



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PREBIÓTICO,
PROBIÓTICO Y SIMBIÓTICO DE DETERMINADOS
COMPUESTOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA DE
NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Calderon Bofias, Marta Maria

Tutor/a: Andrés Grau, Ana María

Cotutor/a: Asensio Grau, Andrea

Director/a Experimental: VITERI ECHEVERRIA, JAZMIN DAYUMARA

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PREBIÓTICO, PROBIÓTICO Y SIMBIÓTICO DE DETERMINADOS COMPUESTOS SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA DE NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

AUTORES: Calderón-Bofías, M., Viteri-Echeverría, J.¹, Asensio-Grau, A.¹, Andrés, A.¹

RESUMEN

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la alteración del equilibrio entre sal y líquidos de múltiples órganos. Aunque esta disfunción afecta principalmente al pulmón, también se ve perjudicado el sistema digestivo y, en consecuencia, la microbiota colónica. Además, el tratamiento actual para esta patología se basa en la ingesta de dosis considerables de antibióticos y de una dieta hipercalórica con un bajo contenido en fibra, condiciones que agravan la situación de disbiosis colónica. En el presente trabajo se utilizó un modelo estático de fermentación colónica *in vitro* para evaluar el potencial prebiótico, probiótico y simbiótico de determinados compuestos sobre la microbiota de niños con fibrosis quística. Se analizaron los metabolitos producidos, así como de los cambios en la abundancia relativa de las bacterias más relevantes encontradas en la microbiota colónica. Los resultados mostraron que los compuestos con mayor potencial corrector de la disbiosis fueron la pectina y el β -glucano suplementados tanto solos como a modo de simbióticos en combinación con cualquiera de los tres probióticos estudiados (*L. rhamnosus*, *L. reuteri* y *L. salivarius*). En los ensayos con pectina o β -glucano y los simbióticos que contenían estas fibras se observó un descenso en la producción de amonio y un aumento en la producción de lactato, ácido acético y ácido propiónico. A su vez, también se observaron cambios positivos en la composición de la microbiota dando lugar a una disminución en la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* y de *Acidaminococcus*, así como un incremento en la abundancia relativa de *Bacteroides* y *Parabacteroides*.

PALABRAS CLAVE: fermentación colónica *in vitro*, microbiota intestinal, fibrosis quística, fibras dietéticas, probióticos, simbióticos.

¹Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD), Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n. 46022 - Valencia.

ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease characterized by an altered salt-fluid balance in multiple organs. Although this dysfunction mainly affects the lung, the digestive system and the colonic microbiota are also affected. Moreover, the current treatment for this pathology is based on the intake of considerable doses of antibiotics and a hypercaloric diet with a low fiber content, conditions that aggravate the situation of colonic dysbiosis. In the present work, a static *in vitro* colonic fermentation model was used to evaluate the prebiotic, probiotic and symbiotic potential of certain compounds on the microbiota of children with cystic fibrosis. The metabolites produced were analyzed, as well as the changes in the relative abundance of the most relevant bacteria found in the colonic microbiota. The results showed that the compounds with the greatest dysbiosis-correcting potential were pectin and β -glucan supplemented both as single compounds and as symbiotics in combination with any of the three probiotics studied (*L. rhamnosus*, *L. reuteri* and *L. salivarius*). In trials with pectin or β -glucan and the symbiotics containing these fibers, a decrease in ammonium production and an increase in lactate, acetic acid and propionic acid production were observed. In turn, positive changes in the composition of the microbiota were also observed resulting in a decrease in the relative abundance of *Escherichia-Shigella* and *Acidaminococcus*, as well as an increase in the relative abundance of *Bacteroides* and *Parabacteroides*.

KEY WORDS: *in vitro* colonic fermentation, gut microbiota, cystic fibrosis, dietetic fibers, probiotics, symbiotics.

