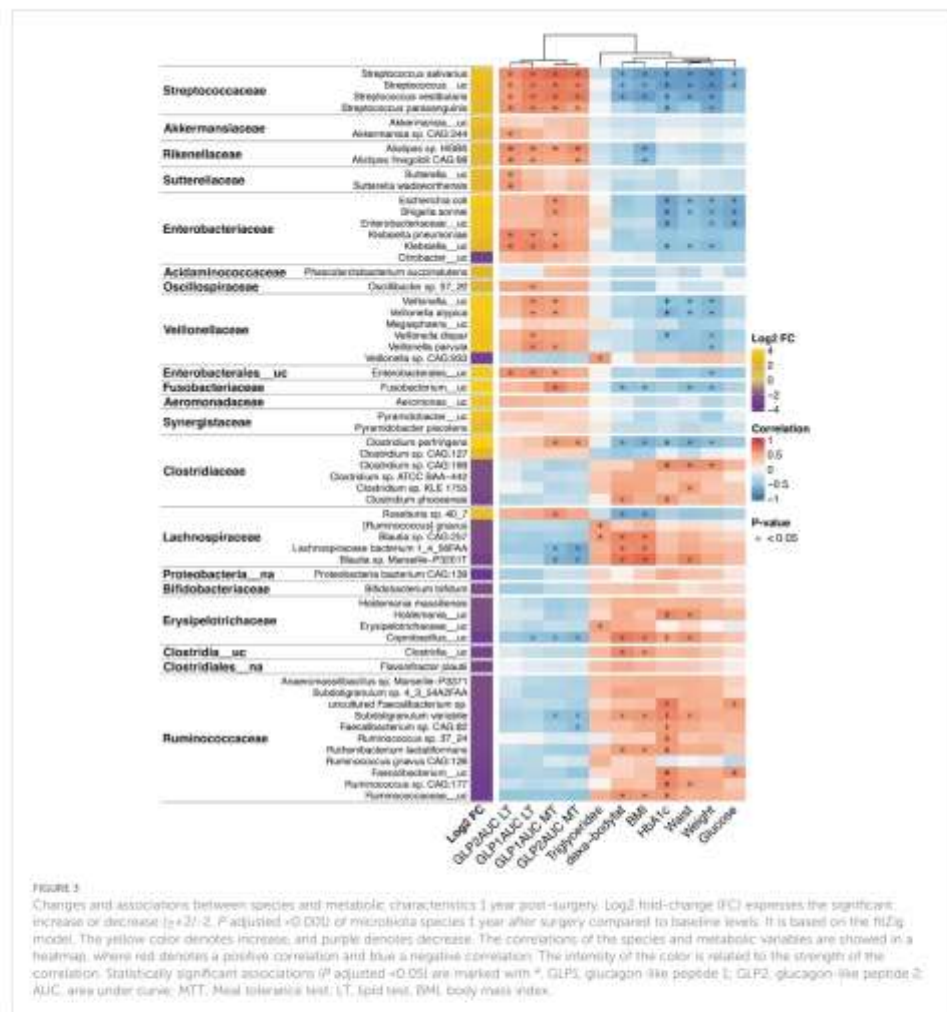
4 Discussion

This study points to an association between a specific microbiome signature with a restoration of the incretin response, and metabolic improvement after mRYGB in patients with T2D, including a new player in post-surgery diabetes remission.

4.1 Association between gut microbiota, incretin response and metabolic parameters

A significant increase in GLP-1 and GLP-2 secretion during the MTT and LT after mRYGB was associated with changes in the microbiome.

To our knowledge, no previous study has analyzed the relationship between incretin response and the gut microbiota



profile after metabolic surgery in patients with severe obesity and T2D.

In our cohort, a greater presence after surgery of species belonging to the families of Streptococcaceae, Akkermansiaceae, Rikenellaceae, Enterobacteriaceae, Oscillospiraceae, Veillonellaceae, Enterobacteriales, and Fusobacteriaceae, typically observed after massive weight loss in these patients, was associated with the improvement in the incretin (AUC for GLP-1 and GLP-2) and metabolic profile. Interestingly, species belonging to Ruminococcaceae, Erysipelotrichaceae, and Lachnospiraceae families that decreased after surgery showed an inverse association with the incretin response after an oral stimulus and with metabolic parameters. In contrast to other of their family species, *Clostridium perfringens* and *Roseburia* sp.

40_7 increased after surgery and correlated inversely with adiposity parameters and positively with incretin response.

Earlier studies have shown that BS induces a favorable shift into a healthier microbiome profile characterized by increased microbial richness (38) (39), and the changes are greater in RYGB compared to sleeve gastrectomy (SG) (40) (42). In our study, the overall changes after mRYGB in gut microbiota are similar to those previously described (40) (42) (41) (42) (43) (44) (45). However, with current evidence, it is difficult to associate the Firmicutes/Bacteroidetes ratio with a determined health status, including obesity (46). Our results showed that the species that decreased after surgery all belonged to the phylum Firmicutes, but the species

that increased were heterogeneous, belonging to both the Firmicutes and Bacteroidetes phyla, as well as others.

These modifications can be explained by several factors other than diet modifications, such as the gastrointestinal tract's rearrangement, a relevant anatomical shift, a determinant in bile acids production, and luminal pH changes (47). The lower gastric acid exposure might promote the proliferation of phylotypes from the oral cavity, such as *Escherichia*, *Veillonella*, *Streptococcus* genus (48), and also *Akkermansia*, which grows in a higher pH than the gastric microbes (49). Of note, these bacteria can ferment amino acids and carbohydrates into metabolites such as propionate and butyrate which have been associated with weight reduction (50), reduced gut permeability (51) (52) (53) (54) and a beneficial metabolic profile (55) (56), in line with the findings described in our study. On the other hand, we observed a decrease in species belonging to the families of Ruminococcaceae, Erysipelotrichaceae, and Lachnospiraceae, which belong to the Firmicute sphyllum. As a phylum, Firmicutes are more acid adaptive and the increased alkaline environment following mRYGB is a factor along with a diet that might explain their reduction (57). As in other studies, we observed a decrease in the *Clostridium* species (with the exception of *Clostridium perfringens*), which could be partly explained because bypassing the duodenum introduces some oxygen to the gastrointestinal tract, inhibiting the growth of obligate anaerobes (58). However, changes in bile acids specifically the lower levels of all primary and secondary conjugated bile acids in the colon content after RYGBP has been linked in rodents with higher relative abundances of *Clostridium perfringens*, in agreement with our findings (59).

One proposed mechanism by which gut microbiota can influence metabolic outcomes is its potential ability to modify incretin secretion, among other gastrointestinal hormones (60). In rodent studies, it has been reported that healthier intestinal microbiome can provide increased luminal-derived secondary bile acids and propionate, activating the L-cell secretion of GLP-1 and GLP-2, enhancing insulin secretion and maintaining gut barrier integrity, respectively (61) (62). Also in mice, the use of probiotics, mainly *Lactobacillus*, has been associated with an enhancement of GLP-1 response and improvement of metabolic parameters (63). However, to date, there is scarce information linking specific bacteria with incretin dynamics after BS in animal models (57) (64) or humans (65). In other clinical settings, such as in healthy, normal weight subjects fed with resistant starch, a high baseline abundance of *Streptococcus* has been associated with increased postprandial levels of GLP-1, insulin, and C-peptide (66). Accordingly in our study, some species of Streptococcaceae family increased after surgery, and showed a significant positive association with AUC GLP-1 and GLP-2 after the MTT. Furthermore, in our study, increased GLP-2 secretion after an oral lipid load was also associated with some Akkermansiaceae species, and strikingly, GLP-1 secretion was also associated with the Veillonellaceae family and *Clostridium perfringens*. Although we cannot assume causality in these associations, some *in vivo* studies in mice and *in vitro* using human L-cell found that *Akkermansia muciniphila* stimulated GLP-1 by the secretion of a protein named P9, which binds to ICAM-2 receptors in L-cell (67). In rats

undergoing RYGB, this bacterium was positively related to GLP-1 levels (64). Regarding Veillonellaceae, no previous direct association with incretins has been previously described. However, in a study performed on patients with non-alcoholic fatty liver treated with a fibroblast growth factor-19 analog, which decreased toxic bile acids, *Veillonella* was the only taxa exhibiting a significant increase (68). Therefore, as *Veillonella* seems to be a bile acid-sensitive bacterium, and these are known triggers of GLP-1 secretion, the association found in our study is reasonable and may be mediated by bile acid changes after BS. Commensal Clostridia are strongly involved in maintaining the overall gut function; in a previous study, *Clostridium asparagiforme* and *Clostridiales* bacterium 1_7_47FAA increased and were positively correlated with postprandial GLP-1 in patients with obesity after SG (63). Another study increasing *Clostridium* sp. CAG-127 has been associated with GLP-2 response in subjects without severe obesity after diet-induced weight loss (21). Nevertheless, our finding of *Clostridium perfringens* association with GLP-1 has never been reported and requires further analysis as it may reflect potential beneficial effects of this species in the context of a hypoabsorptive technique. It is important to highlight that although *C. perfringens* can be a potential pathogen, it is a ubiquitous bacterium and part of the ecological community in the intestinal tract of humans (69).

Our data revealed that a better metabolic and incretin profile after surgery was linked to a specific gut microbiota composition. Still, the study failed to characterize a particular gut microbiota related to T2D remission, probably because it was underpowered to reach significance. Previous studies have described an increase in *Roseburia intestinalis* in patients achieving remission after RYGB and SG (20) (19), and *Akkermansia muciniphila* has been linked to a better metabolic profile mainly after SG (40) (70). As previously exposed, we observed an increase in *Roseburia* sp. and Akkermansiaceae family that was positively related to an enhanced incretin response and inversely with adverse adiposity and metabolic parameters.

It is important to take into account that there are numerous interspecies and inter-gut section interactions that profiles microbial functionality.

4.2 Gut permeability

Although microbiota has been linked to a reduction in gut permeability, we were unable to find an association of plasma zonulin with the gut microbiome studied.

4.3 T2D remission predictors

Some predictive pre-surgical factors of metabolic outcomes after BS have been identified, such as younger age, shorter disease duration, preoperative C-peptide levels, and the absence of insulin treatment before surgery, which are all associated with higher remission rates (21) (64) (71) (72) (73). C-peptide levels were the only significant predictor of T2D remission in our study.

4.4 Limitations

We acknowledge several limitations of this study. Sample size limitations can have influenced the statistical power to detect changes in T2D remission after surgery. Moreover, we were unable to study the composition of the diet followed by the participants after surgery, which may affect the results. We have also observed a high interindividual variation in gut microbial composition, which makes the analysis between metabolic variables and microbiome difficult. We are aware of the absence of causality in the findings described in our study. For these reasons, this study should be considered as a hypothesis generator. Further studies should therefore be conducted to better understand the changes after BS, especially in microbiota composition, and its association with metabolic outcomes.

5 Conclusions

Patients with obesity and T2D submitted to metabolic surgery by mRYGB improve their metabolic phenotype in parallel with significant modifications in the microbiome composition. Incretin response is restored after weight loss and is associated with a specific microbiota signature after one year of follow-up. These changes operate in parallel with T2D remission. Further studies are guaranteed to confirm a causal role of the microbiome changes on incretin response and T2D remission in patients with obesity.

Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the ENA website repository <https://www.ebi.ac.uk/ena/submit/webin/>, accession number PRJEB63100.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Clinical Research Ethics Committee (reference PR 198/14). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

LH-M, M-MR-P, JV and NVil contributed in the conception of the work and wrote the manuscript. RP contributed in the data analysis. BA performed the bioinformatics and statistical analyses.

FG-P, NVir and RLP participated in the study design. JO, RM, CL, CS, MP-M, MP-P, SP and SF-V critically revised the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

NVil is the recipient of grants "PI11/01960; PI14/01997; PI17/01556 and PI22/01773" funded by Instituto de Salud Carlos III and co-funded by European Union ERDF, "A way to build Europe". LH-M obtained the research grant 20P5J027 from Societat Catalana d'Endocrinologia i Nutrició SCEN. JV has funding from Instituto de Salud Carlos III through the PI17/01503 and PI 20/000475 co-funded by European Union ERDF, "A way to build Europe". SF-V has funding from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Regional Development Fund ERDF SAF2015-65019-R. The Spanish Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders CIBERDEM CB07708/0012 is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. SF-V acknowledges support from the Miguel Servet tenure-track program CP10/00438 and CP11/0008 from the Fondo de Investigación Sanitaria FIS co-financed by the ERDF.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Jonathan Rogerson for helpful discussions on the manuscript, João Pedro Carmezim Correia for statistical analysis, Bioinformatics and Biostatistics Unit of Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona) and Joan Badia for analysis of microbiome data. We thank CERCA Programme/ Generalitat de Catalunya for institutional support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Khorgami Z, Shahr S, Seber AA, Howard CA, Danaei G, Schizas GM. Outcomes of bariatric surgery versus medical management for type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Surg* (2019) 29(3):964–74. doi: 10.1007/s11695-018-3552-x
- Jørgensen NR, Dirksen C, Jensen-Møller KN, Jacobsen SH, Worm D, Hansen DL, et al. Exaggerated glucagon-like peptide 1 response is important for improved β -cell function and glucose tolerance after roux-en-Y gastric bypass in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* (2013) 62(9):1044–52. doi: 10.2337/di15-0022
- Guldi C, Stephen SD, Watson M, Dempsey N, Lanzaile P, Marlet T, et al. PYY plays a key role in the resolution of diabetes following bariatric surgery in humans. *Endocrinology* (2019) 161(7):26–36. doi: 10.1093/endo/bey154
- Weiser-Altechtman NJ, Hamburg D, Altschuler R, Sridharan R, Töring S, Jepsen SL, et al. Oxyntomodulin identified as a marker of type 2 diabetes and gastric bypass surgery by mass-spectrometry based profiling of human plasma. *PLoS Medicine* (2016) 13(12):e1002038. doi: 10.1371/journal.pmed.1002038
- Muñoz-García A, Díaz-Pedrogonzalez C, Tinahones FJ. Microbiota y diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología y Nutrición* (2016) 63(10):560–8. doi: 10.1016/j.endo.2016.07.008
- Hanauer RA, Astarraga B, Camarero S, Accili D, Ferrante E. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12a-hydroxylated bile acids. *Diabetes* (2013) 62(12):4184–91. doi: 10.2337/db13-0039
- Xu G, Song M. Recent advances in the mechanisms underlying the beneficial effects of bariatric and metabolic surgery. *Surg Obes Relat Dis* (2021) 17(1):231–8. doi: 10.1016/j.soar.2020.08.028
- Betterman RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care* (2016) 39(6):893–901. doi: 10.2337/dc16-0145
- Anbà FJ, Valls TV, Schorner JD, Marlet T. The gut microbiota as a mediator of metabolic benefits after bariatric surgery. *Can J Diabetes [Internet]*. (2017) 41(4):439–47. doi: 10.1016/j.cjcd.2017.02.002
- Allis KH, Nielsen T, Pedersen O. Mechanisms in endocrinology: Gut microbiota in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* (2013) 172(4):R167–77. doi: 10.1530/EJE-14-0674
- Yang JY, Kwon MS. The gut microbiota: A key regulator of metabolic diseases. *BMB Rep* (2016) 49(10):536–41. doi: 10.5483/BMBRep.16.49.10.144
- Palmisano S, Carpinello G, Silevicius M, Guerin M, Guirici M, Casagrande R, et al. Changes in gut microbiota composition after bariatric surgery: a new balance to dislodge. *J Gastrointest Surg* (2020) 24(6):1736–46. doi: 10.1007/s10695-019-04321-4
- Zhang H, DBSIR BK, Zuccolo A, Kodra D, Baidotti M. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci* (2009) 106(7):2263–70.
- Li JY, Aschman H, Buetler M, Kimura J, Sando C, Le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial–host metabolic cross-talk. *Gut* (2011) 60(9):1214–23. doi: 10.1136/gut.2010.234708
- Asadi R, Pritz E, Beldi E, Sala P, Cijakovic DM, et al. Gut microbiota profile of obese diabetic women submitted to roux-en-Y gastric bypass and its association with food intake and postoperative diabetes remission. *Nutrients* (2020) 12(27):1–18. doi: 10.3390/nut12020278
- Liu AP, Parakk M, Luevano JM Jr, Machineni S, Turndough PJ, Kaplan LM. Concomitant shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med [Internet]* (2013) 5(217):178r41. doi: 10.1126/scitranslmed.3005087
- Shao Y, Ding R, Xu B, Hua R, Shen Q, He K, et al. Alterations of gut microbiota after roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in sprague-dawley rats. *Obes Surg* (2017) 22(2):245–50. doi: 10.1007/s11695-016-2297-7
- Li C, Li Y, Li L, Kong Y, Shi Y, Xiao H, et al. Alterations of serum uric acid level and gut microbiota after roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in a hyperuricemic rat model. *Obes Surg* (2020) 30(5):1799–807. doi: 10.1007/s11695-019-04328-y
- Murphy R, Tsai P, Jülg M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential changes in gut microbiota after gastric bypass and sleeve gastrectomy bariatric surgery vary according to diabetes remission. *Obes Surg* (2017) 22(4):917–25. doi: 10.1007/s11695-016-2399-2
- Davis N, O'Sullivan JM, Plank LD, Murphy R. Gut microbial predictors of type 2 diabetes remission following bariatric surgery. *Obes Surg* (2020) 30(9):3536–48. doi: 10.1007/s11695-020-04684-0
- Rodríguez-Pérez M, Astarraga B, Seo J, Ceperedo-Mallatín V, Caballé A, Pérez-Becá V, et al. Changes in glucagon-like peptide 1 and 2 levels in people with obesity after a diet-induced weight-loss intervention are related to a specific microbiota signature: A prospective cohort study. *Clin Transl Med* (2021) 11(1):1–7. doi: 10.1002/ctm2.575
- Gomes-Rocha SR, Costa-Pinho AM, Faria-Neto CC, Ferreira A de A, Martins Nogueira JP, Ramos Carneiro SP, et al. Roux-en-Y gastric bypass vs sleeve gastrectomy in super obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Surg* (2022) 32:170–85. doi: 10.1007/s11695-021-05743-8
- Mechanick DL, Apovian C, Brethauer S, Garvey WT, Joffe AM, Kim L, et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutrition, metabolic, and nonsurgical
- support of patients undergoing bariatric procedures – 2019 update. *Surg Obes Relat Dis [Internet]*. (2020) 16(2):175–247. doi: 10.1016/j.soar.2019.10.023
- Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Del Prato S, Inzucchi SE, et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* (2009) 32(11):2133–5. doi: 10.2337/d09-0038
- Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun* (2016) 7:12257. doi: 10.1038/ncom12257
- McMurdie PJ, Holmes S. PhyloSeq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* (2013) 8(4):e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- Oksanen AJ, Blanchet FG, Friendly M, Kind R, Legendre P, McGlinn D, et al. Vegan. *Environ Ecol Evol* (2019). 2395–6. doi: 10.1007/978-94-007-1179-9_301576
- Paulson JN, Côté S, Stine O, Bravo HC, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker gene surveys. *Nat Methods* (2013) 10(12):1200–2. doi: 10.1038/nmeth.2658
- Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, Gonzalez A, et al. Normalization and microbial differential abundance analysis depend upon data characteristics. *Microbiome* (2017) 5(1):1–18. doi: 10.1186/s40168-017-0237-y
- Bray JB, Curtis JT. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol Monogr* (1957) 27(4):225–49. doi: 10.2307/1942388
- Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* (2001) 26(1):32–46. doi: 10.1111/j.1442-9995.2001.01070.ppt
- Lee E, Chuang HY, Kim JW, Meeker T, Lee D. Inferring pathway activity toward precise disease classification. *PLoS Comput Biol* (2008) 4(11):e1000217. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000217
- Filion B, Tibshirani R. On testing the significance of sets of genes. *Ann Appl Stat* (2007) 1(1):107–20. doi: 10.1214/07.aas101
- Mestres AC, Lhago AB, Anselmi CSO. Adjusting for systematic technical biases in risk assessment of gene signatures in transcriptomic cancer cohorts. *BioRxiv* (2018). doi: 10.1101/360495
- Wolever TMS, Jenkins DJA, Jenkins AL, Jones RG. The glycemic index: Methodology and clinical implications. *Am J Clin Nutr* (1991) 54(5):846–54. doi: 10.1093/ajcn/54.3.846
- Sturgeon C, Fausan A, Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Thromb Haemostasis [Internet]*. (2016) 4(4):1–19. doi: 10.1080/21683750.2016.1251364
- Fausan A, Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* (2011) 91(1):151–75. doi: 10.1152/physrev.00003.2008
- Kong LC, Tap J, Anon-Winterowley J, Pedone V, Baderant A, Bouillon B, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and association of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr* (2013) 98(1):16–24. doi: 10.3945/ajcn.113.056741
- Chen G, Zhuang J, Cui Q, Jiang S, Tao W, Chen W, et al. Two bariatric surgical procedures differentially alter the intestinal microbiota in obesity patients. *Obes Surg* (2020) 30(6):2345–61. doi: 10.1007/s11695-020-04494-4
- Sánchez-Alcalá L, Gutiérrez-Repió C, Gómez-Pérez AM, García-Puentes E, Tinahones FJ, Mena-Andrés E. Gut microbiota adaptation after weight loss by Roux-en-Y gastric bypass or sleeve gastrectomy bariatric surgeries. *Surg Obes Relat Dis [Internet]*. (2019) 15(11):1888–95. doi: 10.1016/j.soar.2019.08.031
- Grovesler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Liang J, Wong M, et al. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics J* (2013) 13(6): 514–22. doi: 10.1038/pgj.2012.43
- Palleja A, Kahlani A, Allis KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med [Internet]*. (2016) 8(1):67. doi: 10.1186/s13073-016-0121-1
- Wang FG, Bai RX, Yan WM, Yan M, Dong LY, Song MM. Differential composition of gut microbiota among healthy volunteers, morbidly obese patients and post-bariatric surgery patients. *Exp Ther Med* (2019) 17:2268–78. doi: 10.3892/etm.2019.7200
- Shen N, Ahlers M, Patel K, Gao Z, Dutta B, Blaser MJ, et al. Longitudinal changes of microbiome composition and microbial metabolites after surgical weight loss in individuals with obesity. *Surg Obes Relat Dis [Internet]*. (2020) 15(4):1367–73. doi: 10.1016/j.soar.2019.05.034
- Han Y, Kim G, Ahn E, Jung S, Jung Y, Kim Y, et al. Integrated metagenomics and metabolomics analysis illustrates the systemic impact of the gut microbiota on host metabolism after bariatric surgery. *Diabetes Obes Metab* (2022) 24(7): 1234–44. doi: 10.1111/dom.14689
- Magne E, Gotsdiner M, Gaschler L, Zanetti A, Poma S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients* (2020) 12(5):1474. doi: 10.3390/nut12051474