RESUM

La fibrosi quística és una malaltia autosòmica recessiva caracteritzada per l'alteració de l'equilibri entre sal i líquids de múltiples òrgans. Encara que aquesta disfunció afecta principalment al pulmó, també es veu perjudicat el sistema digestiu i, en conseqüència, la microbiota colònica. A més, el tractament actual per a aquesta patologia es basa en la ingesta de dosis considerables d'antibiòtics i d'una dieta hipercalòrica amb un baix contingut en fibra, condicions que agreugen la situació de disbiosi colònica. En el present treball es va utilitzar un model estàtic de fermentació colònica *in vitro* per a avaluar el potencial prebiòtic, probiòtic i simbiòtic de determinats compostos sobre la microbiota de xiquets amb fibrosi quística. Es van analitzar els metabòlits produïts, així com dels canvis en l'abundància relativa dels bacteris més rellevants trobades en la microbiota colònica. Els resultats van mostrar que els compostos amb major potencial corrector de la disbiosi van ser la pectina i el β -glucà suplementats tant sols com a mode de simbiòtics en combinació amb qualsevol dels tres probiòtics estudiats (*L. rhamnosus*, *L. reuteri* i *L. salivarius*). En els assajos amb pectina o β -glucà i els simbiòtics que contenien aquestes fibres es va observar un descens en la producció d'amoni i un augment en la producció de lactat, àcid acètic i àcid propiònic. Al seu torn, també es van observar canvis positius en la composició de la microbiota donant lloc a una disminució en l'abundància relativa d'*Escherichia-Shigel·la* i d'*Acidaminococcus*, així com un increment en l'abundància relativa de *Bacteroides* i *Parabacteroides*.

PARAULES CLAU: fermentació colònica *in vitro*, microbiota intestinal, fibrosi quística, fibres dietètiques, probiòtics, simbiòtics.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (en adelante, FQ) es una enfermedad autosómica recesiva en la que se ve alterado el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (o CFTR por sus siglas en inglés: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Françoise & Héry-Arnaud, 2020). La alteración de este gen, encargado de regular el canal de cloruro (Cl^-) y bicarbonato (HCO_3^-), provoca la disminución del flujo de estos iones y la alteración de la homeostasis entre sal y líquidos de múltiples órganos. Principalmente el órgano más afectado y el mayor causante de la morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ es el pulmón, pero también se ven alterados otros como son el páncreas, las glándulas sudoríparas, los conductos deferentes, el hígado y el intestino (Pranke et al., 2019).

Por lo que respecta a la afección intestinal, se ha visto que la pérdida de la función del CFTR altera, entre otras cosas, el entorno intestinal, aumentando principalmente la producción de moco y, por tanto, desencadenando un aumento de la viscosidad luminal, así como una disminución de la secreción de bicarbonato dando lugar a un entorno ácido en el intestino. Asimismo, la función pancreática se ve afectada por la presencia de moco por lo que la secreción de pancreatina está también disminuida, o incluso ausente en el entorno duodenal afectando a la digestibilidad de macro y micronutrientes. Todo ello provoca que la microbiota intestinal se encuentre en desequilibrio, condición conocida como disbiosis intestinal (Caley et al., 2023; Testa et al., 2022).

En el caso de pacientes con FQ, esta alteración del conjunto de poblaciones microbianas que habitan en el intestino se ve agravada por la dieta hipercalórica que llevan los pacientes, siendo alta en grasas y proteínas y, en consecuencia, baja en fibra (Caley et al., 2023). Este tipo de dietas puede tener un impacto negativo sobre la microbiota ya que la fermentación de carbohidratos no digeribles, o fibras, que da lugar a ácidos grasos de cadena corta (en adelante, SCFA por sus siglas en inglés: *short-chain fatty acids*), relacionados con efectos beneficiosos para la salud, está reducida. Asimismo, el exceso de proteínas y lípidos en la dieta y su consecuente fermentación da lugar a compuestos N-nitrosos y a ácidos grasos ramificados (o BCFA por sus siglas en inglés: *branched-chain fatty acids*) en el caso de las proteínas, y a sales biliares secundarias en el caso de la fermentación de lípidos, relacionados con efectos perjudiciales para la salud (Ventimilla-Gozalbo et al., 2021).