47. Ithan ZE, Dhillon JK, Iqbal NG, Hoyt DW, Mousa AK, Kang DW, et al. Distinctive microbiomes and metabolites linked with weight loss after gastric bypass, but not gastric banding. *ISME J [Internet]*. (2017) 11(9):2047–58. doi: 10.1038/ismej.2017.71
48. Morais-Marmiquan E, Hasson B, Guezennec L, de la Cruz-Munoz N, Mesiahi SF. Comparison of methodological approaches to human gut microbiota changes in response to metabolic and bariatric surgery: A systematic review. *Obes Rev* (2020) 21(8):1–15. doi: 10.1111/obv.13025
49. Dornier M, Vaughan EE, Plagge CM, de Vos WM. *Akkermansia muciniphila* sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* (2004) 54(5):1469–76. doi: 10.1099/jas.0.02873-0
50. Lin HV, Frassetto A, Kowalk EJ, Naseri AR, Liu MM, Kowalski JB, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* (2012) 7(4):e3399. doi: 10.1371/journal.pone.0033240
51. Fondaali E, Carroll DM, Sharpston J, Bhak-Sellman E, Hemborg L, Steffen KL, et al. A microbial signature following bariatric surgery is robustly consistent across multiple cohorts. *Gut Microbes [Internet]*. (2021) 12(1):1–16. doi: 10.1080/19448976.2021.1930872
52. Zheng L, Kelly CJ, Baratta KD, Schaefer R, Lavis JM, Alexeev EE, et al. Microbial-derived butyrate promotes epithelial barrier function through IL-10 receptor-dependent repression of claudin-2. *J Immunol* (2017) 199(8):2976–84. doi: 10.4049/jimmunol.1701105
53. Lupien-Mellier J, Andrich DE, Quinn S, Micaelli-Barot C, St-Amant R, Koy TA, et al. Interplay between gut microbiota and gastrointestinal peptides: potential outcomes on the regulation of glucose control. *Can J Diabetes [Internet]*. (2020) 44(4):359–67. doi: 10.1016/j.cjcd.2019.10.006
54. Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, Park HJ, Ghim J, Kwon Y, et al. *Akkermansia muciniphila*-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp Mol Med [Internet]*. (2018) 50(2):e450–11. doi: 10.1038/emmm.2017.242
55. Coppola S, Avagliano C, Calignano A, Berri Canani R. The protective role of butyrate against obesity and obesity-related diseases. *Molecules* (2021) 26(3):682. doi: 10.3390/molecules26030682
56. Chambers ES, Vardat A, Pichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* (2015) 64(11):1744–54. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307913
57. Dang JT, Mocanu V, Park H, Laffin M, Tran C, Hotta N, et al. *Bifidobacterium* shifts after Roux-en-Y gastric bypass orchestrate changes in glucose metabolism through modulation of bile acids and T-cell adaptation. *Sci Rep [Internet]*. (2023) 11(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-021-03396-4
58. Ficht W, Othé FP, Plaisias J, Bontay C, Beglinger C, Wehrhahn B, et al. Impact of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on gut microbiota: a metagenomic comparative analysis. *Surg Obes Relat Dis* (2020) 16(7):852–62. doi: 10.1016/j.sor.2020.03.014
59. Haange SR, Jernrich N, Krügel U, Hintschich C, Wehrmann D, Hantke M, et al. Gastric bypass surgery in a rat model alters the community structure and functional composition of the intestinal microbiota independently of weight loss. *Microbiome* (2020) 8(1):1–17. doi: 10.1186/s40168-020-0788-1
60. Bastelli M, Cusi PD, Knud C. The gut microbiome influences host endocrine functions. *Endocr Rev* (2019) 40(3):1271–84. doi: 10.1210/er.2018-00280
61. Cusi PD, Ponsseiers S, Van Die Wiele T, Guio Y, Eversal A, Rottler O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* (2009) 58(10):1093–103. doi: 10.1136/gut.2009.163886
62. Dencker DJ, Hurlich P, Aas N, Reibaker PL. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1996) 93(15):7911–6. doi: 10.1073/pnas.93.15.7911
63. Wang Y, Dhillani D, Wu Y, Saffke J, Sun X, Han NX. Comprobiotic probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing GLP-1 secretion in obese mice. *BioMed Pharmacother [Internet]*. (2020) 125:109914. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109914
64. Yan M, Song MM, Bai RX, Chang S, Yan WM. Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on intestinal *Akkermansia muciniphila*. *World J Gastroenterol Surg* (2016) 8(4):301. doi: 10.4240/wjgs.v8.i4.301
65. Hong J, Ho T, Xu L, Xu X, He N, Zhou Y, et al. Reversal of functional brain activity related to gut microbiome and hormones after VSG surgery in patients with obesity. *J Clin Endocrinol Metab* (2021) 106(9):E3619–35. doi: 10.1210/clinem.2021.01297
66. Zhang L, Guay Y, Li H, Shen L, Ni Y, Fang Q, et al. Metabolic phenotypes and the gut microbiota in response to dietary resistant starch type 2 in normal-weight subjects: a randomised crossover trial. *Sci Rep* (2019) 9(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-018-38210-9
67. Yoon HS, Cho CH, Yoo MS, Jung SJ, You HJ, Byoung KJ, et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice. *Nat Microbiol* (2021) 6(3):563–73. doi: 10.1038/s41564-021-05880-5
68. Luzzato R, Ling L, Dhill DM, DePauli AM, Lira HD, Harrison SA, et al. The commensal microbe *Vellonella* as a marker for response to an FGF19 analog in NASH. *Hepatology* (2021) 73(5):126–43. doi: 10.1002/hep.31523
69. Savaris YS, Songer JG. Clostridium perfringens: insight into virulence evolution and population structure. *Annu Rev Microbiol* (2006) 12(1):23–43. doi: 10.1016/j.jamicro.2005.10.002
70. Salles BM, Goffi D, Ferreira SRG. Probiotics supplementation and insulin resistance: a systematic review. *Diabetes Metab Syndr* (2020) 12(1):1–24. doi: 10.1016/j.diabetes.2020.06003-6
71. Hall TC, Pellen MGC, Sedman PC, Jain PK. Prognostic factors predicting remission of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y Gastric bypass surgery for obesity. *Obes Surg* (2010) 20(9):1245–50. doi: 10.1007/s11695-010-0198-8
72. Hamza N, Abbas MH, Darwish A, Shafik Z, New J, Ammani HJ. Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic gastric banding and bypass. *Surg Obes Relat Dis* (2011) 7(6):891–6. doi: 10.1016/j.sor.2010.03.292
73. Dixon JB, Clouting LM, Chong K, Chen SC, Lambert GW, Stoumnicki NG, et al. Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* (2013) 36(1):20–6. doi: 10.2337/dci.12-0779

4.3 Article 3

Títol: Insulin resistance modulates gut microbiota and incretin response remodeling after bariatric surgery in severe obesity.

Autors: Rocío Puig, M-Mar Rodríguez-Peña, Laura Hernández-Montoliu, Brenno Astiarraga, Eva Martínez, Jose M. Balibrea, Gemma Llauradó, Jordi Tarascó, Albert Caballero, Clara Joaquín, Manel Puig-Domingo, Nuria Vilarrasa, Sonia Fernández-Veledo, Joan Vendrell, Silvia Pellitero.

Revista: Int J Obes (Lond).

1 Title: Insulin resistance modulates gut microbiota and incretin response remodeling
 2 after bariatric surgery in severe obesity

3

4 Authors: Rocío Puig^{1,2†}, Mar Rodríguez-Peña^{3,4‡}, Laura Hernández-Montoliu⁴,
 5 Brenno Astiarraga^{3,4}, Eva Martínez⁶, Jose M. Balibrea^{2,7,8}, Gemma Llauredó^{4,9},
 6 Jordi Tarascó⁷, Albert Caballero⁷, Clara Joaquim¹⁰, Manel Puig-Domingo^{2,10}, Nuria
 7 Vilarrasa^{4,5}, Sonia Fernández-Veledo^{3,4,11}, Joan Vendrell^{3,4,11} ‡, Silvia Pellitero^{10‡}.

8

9 †These authors have contributed equally to this work and share the first authorship

10 ‡These authors have contributed equally to this work and share the last authorship

11

12 **Rocío Puig Piña**

13 ¹Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
 14 Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

15 ²Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

16 Mail: rpuig@santpau.cat

17 ORCID number: 0000-0001-9184-5583

18 **Mar Rodríguez-Peña**

19 ³Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Joan XXIII de
 20 Tarragona, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain

21 ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas
 22 Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

23 Mail: mar.rodriguez@iisppv.cat

24 ORCID number: 0000-0003-2553-9769

25 **Laura Hernández-Montoliu**

26 ⁵Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari de Bellvitge-Institut
27 d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
28 Mail: laura.hermont@gmail.com
29 ORCID number: 0000-0003-3935-3922

30 **Brenno Astiarraga**

31 ³Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Joan XXIII de
32 Tarragona, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain
33 ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas
34 Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
35 Mail: brenno.dominguez@iispv.cat
36 ORCID number: 0000-0003-2216-8974

37 **Eva Martínez-López**

38 ⁶Clinical Nutrition Unit, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
39 Mail: emartinezl.germanstrias@gencat.cat

40 **Jose M. Balibrea**

41 ²Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
42 iVascular®-UAB Surgical Research Chair
43 ⁷Department of General and Gastrointestinal Surgery. Health Sciences Research
44 Institute and University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
45 ⁸CIBER Pathophysiology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN)
46 Mail: jmbalibrea.germanstrias@gencat.cat
47 ORCID number: orcid.org/0000-0002-0764-7179

48 **Gemma Llauradó**

49 ⁴Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital del Mar, Hospital del Mar Medical
50 Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain

51 ⁹Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas
52 Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
53 Mail: gllauradoc@gmail.com
54 ORCID number: 0000-0002-3237-6366

Jordi Tarascó

56 ⁷Department of General and Gastrointestinal Surgery. Health Sciences Research Institute
57 and University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
58 Mail: jorditarasco@gmail.com
59 ORCID number: 0000-0001-6820-7946

Albert Caballero

61 ⁷Department of General and Gastrointestinal Surgery. Health Sciences Research Institute
62 and University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
63 Mail: acaballeroboza@gmail.com
64 ORCID number: 0000-0003-2666-4967

Clara Joaquin

66 ¹⁰Department of Endocrinology and Nutrition. Health Sciences Research Institute and
67 University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
68 Mail: clara.joaquin@gmail.com
69 ORCID number: 0000-0002-9063-4853

Manel Puig-Domingo

71 ²Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

72 ¹⁰Department of Endocrinology and Nutrition. Health Sciences Research Institute and
73 University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
74 Mail: mpuigd@igtp.cat
75 ORCID number: 0000-0002-6744-7195

76 **Nuria Vilarrasa**

77 ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades
78 Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII),
79 Madrid, Spain

80 ⁵Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari de Bellvitge-
81 Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de
82 Llobregat, Barcelona, Spain
83 Mail: nuriavilarrasa@yahoo.es
84 ORCID number: 000-0003-3188-1990

85 **Sonia Fernández-Veledo**

86 ³Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Joan XXIII de
87 Tarragona, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain
88 ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas
89 Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

90 ¹¹Universitat Rovira i Virgili (URV), Reus, Spain
91 Mail: sonia.fernandez@iisppv.cat
92 ORCID number: 0000-0003-2906-3788

93 **Joan Vendrell**

94 ¹¹Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona, Spain

95 ³Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Joan XXIII de
 96 Tarragona, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Tarragona, Spain

97 ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas
 98 Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain
 99 Mail: jvortega@iispv.cat

100 ORCID number: 0000-0002-6994-6115

101 **Silvia Pellitero**

102 ¹⁰Department of Endocrinology and Nutrition. Health Sciences Research Institute and
 103 University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

104 Mail: spellitero.germanstrias@gencat.cat

105 **Corresponding author**

106 **Silvia Pellitero, MD. PhD**

107 Department of Endocrinology and Nutrition Universtiy Hospital and Health Sciences
 108 Research Institute Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

109 Carretera del Canyet, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain

110 Telephone: +3493 497 88 60.

111 E-mail address: spellitero.germanstrias@gencat.cat

112 **Joan Vendrell MD. PhD.**

113 Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona, Spain

114 Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Universitari Joan XXIII de
 115 Tarragona, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV)

116 Carrer Dr. Mallafré Guasch, 4, 43005 Tarragona, Spain.

117 Telephone: +34977 29 58 00

118 e-mail: jvortega@iispv.cat

119 **Competing interests**

120 The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial
121 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

122 **Abstract:**123 **Background**

124 This study aims to assess the impact of insulin resistance (IR) on gut microbiota (GM)
 125 composition, incretin responses, and metabolic outcomes following sleeve gastrectomy
 126 (SG) in people with severe obesity who do not have diabetes.

127 **Methods**

128 A prospective single-center study encompassed patients with severe obesity and normal
 129 glucose tolerance who underwent SG. Participants were stratified into two cohorts based
 130 on the magnitude of their insulin resistance state, as determined by the Homeostatic
 131 Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) index: high-IR (Hi-IR; HOMA-IR
 132 > 95 th percentile) and low-IR (Lo-IR; HOMA-IR < 25 th percentile). Body composition
 133 measurements, biochemical analyses, and microbiota assessments were performed before
 134 and six months post-surgery. Additionally, the responses to a standardized meal tolerance
 135 test (MTT) of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucagon-like peptide-2 (GLP-2)
 136 were evaluated.

137 **Results**

138 The study cohort consisted of 18 patients (9 with Hi-IR and 9 with Lo-IR), with a mean
 139 age of 48.8 ± 9.2 years and a mean body mass index (BMI) of 45.03 ± 4.82 kg/m². Six
 140 months post-surgery, the mean percentage of total weight loss (WL) was $26.5 \pm 6\%$, with
 141 both groups exhibiting enhanced secretion of GLP-1 and GLP-2 following MTT.

142 At baseline, participants exhibited distinct microbiota profiles; the Hi-IR group showed a
 143 higher relative abundance of *Prevotella* species, which are previously associated with
 144 adverse metabolic and inflammatory profiles. Post-surgery, both groups exhibited
 145 positive incretin responses and significant modifications in GM composition. Notably,

146 Hi-IR people experienced more pronounced changes in microbial diversity, including
147 increases in *Akkermansia* and *Veillonella* species and decreases in *Prevotella* species.
148 Enhanced GLP-1 and GLP-2 responses were correlated with WL and metabolic
149 improvement, particularly in the Lo-IR population.

150 **Conclusions**

151 These findings underscore the role of GM in metabolic changes and surgical outcomes
152 after SG. Targeting gut microbiota may offer a promising avenue for improving obesity
153 treatment strategies.

154 **KEYWORDS:** Insulin resistance; incretin; microbiota; severe obesity; bariatric surgery.

155 **LIST OF ABBREVIATIONS**

156 AUC Area under the receiver operating characteristic curve

157 BA Bile acids

158 BMI Body mass index

159 BS Bariatric surgery

160 CSS Cumulative sum scaling

161 CV Coefficient of variation

162 DXA Dual-energy X-ray absorptiometry

163 EE Energy expenditure

164 ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

165 FC Fold change

166 FFMI Fat-free mass index

167	FitZig	Zero-inflated Gaussian mixture model
168	FMI	Fat mass index
169	FLI	Fatty liver index
170	GLP-1	Glucagon-like peptide-1
171	GLP-2	Glucagon-like peptide-2
172	GM	Gut microbiota
173	HDLc	High-density lipoprotein cholesterol
174	Hi-IR	High insulin resistance
175	HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance
176	IL-6	Interleukin-6
177	IQR	Interquartile range
178	IR	Insulin resistance
179	KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
180	Lo-IR	Low insulin resistance
181	Log2FC	Log2 fold-change
182	MTT	Meal tolerance test
183	PCA	Principal Component Analysis
184	ROC	Receiver operating characteristic
185	RYGB	Roux-en-Y gastric bypass
186	SD	Standard deviation

187 SG Sleeve gastrectomy

188 WL Weight loss

189 INTRODUCTION

190 Severe obesity is characterized by insulin resistance (IR) and chronic low-grade
191 inflammation. Bariatric surgery (BS) remains the most effective treatment for achieving
192 substantial weight loss (WL), improving glucose metabolism, and reducing
193 comorbidities. However, long-term outcomes are variable (1,2), and some patients fail to
194 reach WL goals or experience weight regain (3). Identifying predictors of long-term
195 success, particularly after sleeve gastrectomy (SG), remains a research priority (4,5).

196 SG, a less invasive option compared to malabsorptive techniques, induces major
197 metabolic benefits (6). Improved insulin sensitivity after SG is attributed mainly to WL
198 (7), and both SG and Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) show comparable improvements
199 in hepatic and peripheral insulin resistance (8,9).

200 Beyond WL, other mechanisms contribute to BS benefits. Incretin responses, which
201 regulate insulin secretion and appetite, are markedly enhanced after surgery (10,11),
202 while long-term gastrointestinal adaptations may influence incretin secretion and WL
203 durability. Gut microbiota (GM) remodeling also emerges as a determinant of outcomes
204 (12,13), with effects on enteroendocrine signaling (14), short-chain fatty acid production
205 (15), and host metabolism (16). However, GM may return to baseline or reach a new
206 equilibrium, potentially limiting WL durability (17).

207 Body composition is another determinant: preserving lean mass sustains energy
208 expenditure, while excessive loss may predispose to regain (3,18). Yet its role in long-
209 term WL after BS remains unclear.

210 Finally, severe obesity encompasses a heterogeneous range of metabolic phenotypes.

211 While most patients display marked IR, some remain insulin sensitive despite severe

adiposity, showing more favorable profiles (19,20). Such baseline differences may affect WL and metabolic responses after surgery (21).

A deeper understanding of how IR, incretin responses, GM, and body composition interact in the context of BS may provide valuable insights into the mechanisms underlying variable postoperative outcomes. We therefore hypothesize that, in people with severe obesity, baseline IR is associated with distinct incretin secretion, GM composition, and body composition, which in turn may influence postoperative WL, metabolic outcomes, and microbiota remodeling after SG.

MATERIAL/SUBJECTS AND METHODS

Study population

This study included a cohort of eighteen patients with severe obesity and normal glucose tolerance, defined as a fasting plasma glucose <100 mg/dL (5.6 mmol/L), and a HbA_{1c} <5.7% according to American Diabetes Association criteria (22). All participants underwent consecutive SG procedures at our facility from September 2014 to January 2015. The participants were divided into two groups based on their status of IR, determined by the Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR). To maximize phenotypic contrast within a relatively homogeneous population (people with severe obesity and without diabetes), we selected individuals at the extremes of the cohort distribution: the Hi-IR group comprised subjects above the 95th percentile of HOMA-IR, and the Lo-IR group comprised subjects below the 25th percentile. Each group included nine participants. The use of cohort-specific percentile cut-offs, rather than fixed thresholds, is consistent with prior metabolic studies, where extreme percentiles (e.g., 75th–95th) have been applied to define IR and metabolic risk groups (23,24). The study was approved by the Ethics Committee of Germans Trias i Pujol Hospital (protocol PI-

236 14-103). Written informed consent was obtained from all participants before their
237 inclusion in the study.

238 **Methodology section**

239 All patients underwent comprehensive clinical assessments in accordance with our
240 institutional BS protocol, which is aligned with the guidelines of the Spanish Society of
241 Endocrinology and Nutrition (25). Assessments included anthropometry, body
242 composition, and fasting blood sampling, which were conducted preoperatively and at 6
243 months postoperatively. Demographic and clinical data (age, diabetes history, and
244 hypertension) were collected at both time points. Weight-loss outcomes were documented
245 5 years post-surgery. Exclusion criteria included type 2 diabetes, inflammatory or
246 gastrointestinal disorders, and recent antibiotic use.

247 **Anthropometric measurements**

248 Body Mass Index (BMI) was calculated by dividing the weight in kilograms by the height
249 in meters squared. Waist circumference was measured at the highest point of the iliac
250 crest by the same endocrinologist. The percentage of WL (%WL) was calculated as
251 $(\text{baseline weight} - \text{follow-up weight}) / \text{baseline weight} \times 100$. At 5 years after SG, patients
252 were classified as responders if they achieved $\geq 20\%$ WL, and as non-responders
253 otherwise.

254 **Body composition assessment**

255 Body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA; Hologic
256 QDR 4500, Hologic Inc., Waltham, MA, USA) at baseline and six months after surgery.
257 Fat-free mass (FFM) and fat-free mass index (FFMI) were derived using standard
258 formulas. Further technical details are provided in the Supplementary Methods
259 (Supplementary File 1).

260 Surgical procedure

261 All patients underwent laparoscopic SG performed by the same surgical team using a
262 standardized technique with a 36-Fr bougie for calibration and resection from 4–6 cm
263 proximal to the pylorus up to the angle of His. Staple-line reinforcement and
264 intraoperative leak testing were routinely performed. Detailed operative steps and
265 perioperative care are provided in the Supplementary Methods (Supplementary File 1).

266 Biochemical measurements

267 Blood samples were obtained after an overnight fast. Plasma glucose, lipid profile, and
268 HbA1c were determined using standard clinical laboratory methods. Insulin resistance
269 was assessed by HOMA-IR, and fatty liver risk was estimated using the Fatty Liver Index
270 (FLI). Zonulin was measured as a marker of intestinal permeability (see Supplementary
271 Methods for technical details).

272 Standard meal test

273 A standardized mixed meal tolerance test (MTT) was performed at baseline and 6 months
274 after SG, following an overnight fast. Participants ingested 200 mL of a liquid meal (320
275 kcal; 16% protein, 49% carbohydrate, 30% fat) within 5 minutes, and venous blood
276 samples were collected at 0, 15, 30, 60, and 120 minutes. Total GLP-1 and GLP-2
277 concentrations were measured by ELISA in duplicate using paired pre- and postoperative
278 samples from each participant. Incretin responses were evaluated as percentage change
279 from baseline to peak and by calculating the area under the curve (AUC_{0–120}). Full
280 methodological details are provided in Supplementary Methods (Supplementary File 1).

281 Statistical analysis

Continuous variables were expressed as mean $\pm$ SD or median (interquartile range), depending on the distribution (Shapiro–Wilk test). Wilcoxon matched-pairs test was used for within-group comparisons (pre- vs. post-surgery), and Student's t-test or Wilcoxon rank-sum test for between-group analyses. A p-value <0.05 was considered significant. Analyses were performed using Stata v14 (StataCorp, College Station, TX, USA). Full details of extended regression analyses and multiple testing procedures are available in the Supplementary Methods (Supplementary File 1).

Stool sample collection, DNA extraction, and metagenomic sequencing

Stool samples were obtained at baseline and 6 months post-surgery, immediately frozen at -20°C , and stored at -80°C until analysis. DNA was extracted using the QIAamp DNA stool kit (Qiagen) and sequenced on an Illumina NextSeq 500 platform. Extended protocols for library preparation, sequencing, and bioinformatics are provided in the Supplementary Methods (Supplementary File 1).

Bioinformatics analysis

Taxonomic and functional analyses were conducted using established pipelines. Taxonomic assignment was performed with Kaiju (28), and functional annotation was based on KEGG orthology. Alpha diversity (Shannon index, observed species) and beta diversity (Bray–Curtis dissimilarity) were computed, and differential abundance was assessed using zero-inflated Gaussian mixture models. Further details of the workflow, software versions, and parameters are provided in the Supplementary Methods (Supplementary File 1).

Microbiome data analysis

Microbiome data were processed and analyzed in R using standard pipelines (phyloseq, vegan, metagenomeSeq, and ggplot2) (33,34). Alpha diversity (Shannon index and

306 observed species) and beta diversity (Bray-Curtis dissimilarity with Adonis testing) were
 307 calculated using CSS-normalized data. Differential abundance was assessed using the
 308 zero-inflated Gaussian mixture model (FitZig), with statistical significance defined as an
 309 adjusted p-value < 0.05 after the Benjamini-Hochberg correction to control the false
 310 discovery rate (FDR). Group differences and associations with clinical variables were
 311 evaluated as described in detail in Supplementary Methods (Supplementary File 1).

312 **Statistical testing and correlation analysis**

313 Normality of clinical variables was assessed with the Shapiro-Wilk test. Group
 314 comparisons were performed using parametric or non-parametric tests, as appropriate,
 315 and p-values were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method.
 316 Associations between microbial abundances and clinical variables were examined by
 317 Spearman's rank correlation (details in Supplementary Methods, Supplementary File 1).

318 **Intervention success and WL prediction**

319 An unnested two-step machine learning approach was employed to discover potential
 320 microbial species for intervention success (IS) and WL predictions. The first step used all
 321 taxa that passed the prevalence filter and involved feature selection using bootstrap
 322 sampling with replacement (B=100) of 2/3 of the dataset, followed by cross-validation
 323 with glmnet (k=5). Features selected in at least 5% of the bootstraps were retained for the
 324 next step.

325 The second step involved model evaluation and prediction using Random Forest
 326 (ntree=100) with cross-validation (k=5) on all samples. For predicting intervention
 327 success, the threshold between success and failure was determined using the Youden
 328 index. For WL prediction, a regression-based random forest was used, utilizing the same
 329 selected variables as in the first step.

330 Successful WL after BS was defined as WL above 20% at 5 years post-treatment.

331 **RESULTS**

332 **Baseline results**

333 *Clinical and biochemical characteristics*

334 A total of 18 patients with severe obesity (13 females, 5 males) were enrolled, matched
335 by age and gender. The mean age was 48.83 ± 9.2 years, and the preoperative BMI was
336 45.03 ± 4.82 kg/m².

337 Clinical, biochemical, and hormone data for the Hi-IR and Lo-IR groups are shown in
338 Table 1.

339 *Incretin response*

340 Before surgery, fasting GLP-1 levels were significantly higher in the Hi-IR compared to
341 the Lo-IR group, whereas fasting GLP-2 did not differ. During the mixed-meal test, GLP-
342 1 showed a greater relative peak increase in Lo-IR compared with Hi-IR subjects (median
343 % increase: 76.9% vs. 52.0%; $p = 0.030$), while AUC₀₋₁₂₀ did not differ significantly
344 between groups. For GLP-2, the relative peak increase was comparable between groups,
345 but Hi-IR subjects displayed a higher total AUC ($p = 0.038$) (Table 2, Figure 1).

346 *Correlations*

347 The GLP-1 response to the MMT correlated positively with the GLP-2 response ($r = 0.58$,
348 $p = 0.018$) and HDL-c ($r = 0.66$, $p = 0.003$), and negatively with HOMA-IR ($r = -0.53$, p
349 $= 0.02$). HOMA-IR correlated positively with triglycerides ($r = 0.52$, $p = 0.02$) and FLI (r
350 $= 0.55$, $p = 0.02$), while FLI also correlated positively with fat mass ($r = 0.49$, $p = 0.04$).
351 Zonulin levels were negatively correlated with HDL cholesterol ($r = -0.49$, $p = 0.03$).

352 Six months post-SG outcomes

353 *Clinical and biochemical characteristics*

354 After 6 months, the mean %WL for the entire cohort was $26.5 \pm 6\%$, with no significant
355 differences between groups. HOMA-IR levels decreased significantly in both groups,
356 with no differences between them post-BS (Table 1).

357 Only the Hi-IR group showed improvements in triglycerides, HDL-c, IL-6, and zonulin.
358 The FLI decreased significantly in both groups (Lo-IR: $p = 0.002$; Hi-IR: $p = 0.008$), with
359 a more pronounced reduction in the Lo-IR group ($56.21 \pm 27.56\%$ vs. $30.70 \pm 20.11\%$, p
360 $= 0.05$, trend).

361 *Incretin response*

362 Fasting GLP-1 and GLP-2 concentrations decreased in both groups, reaching statistical
363 significance only in Lo-IR subjects. After SG, the relative peak increase in both GLP-1
364 and GLP-2 was significantly greater in Lo-IR compared with Hi-IR patients ($p = 0.021$
365 and $p = 0.009$, respectively). In contrast, no differences were observed between groups
366 for total AUC ($p = 0.171$ and $p = 0.354$). Within-group analyses revealed a significant
367 postoperative increase in GLP-2 AUC in Lo-IR subjects ($p = 0.028$) and a trend toward
368 higher GLP-1 AUC ($p = 0.066$) (Table 2, Figure 1). When evaluating relative changes
369 from baseline, GLP-1 responsiveness increased by $478.7 \pm 437.1\%$ in Lo-IR versus 250.4
370 $\pm 188.5\%$ in Hi-IR, although this difference did not reach statistical significance. By
371 contrast, GLP-2 responsiveness improved significantly more in Lo-IR ($732.9 \pm 576.1\%$)
372 than in Hi-IR ($80.1 \pm 111.1\%$, $p < 0.001$).

373 *Correlations*

374 The %WL at six months correlated positively with the improvement in GLP-1 response
375 to the MMT ($r = 0.468$, $p = 0.058$, trend only) and strongly with reduction in fat mass (r
376 $= 0.8$, $p < 0.001$).

377 **Five-year follow-up**

378 At five years, the %WL was similar between the Lo-IR and Hi-IR groups ($24.96 \pm 13.47\%$
379 vs. $23.08 \pm 8.87\%$, $p = \text{ns}$). At this time point, 66.6% of patients (55.5% of Lo-IR and
380 83.3% of Hi-IR, $p = \text{ns}$) were classified as responders ($\geq 20\%$ WL). Baseline FFMI was
381 significantly higher in responders compared to non-responders (21.40 ± 1.69 vs. $19.50 \pm$
382 1.08 , $p = 0.037$). The secretory patterns of GLP-1 and GLP-2 at baseline or at six months
383 did not differ between responders and non-responders. %WL at five years correlated
384 positively with %WL at six months ($r = 0.70$, $p = 0.004$) and with reductions in waist
385 circumference ($r = 0.63$, $p = 0.01$) and fat mass ($r = 0.60$, $p = 0.03$) during the first six
386 months post-surgery.

387 **Microbiota results**

388 *Taxonomy basal composition of the study population*

389 Before surgery, we assessed the baseline microbiota abundance levels, distinguishing
390 between Lo-IR and Hi-IR patients. Figure 2 illustrates a distinctive signature when
391 comparing both groups based on their insulin resistance (IR) status. The yellow and
392 purple bars represent the Log2FC values of these species, which showed a greater
393 increase in HI-IR compared to Lo-IR patients. Note that a higher Log2FC value indicates
394 a greater relative change in the abundance of a specific species, not necessarily higher
395 microbial diversity. Hi-IR patients were enriched in taxa such as *Prevotella*, while Lo-
396 IR patients showed higher abundance of *Akkermansia*, *Clostridium*, and *Dialister*.

397 We conducted a correlation analysis between bacterial species showing significant
 398 differences in abundance between the two groups and incretin levels. The *Prevotella*
 399 genus, which was more abundant in Hi-IR patients, correlated positively with higher basal
 400 incretin levels and a blunted postprandial response. In contrast, Lo-IR patients displayed
 401 the opposite pattern (Figure 2). When we examined parameters related to obesity and
 402 inflammation, we found that species prevalent in the Lo-IR group, mainly species of
 403 *Clostridium*, were negatively correlated with baseline incretin levels, weight, BMI, fat
 404 mass, glucose, HbA1c, FFI, triglycerides, and IL-6.

405 ***Impact of surgical intervention on microbial ecology***

406 Following surgical intervention, we observed differential effects on microbiota ecology
 407 based on insulin resistance status. In Lo-IR patients, surgery did not induce statistically
 408 significant alterations in microbial richness ($p = 0.668$) or alpha diversity evenness ($p =$
 409 0.841), indicating a stable microbiota composition. Conversely, Hi-IR patients exhibited
 410 significant changes in microbial richness ($p = 0.002$) and beta diversity ($p = 0.006$) post-
 411 surgery compared to Lo-IR patients. This indicates a substantial shift in microbiota
 412 composition towards a greater diversity, specifically in Hi-IR patients following the
 413 intervention. Before intervention, no significant beta diversity differences existed
 414 between groups ($p = 0.2$), suggesting that the potentially beneficial effect of the surgery
 415 on gut microbiota was primarily observed in the Hi-IR group.

416 ***Impact of intervention on microbiota composition and clinical parameters***

417 Post-surgery, significant compositional changes were detected in both groups (31 species
 418 in Lo-IR, 84 in Hi-IR; adjusted $p < 0.05$, Supplementary Table S1). As shown in Figure
 419 3, Hi-IR patients primarily drove the reduction in *Prevotella* spp. and *Bacteroides*
 420 *coprocola*, together with increases in *Akkermansia*, *Veillonella*, and *Streptococcus*. Lo-

IR patients showed decreases in *Dialister* and *Megamonas*, and increases in *Methanobrevibacter*, *Alistipes*, *Ruminococcus*, and *Roseburia*. Overall, taxa that decreased post-surgery (mainly *Prevotella*) were associated with higher adiposity, inflammation, and poorer incretin responses, whereas taxa that increased (*Clostridium*, *Ruminococcus*, *Akkermansia*, *Streptococcus*) correlated with improved metabolic and hormonal parameters.

Intervention success and WL prediction

We developed a predictive model of intervention success using baseline microbiota abundances, defining success as >20% body WL five years post-surgery. Figure 4 (Bottom) illustrates the species contributing most to the model's probability of success or failure. The model's predictive performance was evaluated using the area under the receiver operating characteristic curve, yielding an AUC of 0.870. An optimal threshold was determined by the Youden index of 0.645 (Fig. 4, Top-Right). Additionally, we constructed a regression-based model to predict the %WL at five years post-surgery (Fig. 4, Top-Left).

DISCUSSION

This prospective study offers novel insights into the impact of IR on incretin response and alterations in GM composition following SG in people with obesity without diabetes. Our findings reveal significant modifications in GM composition and its associations with metabolic parameters before and after surgical intervention, mainly related to the IR state.

Baseline microbiota and metabolic associations

Before surgery, the Hi-IR group exhibited a higher prevalence of *Prevotella* spp., particularly *Prevotella copri*, previously linked to branched-chain amino acid production

444 and IR (35,36). Consistent with prior human studies in obesity and IR, *Prevotella*
 445 abundance was higher in the Hi-IR group compared to their Lo-IR counterparts (37). In
 446 our cohort, Prevotellaceae correlated positively with waist circumference, FLI, and
 447 baseline incretin levels (GLP-1, GLP-2), and inversely with meal-induced incretin
 448 responses. These associations suggest that *Prevotella* abundance may serve as a microbial
 449 marker associated with incretin resistance and adverse metabolic profiles, although
 450 causality cannot be inferred.

451 Conversely, Lo-IR patients exhibited a higher abundance of *Akkermansia muciniphila*, a
 452 genus consistently associated with improved metabolic status and gut-barrier function in
 453 human and experimental studies (38). *Dialister* species (*D. succinatiphilus* and *D.*
 454 *invisus*) were also more prevalent in this group, in line with previous reports linking
 455 *Dialister* abundance to favorable metabolic states before diabetes onset (39,40).
 456 Additionally, *Clostridium* species enriched in Lo-IR patients correlated inversely with
 457 adiposity and inflammatory markers, in line with observational data linking members of
 458 this group to healthier metabolic outcomes (41, 42).

459 *Post-surgery incretin responses*

460 After SG, incretin responses improved overall, although the magnitude and pattern
 461 differed by IR status (Table 2). Lo-IR patients exhibited a significantly greater relative
 462 peak increase in both GLP-1 and GLP-2 compared with Hi-IR, despite similar %WL and
 463 HOMA-IR values at follow-up. However, when analyzed by AUC, no between-group
 464 differences were observed, underscoring the importance of the metric in capturing
 465 hormonal dynamics. Within-group analyses showed that Lo-IR patients displayed a
 466 significant postoperative increase in GLP-2 AUC and a trend toward higher GLP-1 AUC.
 467 Recent work also confirmed pronounced postprandial GLP-1 increases after both SG and

RYGB, reflecting enhanced enteroendocrine stimulation and activation of the ileal brake (11).

The role of GLP-2 in bariatric outcomes remains less well defined. In our cohort, the marked GLP-2 response observed in Lo-IR patients did not correlate with WL or metabolic changes, in line with prior studies indicating that GLP-2 may support intestinal adaptation, glucose homeostasis, and barrier integrity, but without consistent links to body weight regulation (43,44).

Based on our observations, we cautiously propose the concept of “incretin resistance” to describe a state in which incretin hormones are secreted at normal or elevated levels but fail to elicit an adequate metabolic response. This concept, directly analogous to “insulin resistance,” does not reflect a defect in hormone secretion per se, but rather an attenuated functional effectiveness. In our cohort, insulin-resistant individuals exhibited higher basal GLP-1 concentrations together with blunted postprandial responses, a dissociation consistent with impaired incretin responsiveness. While preliminary, this framework may help interpret interindividual variability in metabolic and surgical outcomes.

Post-surgical microbiota shifts

The surgical procedure had distinct effects on microbiota ecology in both groups. Still, the impact was more pronounced in Hi-IR patients, who exhibited significant increases in microbial richness and beta diversity. These findings suggest that surgery may confer an additional benefit by enhancing microbial diversity in metabolically unfavorable phenotypes. At the compositional level, Hi-IR patients exhibited marked reductions in *Prevotella* species, accompanied by increases in *Akkermansia*, *Streptococcus*, and *Veillonella*. These shifts—reduced *Prevotella* and increased *Akkermansia*, *Veillonella*, and *Streptococcus*—are consistent with recent bariatric studies reporting associations

492 with improved metabolic status, gut barrier function, and enhanced incretin responses
 493 (12,45–48). Notably, *Streptococcus* enrichment has also been linked to GLP-1 and GLP-
 494 2 secretion in patients with type 2 diabetes after RYGB (39,49).

495 Some of the changes observed in Hi-IR patients, including increases in *Akkermansia*,
 496 *Streptococcus*, *Veillonella*, and *Clostridium* species, mirror our previous findings in
 497 patients with type 2 diabetes undergoing RYGB (39). This concordance across procedures
 498 and metabolic contexts suggests that these microbial shifts represent reproducible features
 499 of bariatric surgery rather than surgery-specific phenomena.

500 In the Lo-IR group, surgery enriched *Roseburia*, *Alistipes*, and *Ruminococcus*, taxa
 501 involved in complex substrate fermentation and short-chain fatty acid production, all
 502 recognized for supporting gut health (50). *Roseburia*, a major butyrate producer,
 503 increased markedly; butyrate promotes barrier integrity and has anti-inflammatory
 504 effects, consistent with the inverse correlations we observed with adiposity and
 505 inflammation and the positive association with incretin responsiveness (48,51,52). Both
 506 groups also showed increased *Methanobrevibacter*, in line with reports linking
 507 methanogens to carbohydrate metabolism and long-term weight regulation (53,54).
 508 Overall, these shifts suggest that Lo-IR patients may benefit particularly from taxa
 509 promoting barrier protection, anti-inflammatory activity, and hormonal responsiveness.

510 *Predictive value of baseline microbiota for weight outcomes*

511 We also examined the relationship between pre-surgery GM composition and WL
 512 outcomes. Despite the small sample size (18 participants), our predictive model aligns
 513 with previous studies linking baseline microbiota to weight trajectories after BS. These
 514 findings suggest that microbial signatures may contribute to long-term weight
 515 management, although validation in larger cohorts is required. Beyond microbiota,

516 genetic background, psychological factors, dietary patterns, and physical activity likely
517 interact to influence outcomes. Notably, we observed reductions in *Prevotella*—
518 previously associated with adverse metabolic profiles and blunted incretin responses—
519 together with enrichment of taxa linked to healthier states, such as *Akkermansia*,
520 *Roseburia*, and *Methanobrevibacter*. These patterns, consistent with prior reports
521 (52,55,56), support the hypothesis that SG may help establish a gut microbial
522 environment associated with improved metabolic profiles, particularly in individuals with
523 baseline IR.

524 *Surgical considerations*

525 All participants in our study underwent SG, which allowed us to minimize variability and
526 focus on the role of baseline IR. It is, however, well recognized that incretin responses
527 are generally more pronounced after RYGB or BPD than after SG, due to stronger
528 stimulation of L-cells through nutrient rerouting (8,57). This may partly explain why the
529 incretin response in Hi-IR patients remained attenuated despite weight loss. Moreover,
530 long-term evidence suggests that SG may be less effective than bypass procedures in
531 individuals with very high BMI or severe IR, raising the possibility that SG might not
532 represent the optimal strategy in all subgroups (6). Future comparative studies including
533 different surgical techniques are needed to clarify whether more potent incretin
534 stimulation could mitigate this phenotype or whether “incretin resistance” persists
535 independently of procedure type.

536 This study has certain constraints, mainly the small sample size and the unnested design
537 of the machine learning model, which limit the generalizability of our findings and may
538 increase the risk of overfitting to our cohort. Additionally, data on post-surgical physical
539 activity and dietary intake were not collected. These variables are known to strongly

540 influence both weight trajectories and GM composition, and their absence limits our
541 ability to disentangle the relative contributions of surgery versus lifestyle to the observed
542 outcomes. It is important to note that our findings do not establish causality; instead, they
543 should be viewed as hypothesis-generating. Further research is required to deepen our
544 understanding of the observed changes in microbiota composition following bariatric
545 surgery and their potential links to metabolic outcomes. Finally, the HOMA-IR cut-offs
546 used to define Hi-IR and Lo-IR groups were derived from the cohort distribution. While
547 this strategy enhances internal consistency, external validation in independent cohorts
548 will be necessary to confirm the broader applicability of these thresholds.

549 CONCLUSIONS

550 In conclusion, this prospective study reveals distinct gut microbiota patterns between
551 people with obesity and differing degrees of insulin resistance before and after sleeve
552 gastrectomy. Post-surgically, we observed improved incretin responses together with
553 decreases in *Prevotella* and increases in taxa such as *Akkermansia*, *Roseburia*, and
554 *Methanobrevibacter*, all of which were associated with more favorable metabolic
555 markers. Our findings also suggest potential associations between pre-surgical gut
556 microbiota composition and weight-loss outcomes, pointing to the potential relevance of
557 microbial signatures in shaping individual responses. Given the limited sample size, these
558 observations should be regarded as exploratory. Larger studies are required to validate
559 these associations and to clarify their potential application in developing personalized
560 approaches to bariatric surgery.

561 Acknowledgments

562 The authors thank Sr. Joan Badia for statistical analysis, the Bioinformatics and
563 Biostatistics Unit at the IISPV, and the microbiome data analysis.