Por otra parte, también la elevada carga de fármacos que asumen los pacientes con FQ, en especial los antibióticos que son la base del tratamiento para la afección pulmonar, se asocian a efectos gastrointestinales secundarios y un impacto perjudicial sobre la microbiota intestinal (Caley et al., 2023).

Además, se ha observado que la disbiosis intestinal puede afectar a su vez a la patología pulmonar. Puesto que en pacientes con FQ parece darse

un aumento de las bacterias intestinales patógenas y proinflamatorias, y una reducción general de las bacterias relacionadas con efectos antiinflamatorios, puede darse un exceso de inflamación tanto a nivel sistémico como pulmonar. Todo ello podría llegar a desencadenar una alteración de la respuesta inmunitaria pulmonar, lo cual exacerbaría la enfermedad pulmonar (Caley et al., 2023; Testa et al., 2022).

Para estudiar la fermentación colónica, dado que los estudios clínicos *in vivo* presentan importantes limitaciones, se han desarrollado diferentes modelos *in vitro* que tratan de simular las condiciones fisiológicas de este proceso en el laboratorio. Este tipo de modelos permiten evaluar el efecto de determinados compuestos sobre la microbiota intestinal estudiada y, a su vez, la producción de los metabolitos producidos por esta. Algunos compuestos que se pueden estudiar mediante la fermentación colónica *in vitro* son los prebióticos (moléculas no digeribles que estimulan el crecimiento de bacterias), probióticos (bacterias vivas) y simbióticos (combinación de ambos) (Ventimilla-Gozalbo et al., 2021).

Entre los distintos modelos de fermentación colónica *in vitro* se pueden distinguir dos tipos: en estático o en dinámico. La principal diferencia entre ambos es la complejidad del sistema. Por lo que corresponde a las fermentaciones en estático, aunque son más simples y están más alejadas de las condiciones fisiológicas del tracto digestivo, permiten estudiar numerosas muestras al mismo tiempo y conocer a rasgos generales el efecto de un determinado compuesto sobre la microbiota. De esta forma, se pueden emplear para determinar y evaluar determinados compuestos y así seleccionar los más interesantes para estudiarlos mediante la fermentación en dinámico (Pérez-Burillo et al., 2021).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar pares de fibras prebióticas y compuestos probióticos sobre la microbiota intestinal de niños con FQ. Para ello fue necesario determinar la actividad metabólica y la composición de la microbiota intestinal para así poder identificar el efecto de la administración de los diferentes compuestos, así como determinar la combinación simbiótica con un mayor potencial beneficioso sobre la microbiota intestinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo seguido para llevar a cabo el experimento se ha realizado de acuerdo a Pérez-Burillo et al., 2021 y con algunas modificaciones de acuerdo a Rycroft et al., 2001.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo se preparó mezclando peptona (2 g/L), cloruro de sodio (1 g/L), sulfato de magnesio (0,01 g/L), cloruro de calcio hexahidrato (0,01 g/L), Tween 80 (2 mL/L), disolución de sal de resazurina al 0,25% (w/v) (4 mL/L) y sales biliares (0,5 g/L) de Sigma-Aldrich® (Missouri, EE.UU.),

dihidrógenofosfato de potasio (0,04 g/L) de Scharlau® (Barcelona, España), sodio hidrógeno carbonato (2 g/L) de Chem-Lab® (Zedelgem, Bélgica), extracto de levadura (2 g/L) de Condalab® (Madrid, España) y agua Milli-Q (975 mL/L) y se autoclavó la mezcla. Posteriormente, se añadieron hemina (0,02 g/L), vitamina K1 (10 µL/L) y cisteína (0,5 g/L) de Sigma-Aldrich® (Missouri, EE.UU.). Por último, se ajustó el pH a 7, el cual había sido medido previamente antes de la esterilización en el autoclave.