564 **Author contributions**

565 RP, M-MR-P, JV, and SP contributed to the conception of the work and wrote the
566 manuscript. LH-M and GLL contributed to the data analysis. BA performed the
567 bioinformatics and statistical analyses. GLL, JB, JT, and AC participated in the study
568 design. Gil, CJ, MP-D, NV, and SFV critically revised the manuscript. All authors
569 contributed to the article and approved the submitted version.

570 **Competing interests**

571 The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial
572 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

573 **Funding**

574 Research conducted in the authors' laboratory is supported by grants from the ISCIII
575 (PI14/00228, PI17/01503, PI20/00338 and PI23/01133 to JV, PI14/00633, PI17/00915,
576 PI20/0114 and PI23/01289 to SP and PI14/01997; PI17/01556 and PI22/01773 to NV)
577 and the Spanish Ministry of Science and Innovation MCIN/AEI/10.13039/501100011033
578 (RTI2018-093919-B-I00 and PID2021-122480OB-584-I00 to SFV), all co-financed by
579 the European Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red (CB07708/0012),
580 ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación, and by the "La Caixa" Foundation (ID
581 100010434) under grant agreement LCF/PR/HR20/52400013 (to SFV). SFV and JV also
582 acknowledge support from the Agency for Management of University Research Grants
583 of the Generalitat de Catalunya (2021 SGR 01409, 2021 SGR 0089).

584 **Data Availability Statement**

585 The microbiome data presented in this study are available in the European Nucleotide
 586 Archive (ENA) at <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB48776>, accession
 587 number PRJEB48776. The datasets generated and/or analysed during the current study
 588 are available from the corresponding author on reasonable request.

589 **DECLARATIONS**

590 **Ethics approval and consent to participate**

591 All participants provided informed consent, and the study was approved by the ethics
 592 committee of Germans Trias I Pujol Hospital (PI-14 103).

593 **REFERENCES**

- 594 1. Castagneto-Gissey, L, Mingrone, G. Insulin sensitivity and secretion modifications
 595 after bariatric surgery. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(7):692–698. doi:10.3275/8470
- 596 2. Kashyap, SR, Bhatt, DL, Wolski, K, Watanabe, RM, Abdul-Ghani, M, Abood, B, et
 597 al. Metabolic effects of bariatric surgery in patients with moderate obesity and type
 598 2 diabetes: Analysis of a randomized control trial comparing surgery with intensive
 599 medical treatment. *Diabetes Care.* 2013;36(8):2175–82.
- 600 3. Comejo-Pareja, I, Molina-Vega, M, Gómez-Pérez, AM, Damas-Fuentes, M,
 601 Tinahones, FJ. Factors related to weight loss maintenance in the medium-long term
 602 after bariatric surgery: a review. *J Clin Med.* 2021;10(8):1739.
- 603 4. Dang, SA, Haddad, EA, Qadhi, I, et al. Beyond the decade: unveiling long-term
 604 weight and co-morbidity outcomes up to 10 years post laparoscopic sleeve
 605 gastrectomy. *Langenbecks Arch Surg.* 2025;410(1):112.

- 606 5. Seeley, RJ, Chambers, AP, Sandoval, DA. The role of gut adaptation in the potent
607 effects of multiple bariatric surgeries on obesity and diabetes. *Cell Metab.*
608 2015;21(3):369–378.
- 609 6. Salminen, P, Helmio, M, Ovaska, J, Juuti, A, Leivonen, M, Peromaa-Haavisto, P, et
610 al. Effect of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy vs Laparoscopic Roux-en-Y Gastric
611 Bypass on Weight Loss at 5 Years Among Patients With Morbid Obesity: The
612 SLEEVEPASS Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018;319(3):241–254.
- 613 7. Casella, G, Soricelli, E, Castagneto-Gissey, L, Redler, A, Basso, N, Mingrone, G.
614 Changes in insulin sensitivity and secretion after sleeve gastrectomy. *Br J Surg.*
615 2016;103(3):242–248.
- 616 8. Bradley, D, Magkos, F, Eagon, JC, et al. Matched weight loss induced by sleeve
617 gastrectomy or gastric bypass similarly improves metabolic function in obese
618 subjects. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22(9):2026–2031.
- 619 9. Romero, F, Nicolau, J, Flores, L, Casamitjana, R, Ibarzabal, A, Lacy, A, et al.
620 Comparable early changes in gastrointestinal hormones after sleeve gastrectomy and
621 Roux-En-Y gastric bypass surgery for morbidly obese type 2 diabetic subjects. *Surg*
622 *Endosc.* 2012;26(8):2231–2239.
- 623 10. Papamargaritis, D, Le Roux, CW. Do Gut Hormones Contribute to Weight Loss and
624 Glycaemic Outcomes after Bariatric Surgery?. *Nutrients.* 2021;13(3):762.
- 625 11. Wilbrink, JA, van Avesaat, M, Nienhuijs, SW, Stronkhorst, A, Masclee, AAM.
626 Changes in gastrointestinal motility and gut hormone secretion after Roux-en-Y
627 gastric bypass and sleeve gastrectomy for individuals with severe obesity. *Clin*
628 *Obes.* 2025;15(2):e12721.

- 629 12. Dang, JT, Mocanu, V, Park, H, Laffin, M, Hotte, N, Karmali, S, et al. Roux-en-Y
 630 gastric bypass and sleeve gastrectomy induce substantial and persistent changes in
 631 microbial communities and metabolic pathways. *Gut Microbes*.
 632 2022;14(1):2050636.
- 633 13. Tremaroli, V, Karlsson, F, Werling, M, Ståhlman, M, Kovatcheva-Datchary, P,
 634 Olbers, T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce
 635 Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass
 636 Regulation. *Cell Metab*. 2015;22(2):228–238.
- 637 14. Yoon, HS, Cho, CH, Yun, MS, Jang, SJ, You, HJ, Kim, JH, et al. *Akkermansia*
 638 *muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves
 639 glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice. *Nat*
 640 *Microbiol*. 2021;6(5):563–573.
- 641 15. Rowland, I, Gibson, G, Heinken, A, Scott, K, Swann, J, Thiele, I, et al. Gut
 642 microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J*
 643 *Nutr*. 2018;57(1):1–24.
- 644 16. Anhê, FF, Zlitni, S, Zhang, SY, Choi, BSY, Chen, CY, Foley, KP, et al. Human gut
 645 microbiota after bariatric surgery alters intestinal morphology and glucose
 646 absorption in mice independently of obesity. *Gut*. 2023; 72(3):460–471.
- 647 17. Damms-Machado, A, Mitra, S, Schollenberger, AE, Kramer, KM, Meile, T,
 648 Königsrainer, A, et al. Effects of surgical and dietary weight loss therapy for obesity
 649 on gut microbiota composition and nutrient absorption. *Biomed Res Int*.
 650 2015;2015:806248.
- 651 18. Haghighat, N, Ashtary-Larky, D, Bagheri, R, Aghakhani, L, Asbaghi, O, Amini, M,
 652 et al. Preservation of fat-free mass in the first year after bariatric surgery: a

- 653 systematic review and meta-analysis of 122 studies and 10,758 participants. Surg
654 Obes Relat Dis. 2022;18(7):964–982.
- 655 19. Preda, A, Carbone, F, Tirandi, A, Montecucco, F, Liberale, L. Obesity phenotypes
656 and cardiovascular risk: From pathophysiology to clinical management. Rev Endocr
657 Metab Disord. 2023;24(5):901–919.
- 658 20. Tanriover, C, Copur, S, Gaipov, A, Ozlusen, B, Akcan, RE, Kuwabara, M, et al.
659 Metabolically healthy obesity: Misleading phrase or healthy phenotype? Eur J Intern
660 Med. 2023; 111:5–20.
- 661 21. Hjorth, MF, Ritz, C, Blaak, EE, Saris, WH, Langin, D, Poulsen, SK, et al.
662 Pretreatment fasting plasma glucose and insulin modify dietary weight loss success:
663 results from 3 randomized clinical trials. Am J Clin Nutr. 2017;106(2):499–505.
- 664 22. American Diabetes Association. 2. Diagnosis and classification of diabetes:
665 Standards of Care in Diabetes—2024. Diabetes Care. 2024;47(Suppl 1):S20–S42.
- 666 23. Gayoso-Diz, P, Otero-González, A, Rodríguez-Alvarez, MX, Gude, F, García, F,
667 De Francisco, A, et al. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the
668 metabolic syndrome in a general adult population: Effect of gender and age:
669 EPIRCE cross-sectional study. BMC Endocr Disord. 2013; 13:47.
- 670 24. Decaro-Fragoso, MF, Estrada-Garcia, T, Lopez-Saucedo, C, Elizalde-Barrera, CI.
671 Determining Insulin Resistance Cutoffs in Mexican Adults: Percentile Distribution
672 vs. Receiver Operating Characteristic Curve Analysis. Cureus. 2025;17(2): e79775.
- 673 25. Ballesteros Pomar, MD, Vilarrasa García, N, Rubio Herrera, MÁ, Barahona, MJ,
674 Bueno, M, Caixàs, A, et al. Abordaje clínico integral SEEN de la obesidad en la

- edad adulta: resumen ejecutivo. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. 2021;68(2):130–136.
26. Matthews, DR, Hosker, JR, Rudenski, AS, Naylor, BA, Treacher, DF, Turner, RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–419.
27. Koehler, EM, Schouten, JNL, Hansen, BE, Hofman, A, Stricker, BH, Janssen, HLA. External Validation of the Fatty Liver Index for Identifying Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Population-based Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(9):1201–1204.
28. Menzel, P, Ng KL, Krogh, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun*. 2016;7:11257.
29. Boisvert, S, Raymond, F, Godzaridis, É, Laviolette, F, Corbeil, J. Ray Meta: scalable de novo metagenome assembly and profiling. *Genome Biol*. 2012;13(12): R122.
30. Hyatt, D, Chen, GL, LoCascio, PF, Land, ML, Larimer, FW, Hauser, LJ. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11:119.
31. Kanehisa, M, Araki, M, Goto, S, Hattori, M, Hirakawa, M, Itoh, M, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D480–D484.
32. Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, Lipman, DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403–410.

- 697 33. McMurdie, PJ, Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive
698 Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One. 2013;8(4): e61217.
- 699 34. Paulson, JN, Stine, OC, Bravo, HC, Pop, M. Differential abundance analysis for
700 microbial marker-gene surveys. Nat Methods. 2013;10(12):1200–1202.
- 701 35. Abdelsalam, NA, Hegazy, SM, Aziz, RK. The curious case of *Prevotella copri*. Vol.
702 15, Gut Microbes. 2023;15(2):2249152.
- 703 36. Pedersen, HK, Gudmundsdottir, V, Nielsen, HB, Hyötylainen, T, Nielsen, T, Jensen,
704 BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin
705 sensitivity. Nature. 2016;535(7612):376–381.
- 706 37. Moreno-Indias, I, Sánchez-Alcoholado, L, Garcia-Fuentes, E, Cardona, F, Queipo-
707 Ortuño MI, Tinahones, FJ. Insulin resistance is associated with specific gut
708 microbiota in appendix samples from morbidly obese patients. Am J Transl Res.
709 2016; 8(12):5672–5684.
- 710 38. Everard, A, Belzer, C, Geurts, L, Ouwerkerk, JP, Druart, C, Bindels, LB, et al.
711 Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls
712 diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(22):9066–9071.
- 713 39. Hernández-Montoliu, L, Rodríguez-Peña, MM, Puig, R, Astiarraga, B, Guerrero-
714 Pérez, F, Virgili, N, et al. A specific gut microbiota signature is associated with an
715 enhanced GLP-1 and GLP-2 secretion and improved metabolic control in patients
716 with type 2 diabetes after metabolic Roux-en-Y gastric bypass. Front Endocrinol
717 (Lausanne). 2023;14:1181744.

- 718 40. Zhong, H, Ren, H, Lu, Y, Fang, C, Hou, G, Yang, Z, et al. Distinct gut metagenomics
719 and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics.
720 EBioMedicine 2019; 47:373–383.
- 721 41. Karlsson, FH, Tremaroli, V, Nookaew, I, Bergström, G, Behre, CJ, Fagerberg, B, et
722 al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose
723 control. Nature. 2013;498(7452):99–103.
- 724 42. Allin, KH, Tremaroli, V, Caesar, R, Jensen, BAH, Damgaard, MTF, Bahl, MI, et al.
725 Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. Diabetologia.
726 2018;61(4):810-820.
- 727 43. Amato, A, Baldassano, S, Mulè, F. GLP2: an underestimated signal for improving
728 glycaemic control and insulin sensitivity. J Endocrinol. 2016;229(2):R57–R66.
- 729 44. Sridhar, A, Khan, D, Elliott, JA, Naughton, V, Flatt, PR, Irwin, N, et al. RYGB
730 surgery has modest effects on intestinal morphology and gut hormone populations
731 in the bypassed biliopancreatic limb but causes reciprocal changes in GLP-2 and
732 PYY in the alimentary limb. PLoS One. 2023;18(5): e0286062.
- 733 45. Ikeda, T, Aida, M, Yoshida, Y, Matsumoto, S, Tanaka, M, Nakayama, J, et al.
734 Alteration in faecal bile acids, gut microbial composition and diversity after
735 laparoscopic sleeve gastrectomy. Br J Surg. 2020;107(12):1673–1685.
- 736 46. Farin, W, Oñate, FP, Plassais, J, Bonny, C, Beglinger, C, Woelnerhanssen, B, et al.
737 Impact of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on gut
738 microbiota: a metagenomic comparative analysis. Surg Obes Relat Dis.
739 2020;16(7):852–862.

- 740 47. Morán-Ramos, S, Soriano-Cortés, R, Soto-Fuentes, V, Tenorio-Quiroz, A,
741 Gervasio-Ortiz, E, Rico-Amador, D, et al. Role of presurgical gut microbial
742 diversity in Roux-en-Y gastric bypass weight-loss response: a cohort study.
743 *Lifestyle Genom.* 2024;17(1):12–21.
- 744 48. Murphy, R, Tsai, P, Jüllig, M, Liu, A, Plank, L, Booth, M. Differential changes in
745 gut microbiota after gastric bypass and sleeve gastrectomy bariatric surgery vary
746 according to diabetes remission. *Obes Surg.* 2017;27(4):917–925.
- 747 49. Gutiérrez-Repiso, C, Moreno-Indias, I, Tinahones, FJ. Shifts in gut microbiota and
748 their metabolites induced by bariatric surgery. Impact of factors shaping gut
749 microbiota on bariatric surgery outcomes. *Rev Endocr Metab Disord.*
750 2021;22(4):1137–1156.
- 751 50. David, LA, Maurice, CF, Carmody, RN, Gootenberg, DB, Button, JE, Wolfe, BE,
752 et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature.*
753 2014;505(7484):559–563.
- 754 51. Tabasi, M, Eybpoosh, S, Siadat, SD, Elyasina, F, Soroush, A, Bouzari, S.
755 Modulation of the Gut Microbiota and Serum Biomarkers After Laparoscopic
756 Sleeve Gastrectomy: a 1-Year Follow-Up Study. *Obes Surg.* 2021;31(5):1949–
757 1956.
- 758 52. Xu, Z, Jiang, W, Huang, W, Lin, Y, Chan, FKL, Ng SC. Gut microbiota in patients
759 with obesity and metabolic disorders — a systematic review. *Genes Nutr.*
760 2022;17(1):2.
- 761 53. Kayser, BD, Prifti, E, Lhomme, M, Belda, E, Dao, MC, Aron-Wisnewsky, J, et al.
762 Elevated serum ceramides are linked with obesity-associated gut dysbiosis and
763 impaired glucose metabolism. *Metabolomics.* 2019;15(11):140.

- 764 54. Samuel, BS, Hansen, EE, Manchester, JK, Coutinho, PM, Henrissat, B, Fulton, R,
 765 et al. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the
 766 human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10643–10648.
- 767 55. Le Chatelier, E, Nielsen, T, Qin, J, Prifti, E, Hildebrand, F, Falony, G, et al. Richness
 768 of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*.
 769 2013;500(7464):541–546.
- 770 56. Kim, MH, Yun, KE, Kim, J, Park, E, Chang, Y, Ryu, S, et al. Gut microbiota and
 771 metabolic health among overweight and obese individuals. *Sci Rep*.
 772 2020;10(1):19417.
- 773 57. Salehi, M, Peterson, R, Tripathy, D, Pezzica, S, DeFronzo, R, Gastaldelli, A.
 774 Insulinotropic effect of endogenous incretins is greater after gastric bypass than
 775 sleeve gastrectomy despite diminished beta-cell sensitivity to plasma incretins.
 776 Preprint. medRxiv. 2023. doi:10.1101/2023.03.28.23287755.

777

778 **FIGURE LEGENDS**

779 **Figure 1. GLP-1 and GLP-2 responses to MMT at baseline and 6 months in Lo-IR**
 780 **and Hi-IR.**

781 GLP-1 and GLP-2 responses to the meal tolerance test (MTT) at baseline and 6 months
 782 in participants with low (Lo-IR) and high insulin resistance (Hi-IR). Panels A and B
 783 represent mean $\pm$ standard deviation plasma concentrations of GLP-1 (1A) and GLP-2
 784 (1B), respectively, measured at each time point during the MTT. Lo-IR participants are
 785 shown in green, and Hi-IR participants are shown in blue. Dashed lines indicate baseline
 786 data; solid lines indicate 6-month follow-up. Abbreviations: GLP-1, glucagon-like

787 peptide-1; GLP-2, glucagon-like peptide-2; Lo-IR, low insulin resistance; Hi-IR, high
788 insulin resistance; MTT, meal tolerance test.

789 **Figure 2. Baseline gut microbiota abundance and correlations with clinical and**
790 **hormonal variables.** Baseline microbiota abundance levels. Log fold change (FC) and
791 Spearman correlation analyses of the relative abundance at the species level of gut
792 microbiota and clinical variables and incretin hormones in all individuals. For FC
793 analysis, a zero-inflated Gaussian mixture model (fitZig) from the metagenomeSeq R
794 package was used. The subject factor in IDPAT is used as a batch effect. The yellow and
795 purple bars represent the Log2FC values of these species. All adjusted p-values <0.05 in
796 FC and + p-value <0.05; *adjusted p-value<0.05 for Spearman correlation analyses.
797 Abbreviations: FC, fold change; Log₂FC, log₂-transformed fold change; BMI, body mass
798 index; FMI, fat mass index; FFMI, fat-free mass index; HbA1c, glycated hemoglobin;
799 HOMA-IR, homeostatic model assessment for insulin resistance; GIP, gastric inhibitory
800 polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide-1; IL-6, interleukin-6.

801 **Figure 3. Surgical-induced microbiota changes and associations between species and**
802 **variables related to metabolic health status.** Log fold change (FC) and Spearman
803 correlation analyses of the relative abundance at the species level of gut microbiota and
804 clinical variables and incretin hormones in all individuals. A zero-inflated Gaussian
805 mixture model (fitZig) from the metagenomeSeq R package was used for FC analysis.
806 Contrast 6M/basal. All adjusted p-values <0.05 in FC and + p-value <0.05; *adjusted p-
807 value<0.05 for Spearman correlation analyses. Abbreviations: Log₂FC, log₂-transformed
808 fold change; Lo-IR, low insulin resistance; Hi-IR, high insulin resistance; BMI, body
809 mass index; FMI, fat mass index; FFMI, fat-free mass index; HbA1c, glycated
810 hemoglobin; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance; GLP-1,
811 glucagon-like peptide-1; GLP-2, glucagon-like peptide-2; IL-6, interleukin-6.

812 **Figure 4. Gut metagenomic signature predicts intervention success at 5-year follow-**

813 **up.** A predictive model (glmnet for feature selection and Random Forest for binary
814 classification) identified potential microbial taxa associated with intervention success.
815 These taxa were subsequently used in a weight loss regression model. Top-left: predicted
816 probabilities of intervention success and predicted values of weight loss; Top-right:
817 classification model performance (AUC=0.870); Bottom: classification model most
818 important taxa, ranked by cumulative importance across folds. Abbreviations: AUC, area
819 under the ROC curve; ROC, receiver operating characteristic; OTU, operational
820 taxonomic unit.

821 **Supplementary Information Summary**

822 Supplementary Methods and Supplementary Table S1 are available at *International*
823 *Journal of Obesity* website.

824 **File name:** Supplementary Methods.pdf

825 **File format:** PDF document

826 **Title of data:** Supplementary Methods

827 **Description of data:** Extended methods covering body composition assessment, surgical
828 technique, meal test, incretin assays, stool collection, sequencing, bioinformatics
829 pipeline, and statistical analyses.

830 **File name:** Supplementary Table S1.xlsx

831 **File format:** Excel spreadsheet (.xlsx)

832 **Title of data:** Differentially abundant microbial species post-intervention in Lo-IR and
833 Hi-IR patient groups (adjusted $p < 0.05$)

834 **Description of data:** Complete list of species showing significant changes in relative
835 abundance after intervention, stratified by insulin resistance group. Includes log₂ fold
836 changes and adjusted p-values computed using the fitZig model.

Table 1. Main anthropometric and metabolic variables at baseline and 6 months post-surgery.

	LO-IR (n=9)			HI-IR (n=9)		
	Basal	6-month	P	Basal	6-month	P
BMI (Kg/m²)	41.76±3.66	30.58±2.82	0.007	48.30±3.46 ^{ij}	35.52±4.45 ^j	0.007
Waist (cm)	116.77±6.89	92.0±7.83	0.007	130.27±9.11 ^{mn}	104.16±11.61 ⁿ	0.007
Fat Mass (%)	53.89±9.92	30.07±7.46	0.007	65.59±7.26 ^r	39.59±11.03	0.007
Lean Mass (%)	51.79±8.28	46.41±7.44	0.007	54.93±8.72	49.64±8.12	0.007
FFM (Kg)	49.52±9.03	55.36±5.93	0.015	42.82±6.93	55.42±9.43	0.007
FFMI (Kg/m²)	18.97±2.69	21.22±1.02	0.020	16.46±2.85	21.12±2.47	0.007
%WL	-	24.7 (22.7–31.1)	-	-	27.1 (20.9–32.5)	-
FPG (mmol/L)	4.96±0.45	4.65±0.32	0.13	5.27±0.55	4.55±0.35	0.007
Insulin (pmol/L)	54.1 (43.4-84.7)	28.3 (22.9-38.7)	0.007	94.6 (83.5-107)	33.4 (26.6-52.7)	0.03
HOMA-IR	2.66±1.14	1.28±0.39	0.007	4.48±1.14 ^{ab}	1.47±0.96	0.007
HbA1c (%)	5.35±0.16	5.77±1.56	0.26	5.47±0.37	5.26±0.25	0.15
Total cholesterol (mmol/L)	4.76±0.69	4.52±0.79	0.26	4.70±0.84	5.08±0.78	0.31
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.32±0.22	1.30±0.21	0.40	1.06±0.2 ^a	1.18±0.13	0.12

LDL- cholesterol (mmol/L)	2.83±0.66	2.73±0.71	0.63	2.76±0.98	3.34±0.68	0.17
Triglycerides (mmol/L)	1 (0.9-1.2)	1.1 (0.9-1.3)	0.85	1.45 (0.9-1.7)	1.1 (1-1.4)	0.03
FLI	94.65 (90.65- 97.59)	39.75 (23.85- 59.53)	0.018	99.30 ^{##} (98.89-99.71)	65.41 [#] (57.45-82.12)	0.007
IL-6 pg/mL	1.84±0.62	1.57±0.78	0.44	2.94±0.91 [#]	1.93±0.69	0.017
Zonulin ng/mL	2.72± 0.35	2.50± 0.43	0.08	2.90±0.36	2.67± 0.35	0.038

p < 0.05; ## p < 0.01 (Lo-IR vs. Hi-IR).

Data are expressed as median (25th–75th percentiles) or mean ± SD, as appropriate. Fat, lean, and body mass were measured by DXA. Abbreviations: BMI, body mass index; FPG, fasting plasma glucose; WL, Weight loss; HOMA-IR, Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance; FLI, fatty liver index; IL-6, interleukin 6.

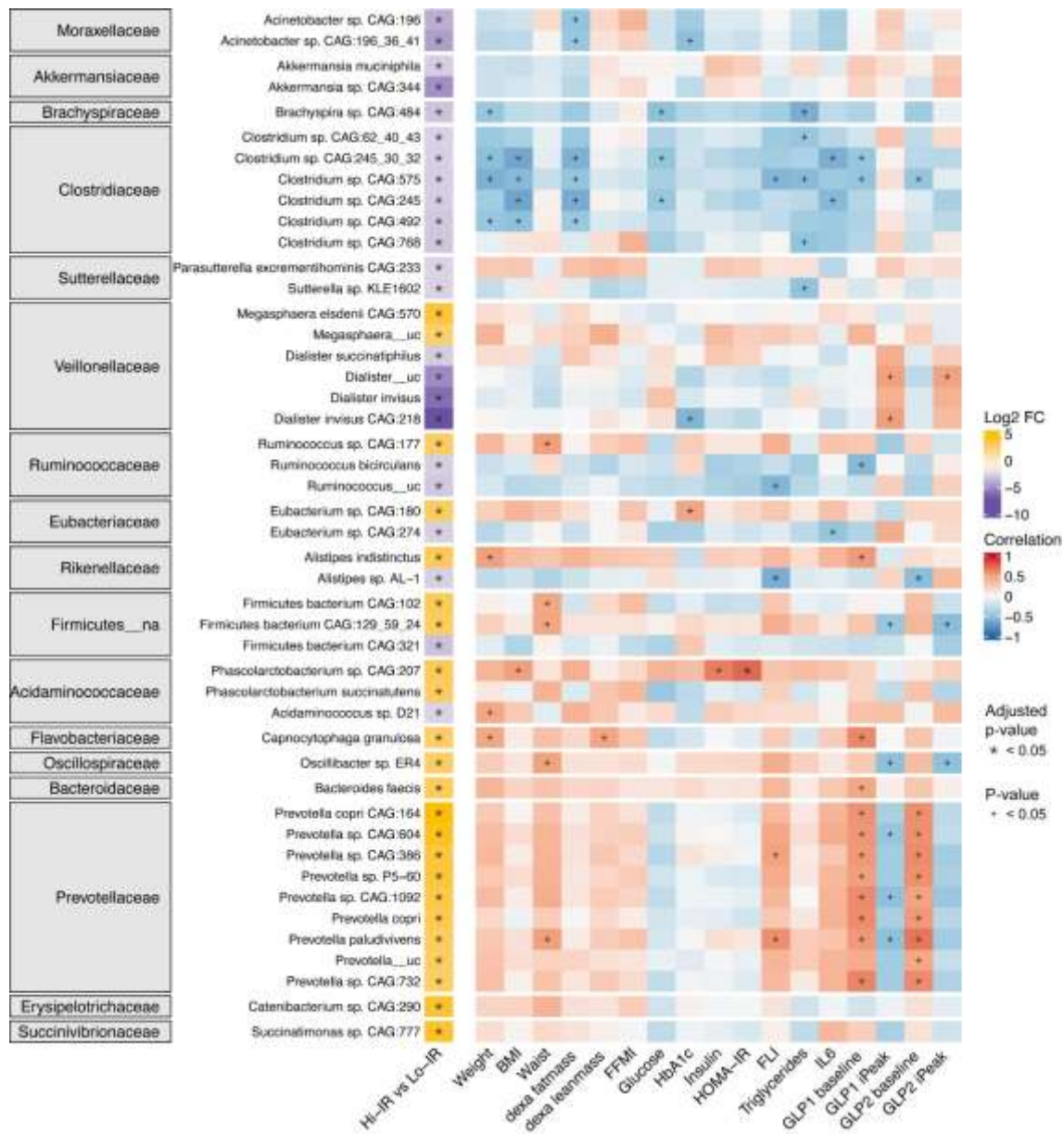
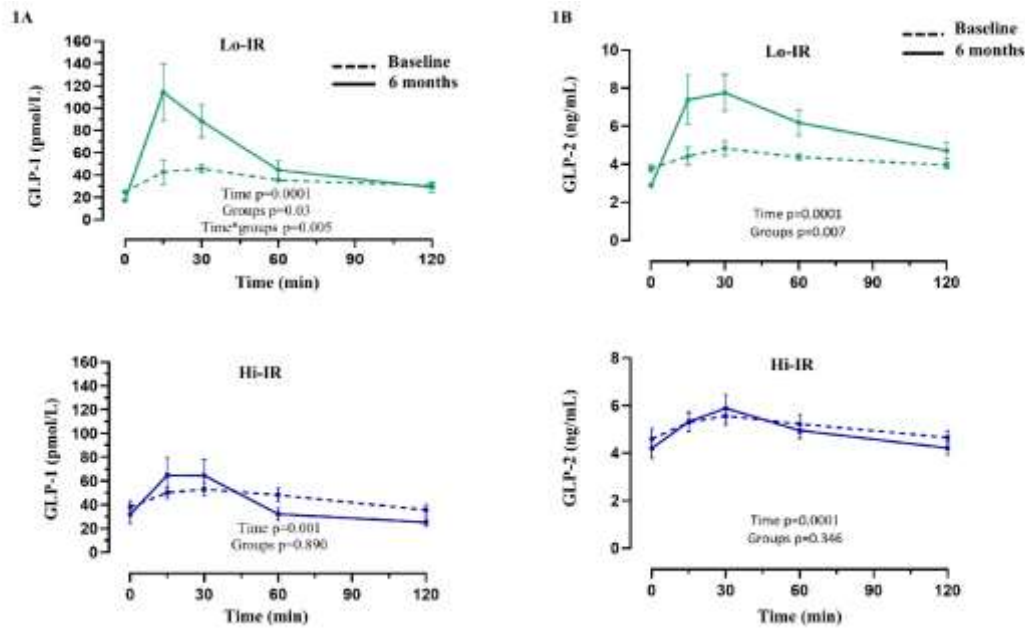
Table 2. GLP-1 and GLP-2 fasting levels, peak responses, and AUC before and after sleeve gastrectomy.

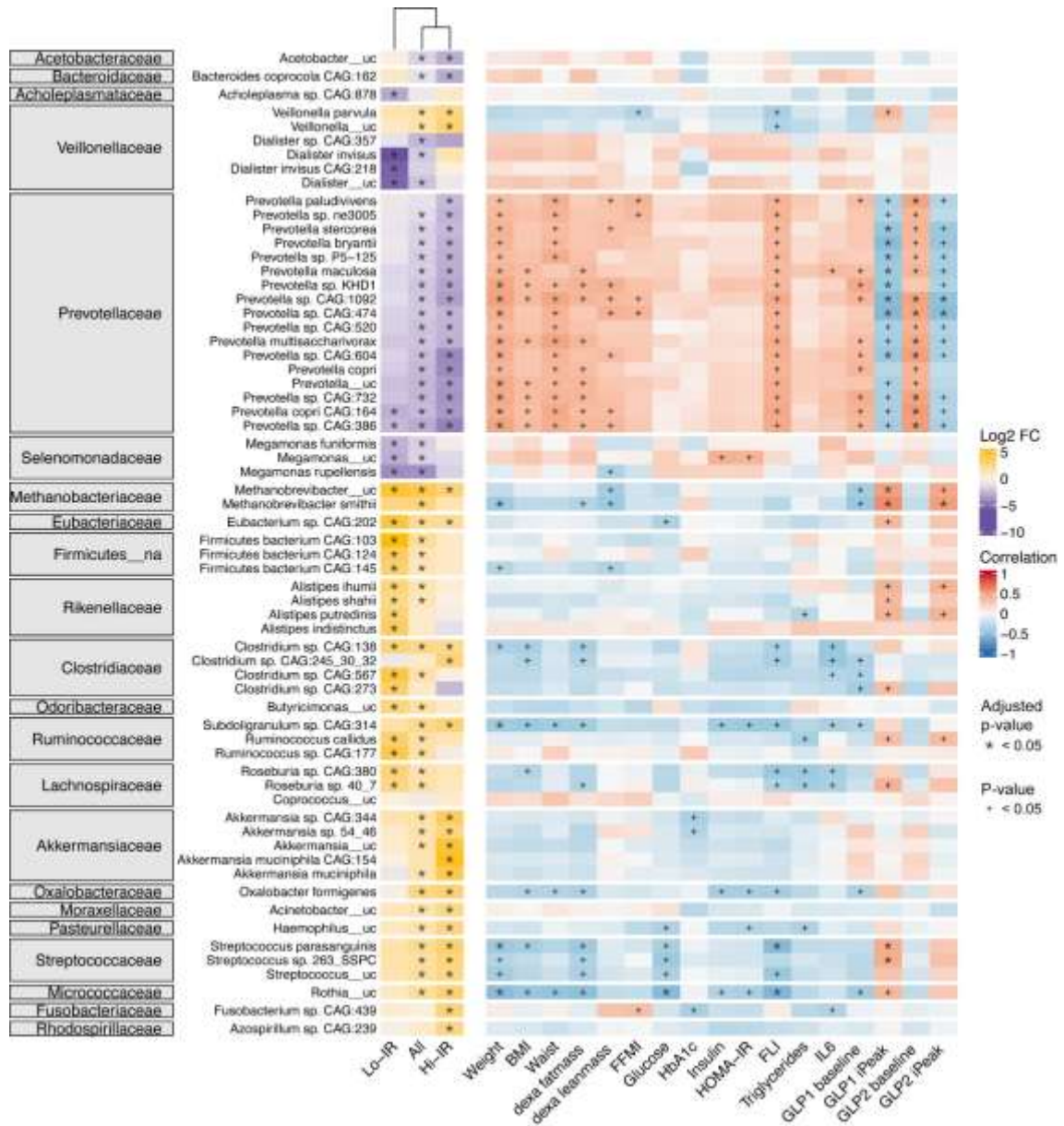
(A) Fasting GLP-1 and GLP-2 levels						
	Group	Pre-SG	Post-SG	p-value (pre vs. post)	p-value (Lo vs. Hi, pre)	p-value (Lo vs. Hi, post)
GLP-1 (pmol/L)	Lo-IR	29.14 (19.25– 29.75)	16.63 (16.00– 18.99)	0.010	0.011	0.057
GLP-1 (pmol/L)	Hi-IR	34.23 (29.17– 42.91)	23.00 (21.58– 35.12)	0.138		
GLP-2 (ng/mL)	Lo-IR	3.60 (3.44– 4.31)	3.02 (2.75– 3.13)	0.007	0.085	0.004
GLP-2 (ng/mL)	Hi-IR	4.39 (3.69– 4.99)	3.89 (3.74– 4.21)	0.173		
(B) GLP-1 and GLP-2 response (% increase-to-baseline)						
	Group	Pre-SG	Post-SG	p-value (pre vs. post)	p-value (Lo vs. Hi, pre)	p-value (Lo vs. Hi, post)
GLP-1 (%)	Lo-IR	76.93 (69.19– 140.18)	531.67 (283.94– 804.16)	0.007	0.030	0.021
GLP-1 (%)	Hi-IR	51.96 (37.54– 67.68)	166.43 (127.93– 283.12)	0.012		
GLP-2 (%)	Lo-IR	22.41 (12.14– 41.95)	195.59 (90.99– 267.99)	0.007	0.965	0.009

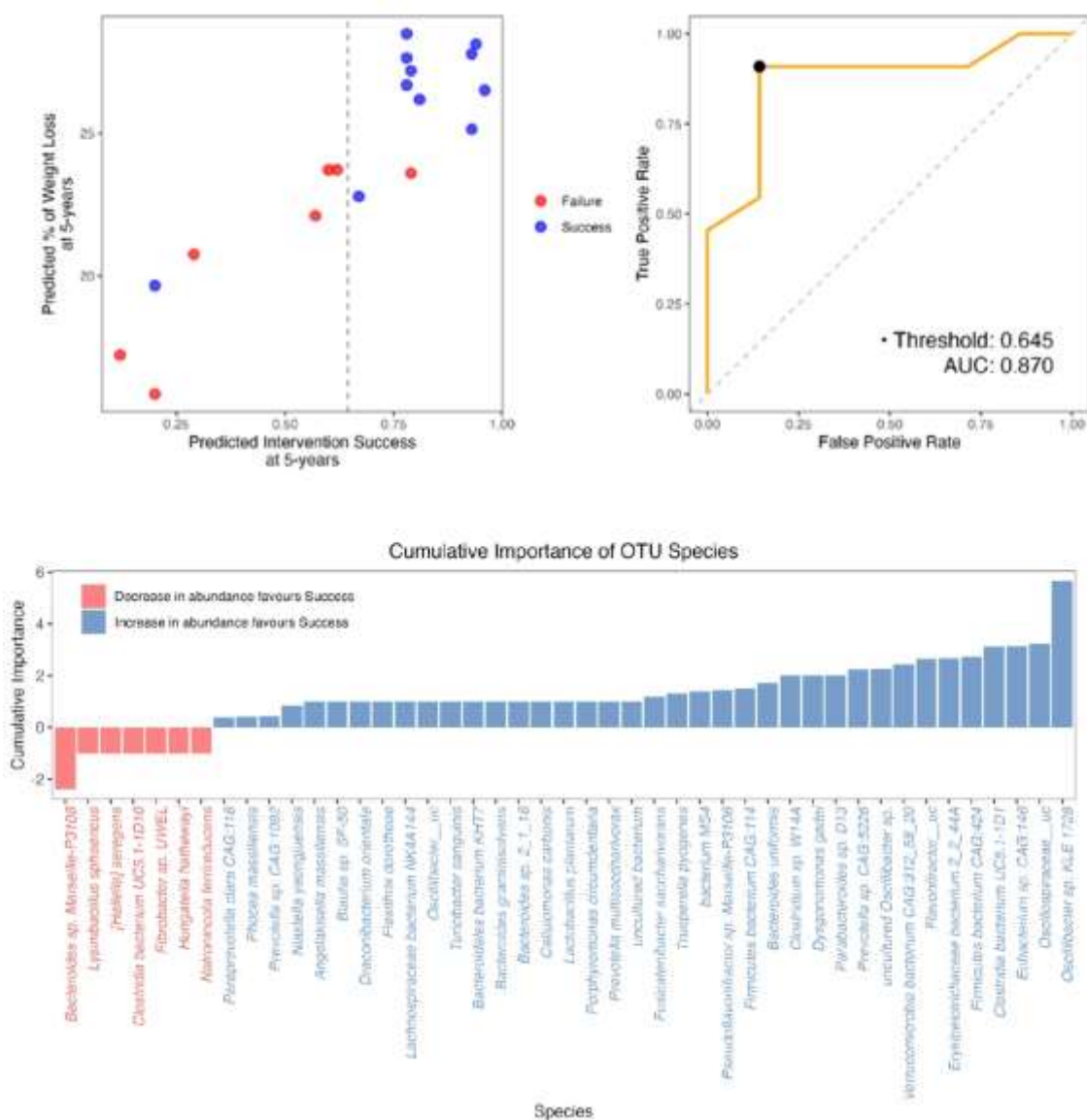
GLP-2 (%)	Hi-IR	27.10 (15.05– 33.80)	31.11 (21.86– 68.04)	0.050		
------------------	-------	----------------------------	----------------------------	--------------	--	--

(C) GLP-1 and GLP-2 responses (AUC_{0–120} min)						
	Group	Pre-SG	Post-SG	p-value (pre vs. post)	p-value (Lo vs. Hi, pre)	p-value (Lo vs. Hi, post)
AUC GLP-1	Lo-IR	4365.1 (3715.6– 4732.2)	6694.6 (4041.9– 8927.5)	0.066	0.070	0.171
AUC GLP-1	Hi-IR	5170.6 (4644.0– 6230.1)	4399.9 (3490.1– 5044.0)	0.110		
AUC GLP-2	Lo-IR	488.8 (470.2– 541.1)	729.3 (521.7– 960.6)	0.028	0.038	0.354
AUC GLP-2	Hi-IR	582.2 (549.6– 668.3)	597.0 (504.5– 637.1)	0.441		

Median fasting concentrations (A), percentage increase from baseline (B), and area under the curve (AUC_{0–120} min) of GLP-1 and GLP-2 (C) measured before and 6 months after sleeve gastrectomy in participants with low (Lo-IR) and high (Hi-IR) insulin resistance. Comparisons were made within each group (pre- vs. post-SG; Wilcoxon signed-rank test) and between Lo-IR and Hi-IR at each time point (Mann–Whitney U test). Values are reported as median (25th–75th percentiles). Abbreviations: GLP-1, glucagon-like peptide-1; GLP-2, glucagon-like peptide-2; Lo-IR, low insulin resistance; Hi-IR, high insulin resistance; SG, sleeve gastrectomy.







5. RESUM GLOBAL DELS RESULTATS

5.1. Perfil de microbiota i metabòlits bacterians en els diferents estadis de disfunció glucèmica

Per caracteritzar les alteracions de la MI i dels seus metabòlits al llarg del continu glucèmic, es va dur a terme un estudi transversal en el marc de la cohort poblacional Di@bet.es (vegeu Article 1, *Nutrients* 2025), que incloïa 88 participants adults classificats segons els criteris de l'*American Diabetes Association* en tres grups: normoglucèmia (NonDM), prediabetis (PreDM) i diabetis tipus 2 (DM2).

Els resultats van mostrar que les concentracions d'àcid acètic fecal van ser inferiors en els individus amb DM2 en comparació amb els grups NonDM i PreDM. En els models ajustats, nivells més elevats d'àcid acètic es van associar amb un menor risc de DM2 (OR = 0,561; $p = 0,009$), mentre que l'àcid acètic es va comportar com a predictor positiu de preDM respecte al grup NonDM (OR = 1,422; $p = 0,028$).

Els nivells d'àcid propiònic fecal es van associar inversament amb la preDM (OR = 0,714; $p = 0,028$). Les concentracions de propiònic i butíric van mostrar tendències a valors més baixos en DM2, però les diferències no foren significatives, i no es van detectar associacions per als àcids isobutíric, isovalèric ni valèric.

L'anàlisi taxonòmica va revelar canvis progressius en la composició microbiana segons l'estat glucèmic. Els participants amb DM2 van presentar una major abundància d'*Escherichia/Shigella* i una reducció de bacteris productors d'acetat, com *Romboutsia* i *Clostridium sensu stricto*. En els individus amb PreDM es van detectar increments de Firmicutes i Alifaproteobacteria no classificats, que van disminuir novament en DM2. L'abundància de *Lawsonibacter* va ser inferior en DM2 respecte a PreDM.

Les anàlisis de correlació van mostrar relacions positives entre *Clostridium sensu stricto* i l'àcid butíric, *Lactonifactor* i l'àcid propiònic, i *Romboutsia* i el propiònic fecal. En sentit contrari, les Coriobacteriia no classificades es van correlacionar negativament amb les concentracions d'acetat i butirac. L'abundància més alta d'*Escherichia/Shigella* en DM2 va coincidir amb valors més baixos d'àcid acètic fecal.

En resum, l'estudi va identificar diferències en les concentracions fecals d'AGCC i en la composició microbiana al llarg del continu glucèmic. Els AGCC més associats amb l'estat metabòlic van ser l'àcid acètic i el propiònic, mentre que els canvis microbials van incloure una pèrdua progressiva de bacteris productors d'AGCC i un augment de gèneres potencialment proinflamatoris.