Preparación del inóculo fecal

El inóculo fecal se obtuvo de un pool de un total de 4 muestras fecales de niños con FQ el cual se mezcló con tampón fosfato 0,1M de EMD Millipore (Massachusetts, EE.UU.) y se introdujo en un stomacher durante 2 minutos. Pasado este tiempo se recogió el sobrenadante para inocular las muestras de la fermentación colónica.

Las muestras fecales utilizadas se recogieron de pacientes pediátricos con FQ reclutados en la Comunidad Valenciana siguiendo el reglamento del Comité de Ética (código: Ref. P09_24_11_2021). Los criterios de inclusión de dichos pacientes fueron: tener entre 0 y 11 años, un diagnóstico de FQ confirmado por test de sudor positivo (>60 mEq/L) y/o por presencia de dos mutaciones causantes de FQ en el gen CFTR y una confirmación de diagnóstico de insuficiencia pancreática exocrina (elastasa fecal <200 µg/g en heces). Por otro lado, los criterios de exclusión fueron: la presencia de infecciones agudas, de dolor abdominal agudo y/o estar en tratamiento con una terapia moduladora del gen CFTR.

Fermentación colónica *in vitro* en estático

Se procedió a realizar la fermentación colónica en estático de fibras dietéticas con potencial prebiótico, probióticos y simbióticos. Todos los materiales utilizados (viales, tubos Falcon, tubos Eppendorf, cucharas y puntas de micropipeta) se esterilizaron en el autoclave el día previo al experimento.

Las fibras dietéticas utilizadas fueron el β-glucano de Neogen® (Míchigan, EE.UU.), la pectina de manzana y el almidón de patata, ambos de Sigma-Aldrich® (Missouri, EE. UU.), y el almidón resistente, obtenido a partir del almidón de patata mediante una hidratación, aplicación de calor y un posterior enfriamiento según Zhou et al., 2019. La selección de estos tipos de fibra se realizó siguiendo la clasificación de Fu et al. (2022) de la cual se optó por escoger dos tipos de polisacáridos no amiláceos (β-glucano y pectina) y dos tipos de almidones resistentes (gránulos de almidón nativo de patata y almidón gelatinizado y retrogradado modificado mediante procesamiento físico). Para realizar la fermentación de cada uno de estos compuestos, se añadieron 24 mg de cada uno en viales totalmente estériles junto con 5,4 mL de medio de cultivo, a lo cual se añadió 0,6 mL de inóculo fecal.

Las cepas de probióticos utilizadas fueron *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103TM) y *Limosilactobacillus reuteri* (DSM17938) aisladas de los productos farmacéuticos Kaleidon Hydro (Menarini®) y Casenbiotic (BioGaia®) respectivamente, y *Ligilactobacillus salivarius* (CECT 4063) obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Todas ellas fueron suspendidas en agar MRS a una concentración mínima de $6 \cdot 10^8$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL. Estos medios de cultivo líquido se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos y, tras retirar el sobrenadante, se añadió al probiótico el mismo volumen de medio de cultivo preparado para la fermentación colónica y se homogenizó mediante vórtex. De estos probióticos resuspendidos se tomó 1 mL de cada cepa y se inocularon en viales estériles, junto con 4,4 mL de medio de cultivo y 0,6 mL de inóculo fecal para así obtener una concentración final de 10^8 UFC/mL.

Respecto a las combinaciones con potencial simbiótico, se realizaron 12 combinaciones distintas mezclando cada fibra dietética con las distintas cepas probióticas. Para ello se tomaron 24 mg de fibra y se mezclaron con 1 mL de probiótico, 4,4 mL de medio de cultivo y 0,6 mL de inóculo fecal.

Para tomar una referencia de la microbiota basal, se prepararon también muestras únicamente con 5,4 mL de medio de cultivo y 0,6 mL de inóculo fecal, sin ningún compuesto añadido.