5.2. Remodelació microbiana i resposta incretínica després de la cirurgia bariàtrica en pacients amb DM2

Per avaluar els efectes metabòlics i microbians de la CB, es va dur a terme un estudi prospectiu en pacients amb DM2 sotmesos a BPG, amb un seguiment de 12 mesos.

Es van analitzar els canvis en el pes corporal i els paràmetres metabòlics, la resposta incretínica (GLP-1 i GLP-2), la permeabilitat intestinal i la composició de la microbiota fecal. La mostra va incloure tretze participants adults amb obesitat greu i DM2.

Després de la intervenció, es va registrar un percentatge de pèrdua de pes total del 34% i una reducció de la massa grassa del 36%. Es van observar descensos significatius en la glucosa plasmàtica en dejú, HOMA-IR, HbA1c i triglicèrids, així com millores generals del perfil lipídic. Els nivells del pèptid C van augmentar de manera significativa després de la cirurgia. La remissió completa de la DM2 (HbA1c < 6% sense tractament hipoglucemiant durant almenys tres mesos) es va assolir en el 69% dels pacients.

L'àrea sota la corba (AUC) de GLP-1 i GLP-2 durant la prova d'àpat mixt (meal test, MTT) van augmentar significativament, mostrant una restauració de la resposta incretínica postprandial. Augments similars es van observar durant la prova d'ingesta amb sobrecàrrega lipídica. Els nivells plasmàtics de zonulina i succinat van disminuir de manera significativa, mentre que la IL-6 va mostrar una reducció no significativa.

L'anàlisi de la MI va revelar un canvi significatiu en la diversitat beta ($p = 0,005$), sense modificacions rellevants en la diversitat alfa. Després de la cirurgia, es van observar increments en espècies de les famílies *Streptococcaceae*, *Akkermansiaceae*, *Veillonellaceae*, *Sutterellaceae* i *Rickenellaceae*, juntament amb reduccions en *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* i *Erysipelotrichaceae*.

Entre les espècies més destacades, *Akkermansia muciniphila*, *Veillonella dispar* i diversos *Streptococcus* spp. es van correlacionar negativament amb el pes, l'IMC, la circumferència de la cintura i el greix corporal, i positivament amb els nivells d'AUC de GLP-1 i GLP-2. En canvi, les espècies reduïdes després de la cirurgia —pertanyents principalment a *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* i *Erysipelotrichaceae*— van mostrar correlacions positives amb els paràmetres metabòlics desfavorables i una relació inversa amb la resposta incretínica.

Els nivells inicials més elevats de pèptid C van constituir l'únic predictor significatiu de remissió de la DM2.

En conjunt, al cap de dotze mesos del BPG, els pacients van presentar millores metabòliques i hormonals significatives, juntament amb canvis consistents en la MI cap a un perfil metabòlicament més favorable junt amb una reducció del marcador de permeabilitat intestinal (zonulina). Les espècies bacterianes que van augmentar després de la cirurgia es van associar a nivells més alts d'incrèties i a millors perfils metabòlics.

5.3. Relació de la resistència a la insulina en la resposta microbiana i hormonal després de la cirurgia

Per avaluar la relació de la RI amb la resposta metabòlica, hormonal i microbiana a la CB, es va dur a terme un estudi prospectiu en divuit pacients amb obesitat greu sotmesos a SG. Els participants es van estratificar en dos grups segons l'índex HOMA-IR basal: alta RI (Hi-IR) i baixa RI (Lo-IR).

Canvis hormonals i metabòlics

Abans de la cirurgia, els pacients amb Hi-IR presentaven nivells més alts de GLP-1 en dejú i una resposta postprandial atenuada durant el MTT, en comparació amb el grup Lo-IR. Els nivells de GLP-2 van ser similars entre grups.

Als sis mesos de la SG, tots dos grups van experimentar una reducció significativa de la RI, sense diferències en la pèrdua de pes entre grups (24,7% en el grup Lo-IR i 27,1% en el grup Hi-IR). No obstant això, el grup Lo-IR va mostrar una resposta més gran de GLP-1 i GLP-2 després del MTT i una reducció més marcada del *fatty liver index* (FLI). El grup Hi-IR va presentar una disminució de les concentracions de triglicèrids, HDL-c, IL-6 i zonulina.

Als cinc anys, la pèrdua de pes es va mantenir comparable entre grups i es va correlacionar positivament amb la pèrdua de pes, la reducció de la massa grassa i de la circumferència de cintura observades als sis mesos. El *fat-free mass index* basal va ser més alt en els pacients que van mantenir una pèrdua de pes $\geq 20\%$ (millors responedors). No es va identificar una relació entre la milloria en resposta incretínica observada en la fase activa de la pèrdua ponderal inicial (primers 6 mesos) i la pèrdua de pes a llarg termini (als 5 anys).

Canvis en la microbiota intestinal

Abans de la cirurgia, els pacients amb Hi-IR presentaven enriquiment en *Prevotella*, mentre que els del grup Lo-IR mostraven major abundància d'*Akkermansia*, *Clostridium* i *Dialister*. Després de la intervenció, la riquesa microbiana i la diversitat beta van augmentar principalment en el grup Hi-IR, indicant una remodelació més intensa de la comunitat bacteriana.

Els canvis més destacats van incloure la reducció de *Prevotella* spp. i *Bacteroides coprocola*, i l'augment d'*Akkermansia*, *Veillonella* i *Streptococcus* en Hi-IR, mentre que en Lo-IR es van observar increments de *Ruminococcus*, *Alistipes* i *Roseburia*.

En ambdós grups, els tàxons que van disminuir —especialment *Prevotella*— es van associar a majors valors d'adipositat i menor resposta incretínica, mentre que els que van augmentar es van relacionar amb paràmetres metabòlics més favorables.

El model predictiu basat en la microbiota basal va aconseguir una AUC de 0,870 per predir una pèrdua de pes superior al 20% als cinc anys.

Resum global

Després de la SG, els pacients amb alta RI van mostrar una remodelació microbiana més profunda, mentre que els de baixa RI van presentar una recuperació de la resposta incretínica més accentuada i una millora més notable d'alguns paràmetres metabòlics. En ambdós grups, la pèrdua de pes es va mantenir a llarg termini i es va relacionar amb canvis en la composició de la microbiota intestinal a un perfil menys inflamatori.

5.4. Resultats integrats del conjunt d'estudis: patrons comuns en la relació microbiota–AGCC–incretines

La integració dels resultats dels tres estudis permet descriure un conjunt de patrons comuns en la interacció entre la MI, els metabòlits bacterians —principalment els AGCC— i la resposta incretínica, tant en la disfunció glucèmica com després de la CB.

En els estadis inicials de disfunció metabòlica (preDM) no es van detectar diferències significatives en les concentracions fecals d'AGCC. En canvi, en la DM2 es va observar una reducció significativa de l'àcid acètic en comparació amb els individus amb normoglucèmia i preDM. Aquest descens es va associar amb una menor presència de bacteris fermentadors com *Romboutsia* i *Clostridium sensu stricto*, i amb un augment d'espècies potencialment consumidores d'acetat com *Escherichia/Shigella*.

Després de la CB, tant el BPG com la SG van induir canvis consistents en la MI i en la resposta hormonal intestinal. En pacients amb DM2, el BPG es va associar a increments de la secreció de GLP-1 i GLP-2 després del MTT, a una reducció dels marcadors de permeabilitat intestinal i a una major abundància d'espècies pertanyents a les famílies *Akkermansiaceae*, *Veillonellaceae*, *Streptococcaceae* i *Alistipes*.

En el cas de la SG, la composició microbiana i la resposta hormonal van variar segons el grau de RI: els pacients amb menor RI van mostrar una resposta incretínica més elevada, mentre que aquells amb major RI van presentar una remodelació microbiana més marcada, amb disminució de *Prevotella* i augment d'*Akkermansia*, *Ruminococcus* i *Streptococcus*.

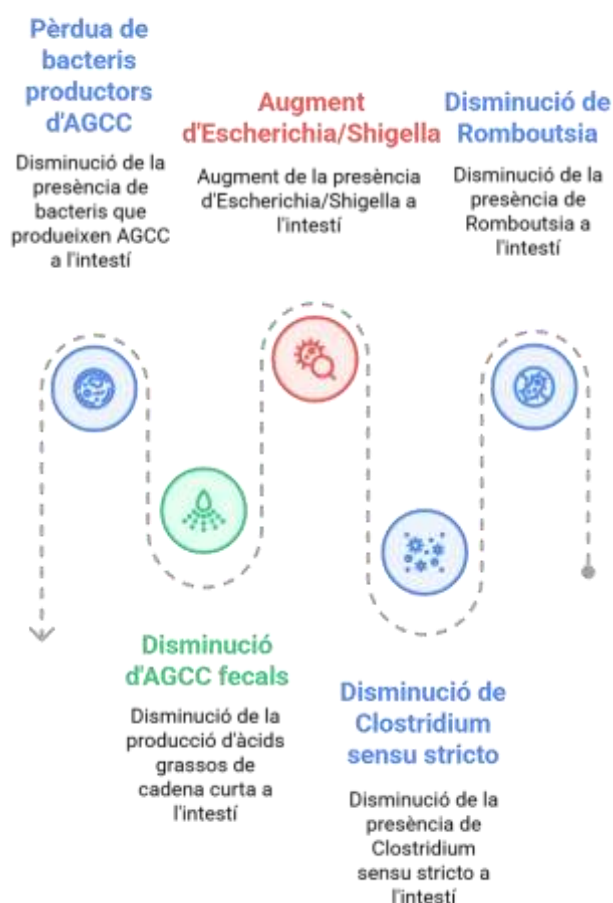
De manera global, els tres estudis descriuen un eix microbiota–AGCC–incretines en què s'observen:

- (1) una associació entre la disbiosi intestinal i la reducció dels AGCC, especialment de l'àcid acètic, observada en la DM2 però no en les fases inicials de disglucèmia;
- (2) una recuperació parcial de la secreció d'incretines i de la integritat intestinal després de la CB; i
- (3) una coexistència de modificacions microbianes i hormonals en diferents contextos metabòlics i tipus de cirurgia.

En conjunt, els resultats mostren patrons coincidents de modificació de la microbiota intestinal, dels seus metabòlits i de la resposta incretínica al llarg del continu metabòlic analitzat.

A la Figura 3 es representa de manera esquemàtica la integració dels resultats obtinguts en els tres estudis inclosos en aquesta tesi, mostrant els principals patrons comuns en la relació entre la microbiota intestinal, els AGCC i la resposta incretínica al llarg del continu metabòlic i després de la cirurgia metabòlica.

A. Canvis en la microbiota intestinal en la disglucèmia



B. Remodelació de la microbiota i resposta incretínica després del RYGB en pacients amb DM2



C. Gastrectomia tubular — Resposta microbiana, metabòlica i hormonal segons la resistència a la insulina.

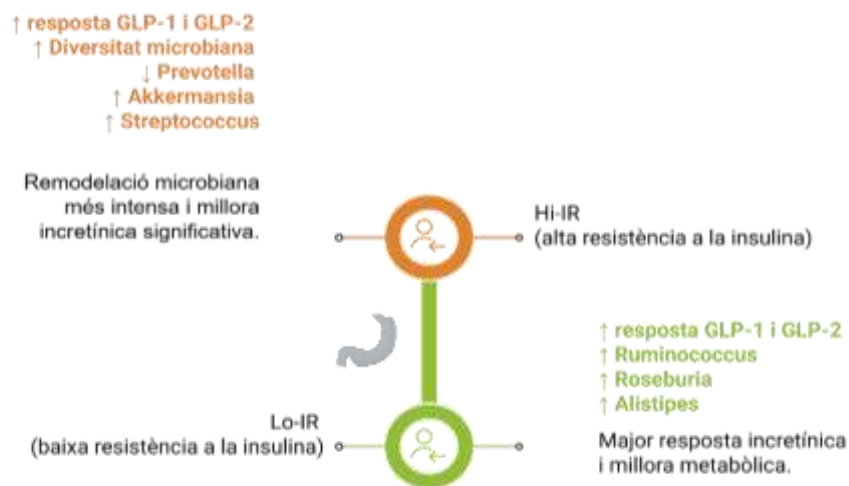


Figura 3. Relació integrada entre microbiota i resposta incretínica al llarg del continu metabòlic i en els models quirúrgics metabòlics.

(A) Disglucèmia progressiva: reducció dels AGCC fecals i disbiosi intestinal associada a la disfunció glucèmica. (B) Bypass gàstric: millora metabòlica i hormonal amb remodelació de la microbiota. (C) Gastrectomia vertical: resposta incretínica en ambdós grups de RI amb diferent perfil microbiano-metabòlic. *Figura elaborada per l'autora amb Napkin.*

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

L'obesitat i la DM2 representen dos dels principals reptes de salut pública del segle XXI, tant per la seva elevada prevalença com per l'impacte que tenen en la morbiditat i la mortalitat cardiovascular (13,95). La seva fisiopatologia és complexa i multifactorial, resultat de la interacció entre factors genètics, ambientals, metabòlics i immunoinflamatoris. En els darrers anys, la MI ha emergit com un element clau en aquesta xarxa d'interrelacions, actuant com a modulador del metabolisme energètic, de la inflamació de baix grau i de la sensibilitat a la insulina (33,36).

Els avenços en la metagenòmica i en la metabolòmica han permès establir que la disbiosi intestinal —caracteritzada per la pèrdua de diversitat microbiana, la reducció de bacteris fermentadors beneficiosos i l'expansió de taxons proinflamatoris— contribueix al desenvolupament de la RI, la intolerància a la glucosa i la DM2 (75,78,81). A més, els metabòlits bacterians, en particular els AGCC com l'acetat el propionat i el butirat, exerceixen un paper central en la comunicació entre la microbiota i l'hoste, ja que modulen la secreció d'incretines, la gluconeogènesi hepàtica i la integritat de la barrera intestinal (40,96,97).

En aquest context, la CB i metabòlica constitueix un model clínic idoni per explorar la relació entre la microbiota intestinal, els seus metabòlits i la resposta hormonal. Intervencions com el BPG o la SG provoquen profunds canvis anatòmics i fisiològics que es tradueixen en millores ràpides de la glucoregulació, sovint abans de la pèrdua ponderal substancial, la qual cosa suggereix mecanismes addicionals més enllà de la restricció calòrica (98,99). Entre aquests mecanismes, destaquen la remodelació de la MI, l'augment de la secreció d'incretines (GLP-1, GLP-2, PYY) i la modulació dels àcids biliars, que en conjunt configuren l'eix microbiota-intestí-metabolisme (80,100,101).

Aquesta tesi doctoral, estructurada en tres estudis originals, ha abordat de manera integrada aquest eix fisiopatològic. El primer estudi va caracteritzar les alteracions de la microbiota i dels AGCC fecals al llarg del continu glucèmic en una cohort poblacional mediterrània; el segon va analitzar la remodelació microbiana i hormonal després del BPG en pacients amb DM2 i el tercer va explorar la relació entre la RI i la resposta incretínica i microbiana després de la SG en pacients sense diabetis. En el seu conjunt, els resultats aporten una visió integrada i aprofundida dels mecanismes pels quals la MI i els seus metabòlits contribueixen a la interconnexió entre l'obesitat, la disfunció glucèmica i la recuperació metabòlica posterior a la CB.

Les seccions següents integren i discuteixen els resultats principals dels tres estudis, tot examinant-ne les implicacions fisiopatològiques i translacionals dins del marc conceptual de l'eix microbiota–AGCC–incretines.

6.1. Discussió general

L'obesitat i la DM2 comparteixen mecanismes fisiopatològics complexos en què la MI emergeix com un factor clau en la regulació del metabolisme energètic, la inflamació i la sensibilitat a la insulina. En aquesta tesi s'ha analitzat de manera integrada el paper de la MI i dels seus metabòlits —especialment els AGCC—, així com la seva interacció amb la resposta incretínica en diferents escenaris metabòlics, des de la normoglucèmia fins a la DM2, i com aquest eix microbiota-AGCC- incretines canvia després de la CB.

Els resultats dels tres estudis mostren un patró coherent de remodelació microbiana i hormonal intestinal associat tant a la disfunció glucèmica com a la seva reversió post quirúrgica. En el context de la disglucèmia, s'observa una reducció d'espècies productores d'AGCC (*Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto*) i un augment de bacteris oportunistes com *Escherichia/Shigella*, concordant amb el que han descrit altres cohorts en prediabetis i DM2 (78,102). Aquest patró s'associa a concentracions fecals més baixes d'acetat i propionat, fet que suggereix una activitat fermentadora colònica menys eficient i una producció reduïda d'AGCC, compostos clau en la regulació de la glucèmia i la integritat intestinal, com ja han apuntat altres estudis sobre el paper protector dels SCFA en la homeòstasi de la glucosa (51,97).

Després del BPG, es produeix una restauració parcial de l'eix microbiota–incretines–metabolisme, amb un augment de la secreció de GLP-1 i GLP-2 i una major abundància d'espècies com *Akkermansia muciniphila*, *Streptococcus* i *Veillonella*. Aquests canvis, descrits també per Palleja et al. i Fouladi et al. (103,104), s'han vinculat a una millor integritat intestinal i a la potenciació de la resposta incretínica, reforçant la idea que la CB actua més enllà de la pèrdua ponderal mitjançant mecanismes endocrins i microbials integrats (105).

Finalment, en pacients sense diabetis sotmesos a SG, el grau de RI es va relacionar amb diferències en la resposta incretínica i en la remodelació microbiana després de la cirurgia. Els individus amb menor RI, i per tant millor perfil metabòlic, van mostrar canvis més favorables metabòlicament con són una resposta més robusta de GLP-1 i GLP-2 i una associació amb tàxons beneficiosos com *Akkermansia*, *Roseburia* i *Ruminococcus*. Aquest patró és coherent amb el paper atribuït a aquests bacteris en la modulació de la

sensibilitat a la insulina i en la millora de la funció metabòlica (67,80). Els pacients amb major RI, en canvi, van presentar canvis més pronunciats en la composició de la microbiota, caracteritzats per una reducció de *Prevotella* —gènere sovint associat a inflamació de baix grau i endotoxèmia metabòlica— i un augment de la diversitat microbiana, tot i que amb una resposta incretínica més atenuada.

En conjunt, aquesta tesi aporta evidència sòlida sobre la interconnexió funcional entre la MI, els AGCC i les incretines, tant en la disfunció metabòlica com en la seva reversió postquirúrgica. Alhora, ofereix un enfocament integrador que analitza simultàniament aquests tres eixos fisiopatològics, contribuint a una comprensió més profunda de com la restauració d'un ecosistema intestinal saludable pot afavorir la millora de la resposta hormonal i del metabolisme glucèmic.

6.2. Discussió integrada dels resultats

6.2.1. Disbiosi intestinal i alteracions dels AGCC en estadis precoços de disfunció glucèmica

Aquest estudi va caracteritzar els canvis en la composició de la MI i en la producció d'AGCC al llarg del continu glucèmic —de la normogluccèmia a la preDM i la DM2— en una població adulta mediterrània.

Els resultats mostren una disbiosi progressiva amb pèrdua d'espècies productores d'AGCC (*Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto*) i augment de bacteris proinflamatoris com *Escherichia/Shigella*, en línia amb estudis previs en cohorts amb hipergluccèmia (78,102). Aquesta alteració s'associa amb una reducció significativa dels nivells fecals d'àcid acètic i amb una tendència a nivells més baixos de propiònic, confirmant el vincle descrit entre disbiosi, menor producció d'AGCC i un perfil metabòlic desfavorable en altres estudis poblacionals (106,107).

L'associació inversa entre l'àcid acètic fecal i el risc de DM2 suggereix un possible paper protector d'aquest metabòlit, atesa la seva acció antiinflamatòria i sensibilitzadora a la insulina (97,108). En canvi, l'associació positiva entre acetat fecal i preDM podria reflectir un estat metabòlic transicional, coherent amb estudis que proposen un paper dual dels SCFA segons el context metabòlic i el grau d'absorció colònica. Aquesta absorció depèn de diversos factors fisiològics, com el pH luminal, la integritat de la mucosa colònica i l'expressió de transportadors específics —MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*) i SMCT1 (*sodium-coupled monocarboxylate transporter 1*)—, els quals poden veure's

modulats per la inflamació, la dieta i la composició microbiana (109). Aquesta variabilitat en la biodisponibilitat dels AGCC podria contribuir a explicar les diferències observades entre àcids específics, com el propiònic, els nivells més elevats del qual es van associar en el nostre estudi amb un menor risc de preDM. Aquest resultat és coherent amb el treball de Chambers et al. (110), que descriu el propiònic com a modulador de la gluconeogènesi hepàtica i la sensibilitat a la insulina.

Pel que fa a la composició bacteriana, els pacients amb DM2 van presentar un increment d'*Escherichia/Shigella*, associat a major permeabilitat intestinal i endotoxèmia metabòlica (111), mentre que els gèneres productors d'acetat *Romboutsia* i *Clostridium* sensu stricto van mostrar una disminució lineal i significativa des de la normoglucèmia fins a la DM2, reforçant la hipòtesi que la pèrdua progressiva de productors d'AGCC contribueix al deteriorament del metabolisme glucídic (77,78). Paral·lelament, en la preDM es va observar un predomini transitori de Firmicutes i Alfaproteobacteria no classificats, suggerint que aquesta fase podria correspondre a un estat d'inestabilitat ecològica més que no pas a un punt intermedi lineal dins del continu metabòlic (102,112).

Tot i les limitacions inherents a la mida de la mostra i a l'avaluació dels SCFA exclusivament en femta, els resultats aporten evidència que la pèrdua de bacteris productors d'AGCC i la reducció de la seva activitat fermentadora constitueixen un dels primers esdeveniments associats a la disglucèmia. Aquestes troballes són coherents amb la hipòtesi plantejada per Cani et al. (100) i Rastelli et al. (36) sobre l'eix microbiota–AGCC–metabolisme com a modulador de la RI i la progressió cap a la DM2.

6.2.2. Remodelació microbiana, resposta incretínica i millora metabòlica després del bypass gàstric

Aquest estudi va avaluar l'impacte del BPG sobre la MI, la resposta incretínica i el perfil metabòlic en pacients amb DM2 al cap d'un any de la cirurgia. Els resultats van mostrar una millora metabòlica i hormonal significativa, en paral·lel a una pèrdua ponderal superior al 30% i a una elevada taxa de remissió de la diabetis.

Canvis hormona i metabòlics

Després de la cirurgia, es va observar una millora marcada del control glucèmic i lipídic, acompanyada d'un augment significatiu de la secreció de GLP-1 i GLP-2 durant el MMT, indicant una restauració funcional de l'eix enteroendocrí. Aquestes troballes

coincideixen amb el paper clau de les incretines en la millora del control metabòlic postbariàtric descrit per Jørgensen et al. i per Batterham i Cummings, i ajuden a explicar la millora clínica que experimenten els pacients amb diabetis quan se sotmeten a una cirurgia bariàtrica abans d'haver assolit una pèrdua de pes significativa(105,113). L'augment postprandial d'aquestes incretines s'ha vinculat a l'activació del "fre ileal" i a l'estimulació de les cèl·lules L intestinals, afavorida pel ràpid trànsit alimentari que comporta el BPG. Aquests mecanismes contribueixen a millorar la secreció d'insulina per acció del GLP-1 i a reforçar la integritat de la barrera intestinal mitjançant el GLP-2 (114,115).

Remodelació de la microbiota intestinal

El BPG va induir una remodelació profunda de la MI, amb increments d'espècies de les famílies Streptococcaceae, Akkermansiaceae, Rikenellaceae, Veillonellaceae i Enterobacteriaceae, i una reducció de Lachnospiraceae, Ruminococcaceae i Erysipelotrichaceae. Aquests canvis coincideixen amb els descrits per Pallega et al. (103) i Fouladi et al. (104), que van identificar un augment sostingut d'*Akkermansia muciniphila* i *Streptococcus* després del BPG. L'enriquiment d'aquests tàxons s'ha associat a una millor funció de la barrera intestinal i a una secreció incrementada d'incretines (67,80), mentre que la reducció de *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae* podria reflectir la menor exposició luminal a nutrients complexos derivada del nou circuit intestinal (116).

Associacions entre microbiota i resposta incretínica

La majoria d'espècies que van augmentar després del BPG van mostrar una correlació positiva amb l'AUC de GLP-1 i GLP-2, destacant *Clostridium perfringens* i *Roseburia sp.* 40_7, associades a una millor resposta incretínica i a una reducció de la massa grassa. Aquesta relació recolza el vincle funcional entre composició microbiana i secreció hormonal intestinal, en línia amb l'evidència que la microbiota pot modular les incretines mitjançant la generació d'àcids biliars secundaris i AGCC (117).

Permeabilitat intestinal i inflamació

Després de la cirurgia, es va observar una reducció significativa de la zonulina i del succinat plasmàtic, indicant una millora de la integritat intestinal i una disminució de la inflamació sistèmica. Aquests resultats concorden amb estudis previs que vinculen la reducció de zonulina post-BPG amb la restauració de la permeabilitat intestinal

(100,118). La IL-6 va mostrar una tendència descendent sense assolir significació, un patró ja observat en cohorts similars (119).

Predictors de remissió de la DM2

Entre les variables analitzades, només els nivells basals més elevats de pèptid C van predir la remissió completa de la DM2, en concordança amb altres estudis que identifiquen la reserva pancreàtica com a determinant principal de la recuperació metabòlica (120,121).

Síntesi

En conjunt, el BPG promou una interacció coordinada entre remodelació microbiana, millora de la permeabilitat intestinal i potenciació incretínica, contribuint a la normalització glucèmica i a la remissió de la DM2. Aquests resultats reforcen la hipòtesi que la CB indueix una reprogramació funcional de l'eix microbiota–incretines–metabolisme que, més enllà dels efectes derivats de la pèrdua ponderal, podria alhora contribuir a la millora del control glucèmic i a la remissió de la malaltia (104,116,122).

6.2.3. Relació de la resistència a la insulina amb la resposta incretínica i la remodelació microbiana després de la gastrectomia vertical

Aquest estudi va analitzar com el grau de RI es relaciona amb la resposta hormonal i la remodelació de la MI després de la SG en pacients amb obesitat sense diabetis.

Resultats basals i patrons de microbiota

Abans de la cirurgia, els pacients amb més RI mostraven una major abundància de *Prevotella spp.*, especialment *P. copri*, associada a la producció d'aminoàcids de cadena ramificada i a la disfunció metabòlica (81,82). En canvi, els pacients amb baixa RI presentaven un perfil enriquit en *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium* i *Dialister*, tàxons relacionats amb una millor integritat intestinal i estat metabòlic (67,123). Aquest patró diferencial suggereix que la composició basal de la MI pot reflectir el grau de sensibilitat metabòlica abans de la intervenció.

Resposta incretínica postprandial i modulació per la RI

Sis mesos després de la SG, la resposta incretínica va millorar en ambdós grups, però la magnitud del canvi va dependre del grau de RI. Els pacients Lo-IR van mostrar augments més pronunciats en el pic relatiu de GLP-1 i GLP-2, tot i que la millora també va ser present, encara que més moderada, en el grup Hi-IR. Aquesta diferència suggereix una “resistència incretínica funcional” en els individus amb RI elevada: concentracions basals elevades de GLP-1 amb una resposta postprandial atenuada, un fenomen descrit recentment com a paral·lel a la RI (124). Els increments de GLP-2, particularment en el grup Lo-IR, podrien reflectir un paper específic d’aquesta incretina en la restauració de la funció de la barrera intestinal després de la cirurgia, més que no pas en la regulació directa del pes corporal (125).

Canvis de microbiota després de la SG

La SG va induir modificacions diferenciades segons el grau de RI. En els pacients Hi-IR es van observar increments significatius de la riquesa i de la diversitat beta, amb reducció de *Prevotella* i *Bacteroides coprocola*, i augment d’*Akkermansia*, *Veillonella* i *Streptococcus*, patrons associats a una millor resposta incretínica i a una menor resposta inflamatòria (94,119). En canvi, els pacients Lo-IR van mantenir una microbiota més estable però amb increments d’espècies productores d’AGCC com *Roseburia*, *Ruminococcus* i *Alistipes*, coherents amb perfils metabòlicament saludables (126,127).

Associacions metabòliques i predicció de resposta ponderal

Els tàxons reduïts després de la cirurgia, principalment *Prevotella*, es van associar amb adipositat més elevada, inflamació i menor resposta incretínica, mentre que els que van augmentar (*Akkermansia*, *Clostridium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*) es van relacionar amb una millora dels paràmetres metabòlics i hormonals.

El model predictiu basat en la composició microbiana basal va mostrar una bona capacitat per anticipar la pèrdua de pes a cinc anys (AUC = 0,87), resultat que concorda amb estudis recents en pacients amb obesitat greu sotmesos a BPG (128) i en cohorts amb obesitat i DM2 tractades amb SG o BPG (129), que proposen la microbiota prequirúrgica com a marcador pronòstic de resposta a la CB.

Síntesi

En conjunt, la RI basal no només es relaciona, sinó que potser podria condicionar la magnitud de la resposta incretínica i la remodelació microbiana després de la CB tipus SG. Els pacients amb baixa RI presenten un perfil orientat a la producció d’AGCC i una

resposta hormonal més eficient, mentre que aquells amb alta RI mostren una reconfiguració més àmplia però funcionalment menys favorable. Aquestes troballes reforcen el concepte que la CB actua modulant l'eix microbiota–incretines–metabolisme, amb un impacte diferent segons el fenotip metabòlic de l'hoste.

6.2.4. Patrons comuns i interpretació mecanística

La integració dels tres estudis permet identificar patrons consistents de remodelació microbiana i de resposta incretínica al llarg del continu metabòlic, des de la disfunció glucèmica inicial fins a la millora metabòlica posterior a la CB. Tot i les diferències de disseny i de població —cohort poblacional en el primer estudi, pacients amb DM2 sotmesos a BPG en el segon i pacients amb obesitat sense diabetis sotmesos a SG en el tercer—, emergeixen tres eixos fisiopatològics comuns: (1) la pèrdua progressiva de bacteris productors d'AGCC en la disglucèmia, (2) la restauració parcial d'aquest perfil després de la CB, i (3) la relació entre la MI i la secreció d'incretines.

Aquests elements s'integren en un model fisiopatològic comú que connecta la microbiota intestinal, els AGCC i la resposta incretínica al llarg del continu metabòlic, des de la disfunció glucèmica fins a la recuperació postquirúrgica (Figura 4).

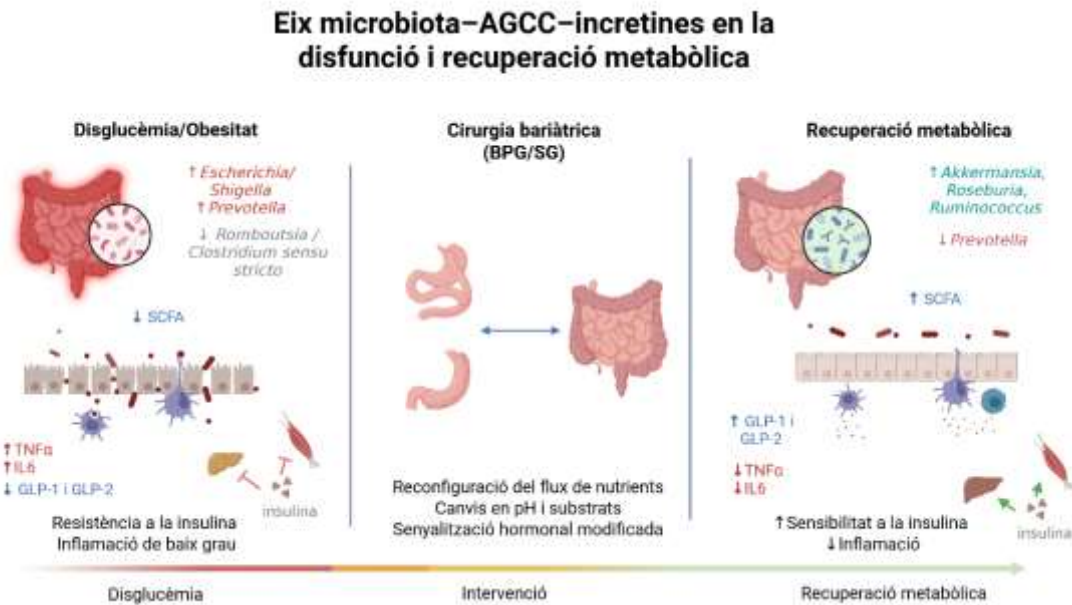


Figura 4. La interacció entre la microbiota intestinal, el metabolisme dels AGCC i la resposta incretínica emergeix com un eix fisiopatològic comú que enllaça l'obesitat, la disglucèmia i la recuperació metabòlica postquirúrgica, més enllà dels efectes derivats de la pèrdua ponderal. *Figura adaptada per l'autora a partir d'una plantilla de BioRender.com.*

6.3. Síntesi final i implicacions del conjunt d'estudis

Els resultats d'aquesta tesi doctoral ofereixen una visió global i integradora del paper de la MI i dels seus metabòlits en la regulació metabòlica i hormonal associada a la RI, la preDM i la DM2, així com de la seva modulació després de la CB. En conjunt, els tres estudis presentats contribueixen a definir un model fisiopatològic coherent que connecta la disbiosi intestinal, la producció d'AGCC i la resposta incretínica dins d'un mateix eix funcional microbiota-intestí-metabolisme, d'acord amb la hipòtesi que la MI actua com un òrgan metabòlic capaç d'influir directament en la homeòstasi energètica i glucèmica de l'hoste (100).

En primer lloc, l'estudi de la cohort [Di@bet.es](https://www.bet.es) va permetre caracteritzar per primera vegada en una població mediterrània els patrons de disbiosi i les alteracions dels AGCC fecals associats a la disglucèmia. Es va observar una disminució progressiva d'espècies productores d'acetat com *Romboutsia* i *Clostridium sensu stricto*, juntament amb una reducció dels nivells fecals d'àcid acètic i un augment d'espècies proinflamatòries com *Escherichia/Shigella*. Aquest patró suggereix que la transició des de la normoglucèmia cap a la DM2 implica una pèrdua gradual de la capacitat fermentativa de la MI i una

menor generació de senyals metabòlics beneficiosos derivats dels AGCC. Aquests resultats concorden amb estudis previs que vinculen la reducció dels AGCC i la disbiosi intestinal amb la RI i la inflamació sistèmica de baix grau, consolidant el paper dels AGCC com a mediadors clau en la regulació de la glucèmia.

En segon lloc, l'estudi en pacients amb DM2 sotmesos a BPG va demostrar que la CB no només actua com una intervenció de pèrdua ponderal, sinó també com un model de restauració funcional de l'eix microbiota–incretines. L'augment significatiu de la secreció postprandial de GLP-1 i GLP-2 va coincidir amb profunds canvis en la composició bacteriana, incloent l'enriquiment d'espècies de les famílies *Streptococcaceae*, *Akkermansiaceae* i *Rikenellaceae*, i la reducció de *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae*. Diversos d'aquests tàxons van correlacionar-se positivament amb la resposta incretínica i negativament amb marcadors d'adipositat i glucèmia, suggerint que la millora metabòlica posterior al BPG depèn en part de la reestructuració de la MI i del reforç de la comunicació intestí–pàncrees. Aquestes troballes són coherents amb estudis recents que descriuen una sinergia entre els canvis anatòmics de la cirurgia i la modulació microbiana com a mecanismes clau per a la remissió de la DM2 (99).

Finalment, l'estudi en pacients amb obesitat sense DM2 sotmesos a SG va evidenciar que el grau de RI s'associa tant amb la resposta hormonal com amb la remodelació microbiana després de la cirurgia. Els pacients amb baixa RI van presentar una resposta postprandial més intensa de GLP-1 i GLP-2 i millores metabòliques més pronunciades, mentre que els pacients amb pitjor perfil metabòlic i amb alta RI van mostrar una major reconfiguració del microbioma, amb increments d'*Akkermansia*, *Veillonella* i *Streptococcus* i una marcada reducció de *Prevotella*. Aquestes observacions apunten a una interacció bidireccional entre la microbiota i la sensibilitat a la insulina, i suggereixen que la CB pot revertir parcialment la disbiosi, tot i que la magnitud de la resposta hormonal podria dependre del fenotip metabòlic previ.

Els treballs realitzats en pacients sotmesos a CB, tant amb com sense DM2, amplien el coneixement sobre la remodelació de la resposta metabòlica i inflamatòria que té lloc després de la intervenció. Aquests estudis integren l'anàlisi dels canvis en la resposta incretínica, en la MI i en els paràmetres metabòlics en cohorts diferenciades segons l'estat glucèmic, un enfocament poc explorat fins ara, ja que la majoria de treballs previs s'han centrat exclusivament en pacients amb DM2. Aquest abordatge global permet connectar observacions prèvies aïllades sobre la funció incretínica i la microbiota, oferint una visió més completa dels mecanismes que vinculen la salut intestinal amb la regulació metabòlica.

La integració dels tres estudis permet delinear un model unificat en què la disbiosi intestinal i la pèrdua de productors d'AGCC contribueixen al desenvolupament de la RI, mentre que la CB —tant el BPG com la SG— actua com a modulador de la MI i de la resposta incretínica, facilitant la restauració de l'homeòstasi metabòlica. D'aquesta manera, la MI emergeix com un actor actiu i potencialment modificable en la fisiopatologia i el tractament de les malalties metabòliques.

Cal reconèixer algunes limitacions comunes als tres estudis: la mida de les mostres, pròpia d'estudis fisiopatològics, pot limitar la generalització dels resultats, i les anàlisis basades en mostres fecals no capten del tot la interacció mucosa-microbiota. A més, la manca de dades metabòliques circulants complementàries (com els AGCC plasmàtics) i d'informació dietètica longitudinal restringeix la interpretació mecanística. Tanmateix, la consistència dels patrons observats en poblacions diferents i amb metodologies complementàries reforça la solidesa de les conclusions.

En conjunt, aquesta tesi aporta una comprensió més integrada dels mecanismes que vinculen la MI amb la regulació metabòlica i hormonal en la RI, la preDM i la DM2, i destaca la CB com un model idoni per estudiar la reversibilitat d'aquests processos. Els resultats obtinguts estableixen una base sòlida per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques dirigides a modular la MI o els seus metabòlits com a via per millorar la sensibilitat a la insulina, el control glucèmic i la prevenció de la progressió cap a la DM2.

7. CONCLUSIONS

1. La microbiota intestinal presenta alteracions característiques ja en la prediabetis, reflectint un paper clau en la disfunció metabòlica primerenca.
2. Els perfils d'àcids grassos de cadena curta, especialment l'acetat i el butirat, mostren relacions diferencials amb l'estat glucèmic i podrien constituir biomarcadors metabòlics inicials.
3. La cirurgia bariàtrica remodela profundament la microbiota intestinal i afavoreix la recuperació de la resposta incretínica, promovent la restauració de la sensibilitat a la insulina.
4. La resistència a la insulina preoperatòria es relaciona, i podria condicionar, la magnitud dels canvis microbians i hormonals després de la cirurgia, modulant els resultats metabòlics.

8. LÍNIES FUTURES D'INVESTIGACIÓ

Els resultats obtinguts en aquesta tesi aporten noves evidències sobre el paper de la MI, els AGCC i la resposta incretínica en la regulació metabòlica i en la millora observada després de la CB. Tanmateix, obren múltiples vies per a futures línies de recerca que permetin confirmar les relacions causals i aprofundir en els mecanismes subjacents a aquests fenòmens.

- Confirmar la rellevància causal dels AGCC en la disglucèmia.
Es requereixen estudis longitudinals i mecanístics que integrin determinacions fecals i plasmàtiques d'AGCC per dilucidar fins a quin punt les variacions en la seva producció i absorció contribueixen directament al desenvolupament o reversió de la RI i la preDM.
- Explorar el paper fisiològic de l'àcid acètic i propiònic segons l'estadi metabòlic.
L'associació paradoxal observada entre l'acetat fecal i el risc de prediabetis, així com el possible efecte protector del propiònic, requereixen estudis que avaluin la seva funció diferenciada en fases inicials i avançades de disfunció glucèmica.
- Ampliar l'abast poblacional i les dades contextuais.
Calen cohorts més grans i multicèntriques que permetin validar les troballes en poblacions no mediterrànies i integrar informació dietètica, farmacològica i genètica detallada per identificar factors moduladors de la relació microbiota–metabolisme.
- Analitzar la relació causal entre els canvis de la microbiota i la resposta incretínica després del BPG.
Futurs estudis haurien de determinar si la remodelació microbiana observada després del BPG participa activament en la millora/recuperació de la secreció de GLP-1 i GLP-2 o si representa un efecte secundari del canvi anatòmic i metabòlic.
- Integrar enfocaments multiòmics per desxifrar mecanismes funcionals.
La combinació de dades metagenòmiques, transcriptòmiques, metabolòmiques i proteòmiques podria permetre identificar vies específiques de comunicació microbiota–intestí–metabolisme i noves dianes terapèutiques.
- Estudiar la variabilitat interindividual i el paper de la RI.
La diferent resposta microbiana i incretínica observada segons el grau de RI suggereix la necessitat de dissenyar estudis estratificats per fenotip metabòlic i de valorar la “resistència incretínica” com a nou concepte fisiopatològic.
- Comparar l'impacte de diferents tècniques quirúrgiques bariàtriques.

Estudis comparatius entre SG, BPG i altres procediments podrien ajudar a identificar quins patrons de remodelació microbiana i secreció hormonal són comuns o específics de cada tècnica.

- Desenvolupar estratègies no quirúrgiques dirigides a l'eix microbiota–AGCC–incretines.

La validació del paper metabòlic dels AGCC i de determinats tàxons com *Akkermansia muciniphila*, *Roseburia* o *Ruminococcus* obre la possibilitat de dissenyar intervencions nutricionals, prebiòtiques o probiòtiques encaminades a reproduir els beneficis metabòlics de la cirurgia.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Guía Española GIRO [Internet]. Madrid: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO); [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.seedo.es/index.php/guia-giro>
2. Powis J, Thompson R, Jackson-Leach R. Source information compiled by Tim Lobstein [Internet]. World Obesity Federation; 2025 [cited 2025 Oct 28]. Available from: <https://www.worldobesity.org>
3. World Health Organization. *European Regional Obesity Report 2022* [Internet]. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022 [cited 2025 Oct 28]. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>
4. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005 Nov 5;366(9497):1640–9.
5. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol*. 2016;231(3):R77–99.
6. Cinti S. Adipose organ development and remodeling. *Compr Physiol*. 2018;8(4):1357–431.
7. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ. The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;323(1):20–34.
8. Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and obesity: potential link to metabolic disorders and chronic complications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10):3570.
9. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJF, et al. Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:29.
10. Lee YC, Christensen JJ, Parnell LD, Smith CE, Shao J, McKeown NM, et al. Using machine learning to predict obesity based on genome-wide and epigenome-wide gene–gene and gene–diet interactions. *Front Genet*. 2022;12:820890.
11. Ling C, Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2019;29(5):1028–44.
12. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflamm Res*. 2021;70(1):29–49.
13. Ong KL, Stafford LK, McLaughlin SA, Boyko EJ, Vollset SE, Smith AE, et al. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of

- Disease Study 2021. *Lancet* [Internet]. 2023 Jul;402(10397):203–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673623013016>
14. International Diabetes Federation. *Atlas IDF de la Diabète*. 11a ed. Brussel·les: International Diabetes Federation; 2025 [Internet]. Disponible a: <https://www.diabetesatlas.org>
 15. Rojo-Martínez G, Valdés S, Soriguer F, Vendrell J, Urrutia I, Pérez V, et al. Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1):18422.
 16. Shah MU, Roebuck A, Srinivasan B, Ward JK, Squires PE, Hills CE, et al. Diagnosis and management of type 2 diabetes mellitus in patients with ischaemic heart disease and acute coronary syndromes: a review of evidence and recommendations. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1390956.
 17. Młynarska E, Czarnik W, Dzieża N, Jędraszak W, Majchrowicz G, Prusinowski F, et al. Type 2 diabetes mellitus: new pathogenetic mechanisms, treatment and the most important complications. *Int J Mol Sci*. 2025;26(4):11200.
 18. Janani S. Impact of type 2 diabetes mellitus on health-related quality of life among patients from a tertiary care hospital in southern India. *Afr J Biomed Res*. 2024 Nov 19;27(4):1857–62.
 19. Yazbeck AS, Nguyen SN, Escobar ML. How health systems worldwide fail type 2 diabetics. *Health Syst Reform*. 2025;11(1):2345987.
 20. Ruze R, Liu T, Zou X, Song J, Chen Y, Xu R, et al. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1210958.
 21. Barber TM, Kyrou I, Randeva HS, Weickert MO. Mechanisms of insulin resistance at the crossroad of obesity with associated metabolic abnormalities and cognitive dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):968.
 22. Lee HY, Lee GH, Yoon Y, Hoang TH, Chae HJ. IRE1 α post-translational modifications and ER stress in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*. 2022;14(1):91.
 23. Fang J, Li L, Cao X, Yue H, Fu W, Chen Y, et al. Transmissible endoplasmic reticulum stress mediated by extracellular vesicles from adipocytes promoting the senescence of adipose-derived mesenchymal stem cells in hypertrophic obesity. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:1467952.
 24. Ciesielska K, Gajewska M. Fatty acids as potent modulators of autophagy activity in white adipose tissue. *Biomolecules*. 2023;13(1):48.

25. Esser N, Utzschneider KM, Kahn SE. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. *Diabetologia*. 2020;63(10):2007
26. Ramalingam L, Sopontammarak B, Menikdiwela KR, Moustaid-Moussa N. Endoplasmic reticulum (ER) stress in part mediates effects of angiotensin II in pancreatic beta cells. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:2843–53.
27. Li X, Wu Y, Song Y, Ding N, Lu M, Jia L, et al. Activation of NF- κ B-inducing kinase in islet β cells causes β cell failure and diabetes. *Mol Ther*. 2020;28(11):2430–41.
28. Dludla PV, Mabhida SE, Ziqubu K, Nkambule BB, Mazibuko-Mbeje SE, Hanser S, et al. Pancreatic β -cell dysfunction in type 2 diabetes: implications of inflammation and oxidative stress. *World J Diabetes*. 2023;14(3):130–46.
29. Inaishi J, Saisho Y. Beta-cell mass in obesity and type 2 diabetes, and its relation to pancreas fat: a mini-review. *Nutrients*. 2020;12(12):3846.
30. Abel ED, Gloyn AL, Evans-Molina C, Joseph JJ, Misra S, Pajvani UB, et al. Diabetes mellitus—progress and opportunities in the evolving epidemic. *Cell*. 2024;187(17):3789–820.
31. Bock PM, Martins AF, Schaan BD. Understanding how pre- and probiotics affect the gut microbiome and metabolic health. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2024;326(1):E89–102.
32. Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, Lopetuso LR, Scaldaferri F. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med*. 2024;19(2):275–93.
33. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr*. 2018;57(1):1–24.
34. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [Internet]. *Science*. 2005;308(5728):1635–8. Available from: <https://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1110591/DC1>
35. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220–30.
36. Rastelli M, Cani PD, Knauf C. The gut microbiome influences host endocrine functions. *Endocr Rev*. 2019;40(5):1271–84.
37. Meyer RK, Duca FA. Endocrine regulation of metabolic homeostasis via the intestine and gut microbiome. *J Endocrinol*. 2023;258(3):R1–16.
38. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol*. 2014;28(8):1221–38.

39. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018;361:k2179.
40. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*. 2016;7:185.
41. Morrison DJ, Preston T. Formation of short-chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016;7(3):189–200.
42. Liu M, Lu Y, Xue G, Han L, Jia H, Wang Z, et al. Role of short-chain fatty acids in host physiology. *Anim Models Exp Med*. 2024;7(1):1–17.
43. Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G, et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes*. 2020;11(5):411–55.
44. Mayorga-Ramos A, Barba-Ostria C, Simancas-Racines D, Guamán LP. Protective role of butyrate in obesity and diabetes: new insights. *Front Nutr*. 2022;9:956021.
45. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, et al. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(25):10643–8.
46. Christiansen CB, Buur M, Gabe N, Svendsen B, Dragsted LO, Rosenkilde MM, et al. The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2018;315(1):G53–65. Available from: <http://www.ajpgi.org>
47. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*. 2014;156(1–2):84–96.
48. Zhong C, Dai Z, Chai L, Wu L, Li J, Guo W, et al. The change of gut microbiota-derived short-chain fatty acids in diabetic kidney disease. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(12):e24063.
49. Li J, Li Y, Zhang S, Wang C, Mao Z, Huo W, et al. Association of short-chain fatty acid levels and dietary quality with type 2 diabetes: a case-control study based on the Henan Rural Cohort. *Br J Nutr*. 2024;131(10):1668–77.
50. Llauradó G, Cedó L, Climent E, Badia J, Rojo-Martínez G, Flores-Le Roux J, et al. Circulating short-chain fatty acids and Mediterranean food patterns: a potential role for the prediction of type 2 diabetes risk—The Di@bet.es Study. *BMC Med*. 2025;23(1):412.
51. Seethaler B, Nguyen NK, Basrai M, Kiechle M, Walter J, Delzenne NM, et al. Short-chain fatty acids are key mediators of the favorable effects of the Mediterranean

- diet on intestinal barrier integrity: data from the randomized controlled LIBRE trial. *Am J Clin Nutr.* 2022;116(4):928–42.
52. Cani PD. Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Suppl 4):50–3.
 53. Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Benef Microbes.* 2014;5(1):3–17.
 54. Caricilli AM, Saad MJA. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients.* 2013;5(3):829–51.
 55. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med.* 2011;3(9):559–72.
 56. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008;57(6):1470–81.
 57. Chao J, Coleman RA, Keating DJ, Martin AM. Gut microbiome regulation of gut hormone secretion. *Endocrinology.* 2025;166(2):bqae010.
 58. Wachsmuth HR, Weninger SN, Duca FA. Role of the gut–brain axis in energy and glucose metabolism. *Exp Mol Med.* 2022;54(3):377–92.
 59. Holst JJ, Madsbad S. Mechanisms of surgical control of type 2 diabetes: GLP-1 is key factor. *Surg Obes Relat Dis.* 2016;12(6):1236–42.
 60. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, Jeffery IB, La Stora A, Laghi L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut.* 2016;65(11):1812–21.
 61. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027–31.
 62. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [Internet]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718–23. Available from: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0407076101>
 63. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761–72.

64. Roopchand DE, Carmody RN, Kuhn P, Moskal K, Rojas-Silva P, Turnbaugh PJ, et al. Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes*. 2015;64(8):2847–58.
65. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022–3.
66. Zhou Q, Zhang Y, Wang X, Yang R, Zhu X, Zhang Y, et al. Gut bacteria *Akkermansia* is associated with reduced risk of obesity: evidence from the American Gut Project. *Nutr Metab (Lond)*. 2020;17(1):90.
67. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):9066–71.
68. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*. 2014;159(4):789–99.
69. Wang J, Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55–60.
70. Blaak EE, Goossens GH. Metabolic phenotyping in people living with obesity: implications for dietary prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2023;24(3):341–52.
71. Moran-Ramos S, Cerqueda-García D, López-Contreras B, Larrieta-Carrasco E, Villamil-Ramírez H, Molina-Cruz S, et al. A metagenomic study identifies a *Prevotella copri* enriched microbial profile associated with non-alcoholic steatohepatitis in subjects with obesity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2023;38(5):791–9.
72. Lee HK, Kim NE, Shin CM, Oh TJ, Yoon H, Park YS, et al. Gut microbiome signature of metabolically healthy obese individuals according to anthropometric, metabolic and inflammatory parameters. *Sci Rep*. 2024;14(1):21345.
73. Muñoz-Garach A, Diaz-Perdigones C, Tinahones FJ. Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol Nutr*. 2016;63(10):560–8.
74. Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(10):654–72.
75. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99–103.
76. Zhao L, Lou H, Peng Y, Chen S, Zhang Y, Li X. Comprehensive relationships between gut microbiome and faecal metabolome in individuals with type 2 diabetes and its complications. *Endocrine*. 2019;66(3):526–37.

77. Gaike AH, Paul D, Bhute S, Dhotre DP, Pande P, Upadhyaya S, et al. The gut microbial diversity of newly diagnosed diabetics but not of prediabetics is significantly different from that of healthy nondiabetics. *mSystems*. 2020;5(2):e00017-20.
78. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*. 2018;61(4):810–20.
79. Li J, Yang G, Zhang Q, Liu Z, Jiang X, Xin Y. Function of *Akkermansia muciniphila* in type 2 diabetes and related diseases. *Front Microbiol*. 2023;14:1119486.
80. Yoon HS, Cho CH, Yun MS, Jang SJ, You HJ, Kim JH, et al. *Akkermansia muciniphila* secretes a glucagon-like peptide-1-inducing protein that improves glucose homeostasis and ameliorates metabolic disease in mice. *Nat Microbiol*. 2021;6(5):563–73.
81. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, Hyötyläinen T, Nielsen T, Jensen BAH, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*. 2016;535(7612):376–81.
82. Abdelsalam NA, Hegazy SM, Aziz RK. The curious case of *Prevotella copri*. *Gut Microbes*. 2023;15(1):2222351.
83. Liu R, Hong J, Xu X, Feng Q, Zhang D, Gu Y, et al. Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nat Med*. 2017;23(7):859–68.
84. Baars DP, Fondevila MF, Meijnikman AS, Nieuwdorp M. The central role of the gut microbiota in the pathophysiology and management of type 2 diabetes. *Cell Host Microbe*. 2024;32(9):1280–300.
85. Abbatini F, Rizzello M, Casella G, Alessandri G, Capoccia D, Leonetti F, et al. Long-term effects of laparoscopic sleeve gastrectomy, gastric bypass, and adjustable gastric banding on type 2 diabetes. *Surg Endosc*. 2010;24(5):1005–10.
86. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Aminian A, Brethauer SA, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes: 5-year outcomes. *N Engl J Med*. 2017;376(7):641–51.
87. Fazliana M, Nor Hanipah Z. Mechanisms and outcomes of metabolic surgery in type 2 diabetes. *Metabolites*. 2022;12(10):958.
88. Koliaki C, Liatis S, le Roux CW, Kokkinos A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocr Disord*. 2017;17(1):50.
89. Kashyap SR, Bhatt DL, Wolski K, Watanabe RM, Abdul-Ghani M, Abood B, et al. Metabolic effects of bariatric surgery in patients with moderate obesity and type 2

- diabetes: analysis of a randomized control trial comparing surgery with intensive medical treatment. *Diabetes Care*. 2013;36(8):2175–82.
90. Gill RS, Karmali S, Sharma AM. Treating type 2 diabetes mellitus with sleeve gastrectomy in obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(4):701–2.
91. Romero F, Nicolau J, Flores L, Casamitjana R, Ibarzabal A, Lacy A, et al. Comparable early changes in gastrointestinal hormones after sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass surgery for morbidly obese type 2 diabetic subjects. *Surg Endosc*. 2012;26(8):2231–9.
92. Hamamah S, Hajnal A, Covasa M. Influence of bariatric surgery on gut microbiota composition and its implication on brain and peripheral targets. *Nutrients*. 2024;16(2):417.
93. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010;59(12):3049–57.
94. Ikeda T, Aida M, Yoshida Y, Matsumoto S, Tanaka M, Nakayama J, et al. Alteration in faecal bile acids, gut microbial composition and diversity after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Br J Surg*. 2020;107(12):1673–85.
95. Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. *IDF Diabetes Atlas*. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2021.
96. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332–45.
97. Mariño E, Richards JL, McLeod KH, Stanley D, Yap YA, Knight J, et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol*. 2017;18(5):552–62.
98. Pucci A, Batterham RL. Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. *J Endocrinol Invest*. 2019;42(2):117–28.
99. Xu G, Song M. Recent advances in the mechanisms underlying the beneficial effects of bariatric and metabolic surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2021;17(2):231–8.
100. Cani PD, Possemiers S, Van De Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091–103.

101. Anhê FF, Zlitni S, Zhang SY, Choi BSY, Chen CY, Foley KP, et al. Human gut microbiota after bariatric surgery alters intestinal morphology and glucose absorption in mice independently of obesity. *Gut*. 2023;72(3):460–71.
102. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, et al. The gut microbiota in prediabetes and diabetes: a population-based cross-sectional study. *Cell Metab*. 2020;32(3):379–90.e3.
103. Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med*. 2016;8(1):67.
104. Fouladi F, Carroll IM, Sharpton TJ, Bulik-Sullivan E, Heinberg L, Steffen KJ, et al. A microbial signature following bariatric surgery is robustly consistent across multiple cohorts. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1999411.
105. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care*. 2016;39(6):893–901.
106. Zhong H, Ren H, Lu Y, Fang C, Hou G, Yang Z, et al. Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. *EBioMedicine*. 2019;47:373–83.
107. Lyu L, Fan Y, Vogt JK, Clos-Garcia M, Bonnefond A, Pedersen HK, et al. The dynamics of the gut microbiota in prediabetes during a four-year follow-up among European patients—an IMI-DIRECT prospective study. *Genome Med*. 2025;17(1):188.
108. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009;58(7):1509–17.
109. Wijdeveld M, Schranter A, Hagemeijer A, Nederveen AJ, Scheithauer TPM, Levels JHM, et al. Intestinal acetate and butyrate availability is associated with glucose metabolism in healthy individuals. *iScience*. 2023;26(12):108211.
90. Gill RS, Karmali S, Sharma AM. Treating type 2 diabetes mellitus with sleeve gastrectomy in obese patients. Vol. 19, Obesity. 2011. p. 701–2.
91. Romero F, Nicolau J, Flores L, Casamitjana R, Ibarzabal A, Lacy A, et al. Comparable early changes in gastrointestinal hormones after Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass surgery for morbidly obese type 2 diabetic subjects. Vol. 26, Surgical Endoscopy. Springer New York LLC; 2012. p. 2231–9.

92. Hamamah S, Hajnal A, Covasa M. Influence of Bariatric Surgery on Gut Microbiota Composition and Its Implication on Brain and Peripheral Targets. Vol. 16, *Nutrients*. 2024.
93. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: Links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3049–57.
94. Ikeda T, Aida M, Yoshida Y, Matsumoto S, Tanaka M, Nakayama J, et al. Alteration in faecal bile acids, gut microbial composition and diversity after laparoscopic sleeve gastrectomy. *British Journal of Surgery*. 2020 Nov 1;107(12):1673–85.
95. Magliano DJ, Boyko EJ. F Diabetes Atlas 10th edition scientific committee . IDF DIABETES ATLAS. 10th ed. 2021.
96. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Vol. 165, *Cell*. Cell Press; 2016. p. 1332–45.
97. Mariño E, Richards JL, McLeod KH, Stanley D, Yap YA, Knight J, et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nat Immunol*. 2017 Apr 18;18(5):552–62.
98. Pucci A, Batterham RL. Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. Vol. 42, *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer International Publishing; 2019. p. 117–28.
99. Xu G, Song M. Recent advances in the mechanisms underlying the beneficial effects of bariatric and metabolic surgery. Vol. 17, *Surgery for Obesity and Related Diseases*. Elsevier Inc.; 2021. p. 231–8.
100. Cani PD, Possemiers S, Van De Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009 Aug;58(8):1091–103.
101. Anhê FF, Zlitni S, Zhang SY, Choi BSY, Chen CY, Foley KP, et al. Human gut microbiota after bariatric surgery alters intestinal morphology and glucose absorption in mice independently of obesity. *Gut*. 2023 Mar 1;72(3):460–71.

102. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, Lundqvist A, Olsson LM, Krämer M, et al. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab.* 2020 Sep 1;32(3):379-390.e3.
103. Palleja A, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, Zhang C, Li Y, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery of morbidly obese patients induces swift and persistent changes of the individual gut microbiota. *Genome Med.* 2016 Jun 15;8(1).
104. Fouladi F, Carroll IM, Sharpton TJ, Bulik-Sullivan E, Heinberg L, Steffen KJ, et al. A microbial signature following bariatric surgery is robustly consistent across multiple cohorts. *Gut Microbes.* 2021;13(1).
105. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care.* 2016 Jun 1;39(6):893–901.
106. Zhong H, Ren H, Lu Y, Fang C, Hou G, Yang Z, et al. Distinct gut metagenomics and metaproteomics signatures in prediabetics and treatment-naïve type 2 diabetics. *EBioMedicine.* 2019 Sep 1;47:373–83.
107. Lyu L, Fan Y, Vogt JK, Clos-Garcia M, Bonnefond A, Pedersen HK, et al. The dynamics of the gut microbiota in prediabetes during a four-year follow-up among European patients—an IMI-DIRECT prospective study. *Genome Med.* 2025 Dec 1;17(1).
108. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes.* 2009 Jul;58(7):1509–17.
109. Wijdeveld M, Schranter A, Hagemeijer A, Nederveen AJ, Scheithauer TPM, Levels JHM, et al. Intestinal acetate and butyrate availability is associated with glucose metabolism in healthy individuals. *iScience.* 2023 Dec 15;26(12).
110. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SEK, et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut.* 2015;64(11):1744–54.
111. Almaguad BS, Liu Y, Chen SM, Wang CH, Shao CY, Ren BW, et al. Alterations of gut microbiota in type 2 diabetes individuals and the confounding effect of antidiabetic agents. *J Diabetes Res.* 2020;2020:7253791.
112. Letchumanan G, Abdullah N, Marlini M, Baharom N, Lawley B, Omar MR, et al. Gut microbiota composition in prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes:

- a systematic review of observational studies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:907861.
113. Jørgensen NB, Dirksen C, Bojsen-Møller KN, Jacobsen SH, Worm D, Hansen DL, et al. Exaggerated glucagon-like peptide 1 response is important for improved β -cell function and glucose tolerance after Roux-en-Y gastric bypass in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(9):3044–52.
114. Drucker DJ, Ehrlich P, Asat SL, Brubaker PL, Steiner DF. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7911–6.
115. Guida C, Stephen SD, Watson M, Dempster N, Larraufie P, Marjot T, et al. PYY plays a key role in the resolution of diabetes following bariatric surgery in humans. *EBioMedicine*. 2019;40:67–76.
116. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra41.
117. Wang F, Bai R, Yan W, Yan M, Dong L, Song M. Differential composition of gut microbiota among healthy volunteers, morbidly obese patients and post bariatric surgery patients. *Exp Ther Med*. 2019;17(4):2905–15.
118. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*. 2016;4(4):e1251384.
119. Murphy R, Tsai P, Jüllig M, Liu A, Plank L, Booth M. Differential changes in gut microbiota after gastric bypass and sleeve gastrectomy bariatric surgery vary according to diabetes remission. *Obes Surg*. 2017;27(4):917–25.
120. Hall TC, Pellen MGC, Sedman PC, Jain PK. Preoperative factors predicting remission of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity. *Obes Surg*. 2010;20(9):1245–50.
121. Dixon JB, Chuang LM, Chong K, Chen SC, Lambert GW, Straznicky NE, et al. Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(1):20–6.
122. Anhe FF, Varin TV, Schertzer JD, Marette A. The gut microbiota as a mediator of metabolic benefits after bariatric surgery. *Can J Diabetes*. 2017;41(4):439–47.
123. Moreno-Indias I, Sánchez-Alcoholado L, García-Fuentes E, Cardona F, Queipo-Ortuño MI, Tinahones FJ. Insulin resistance is associated with specific gut microbiota in appendix samples from morbidly obese patients [Internet]. *Am J Transl Res*. 2016;8(12):5672–84. Available from: <http://www.ajtr.org>

124. Sridhar A, Khan D, Elliott JA, Naughton V, Flatt PR, Irwin N, et al. RYGB surgery has modest effects on intestinal morphology and gut hormone populations in the bypassed biliopancreatic limb but causes reciprocal changes in GLP-2 and PYY in the alimentary limb. *PLoS One*. 2023;18(5):e0284915.
125. Amato A, Baldassano S, Mulè F. GLP-2: an underestimated signal for improving glycaemic control and insulin sensitivity. *J Endocrinol*. 2016;229(2):R57–66.
126. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Ståhlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation. *Cell Metab*. 2015;22(2):228–38.
127. Farin W, Oñate FP, Plassais J, Bonny C, Beglinger C, Woelnerhanssen B, et al. Impact of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy on gut microbiota: a metagenomic comparative analysis. *Surg Obes Relat Dis*. 2020;16(7):852–62.
128. Morán-Ramos S, Soriano-Cortés R, Soto-Fuentes V, Tenorio-Quiroz A, Gervasio-Ortiz E, Rico-Amador D, et al. Role of presurgical gut microbial diversity in Roux-en-Y gastric bypass weight-loss response: a cohort study. *Lifestyle Genom*. 2024;17(1):12–21.
129. Dang JT, Mocanu V, Park H, Laffin M, Hotte N, Karmali S, et al. Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy induce substantial and persistent changes in microbial communities and metabolic pathways. *Gut Microbes*. 2022;14(1):2030005.