Las muestras preparadas para la fermentación se elaboraron en condiciones asépticas en campana de flujo laminar para así evitar la contaminación. Una vez elaboradas, se incubaron en anaerobiosis durante 20 horas a 37°C con una oscilación de 20 rpm. Tras terminar la fermentación colónica, se tomaron diferentes alícuotas para, posteriormente, realizar las determinaciones analíticas.

Determinaciones analíticas

ACTIVIDAD METABÓLICA DE LA MICROBIOTA

La concentración de amonio se cuantificó utilizando el kit enzimático comercial *Ammonia* de R-Biopharm® (Darmstadt, Alemania) y mediante un espectrofotómetro DU 730 UV/Vis de Beckman Coulter® (California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración de lactato se cuantificó utilizando el kit enzimático comercial *Lactate Assay* de Sigma-Aldrich® (Missouri, EE. UU.) y mediante un lector de placas Multiskan FC de Thermo Fisher Scientific® (Massachusetts, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los SCFA se analizaron mediante cromatografía de gases (GC-FID) según el protocolo adoptado por Adorno et al. (2014) con algunas modificaciones (Asensio-Grau et al., 2023). Para ello se realizó una extracción con dietiléter a partir de alícuotas de 2 mL de las muestras fermentadas. Estas alícuotas se mezclaron con H₂SO₄ (9,2 M) y con una pequeña cantidad de NaCl para eliminar la posible presencia de agua en el extracto. Posteriormente

se añadió la solución de patrón interno (ácido 2-metilhexanoico) y el dietiléter. Estas muestras se vortearon y centrifugaron a 3000 g-fuerza durante 3 minutos, tras los cuales se retiró el sobrenadante que se transfirió a los viales de cromatografía. Estos viales se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases GC-2014 de Agilent Technologies® (La Jolla, EE.UU.) con un detector de ionización de llama.

COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA

Para determinar los filos y géneros de bacterias presentes, se extrajo en primer lugar el ADN fecal de todas las muestras recogidas utilizando el kit comercial de extracción de ADN fecal de Norgen Biotek Corp® (Ontario, Canadá), siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante. El rendimiento final y la calidad del ADN extraído se determinaron mediante fluorimetría utilizando el fluorómetro Qubit de Thermo Fisher Scientific® (Massachusetts, EE.UU.).

Estas muestras de ADN extraído fueron analizadas mediante análisis metataxonómico basado en la amplificación con cebadores específicos de las regiones V3-V4 del ARNr 16S en la plataforma Illumina MiSeq (2x300bp) del servicio de secuenciación de FISABIO (Valencia, España). Las lecturas obtenidas se sometieron a evaluación de calidad y filtrado para, posteriormente, unir las secuencias forward y reverse. A las secuencias resultantes, las ASVs (del inglés, *Amplicon Sequence Variants*), se les asignó la taxonomía basándose en la base de datos del gen 16S SILVA.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para estudiar la actividad metabólica de la microbiota colónica se realizó con el programa GraphPad Prism versión 8.4.3 de GraphPad Software® (Massachusetts, EE.UU.). Este análisis incluyó la ejecución de una prueba Tukey para múltiples comparaciones (Two-way ANOVA) utilizando dos réplicas de muestras de microbiota basal, así como tres réplicas reales de cada compuesto para comprobar si existían diferencias significativas entre ellos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Impacto de las fibras prebióticas, compuestos probióticos y su combinación sobre la actividad metabólica de la microbiota

La Figura 1 recoge los resultados obtenidos en el análisis de los metabolitos. En ella están representadas tanto las concentraciones en μM obtenidas de amonio (gráfica A), lactato (gráfica B) y SCFA (gráfica C) durante la fermentación colónica *in vitro* en cada ensayo, como las diferencias significativas existentes con respecto a la microbiota basal y a los respectivos compuestos con potencial prebiótico y probiótico.

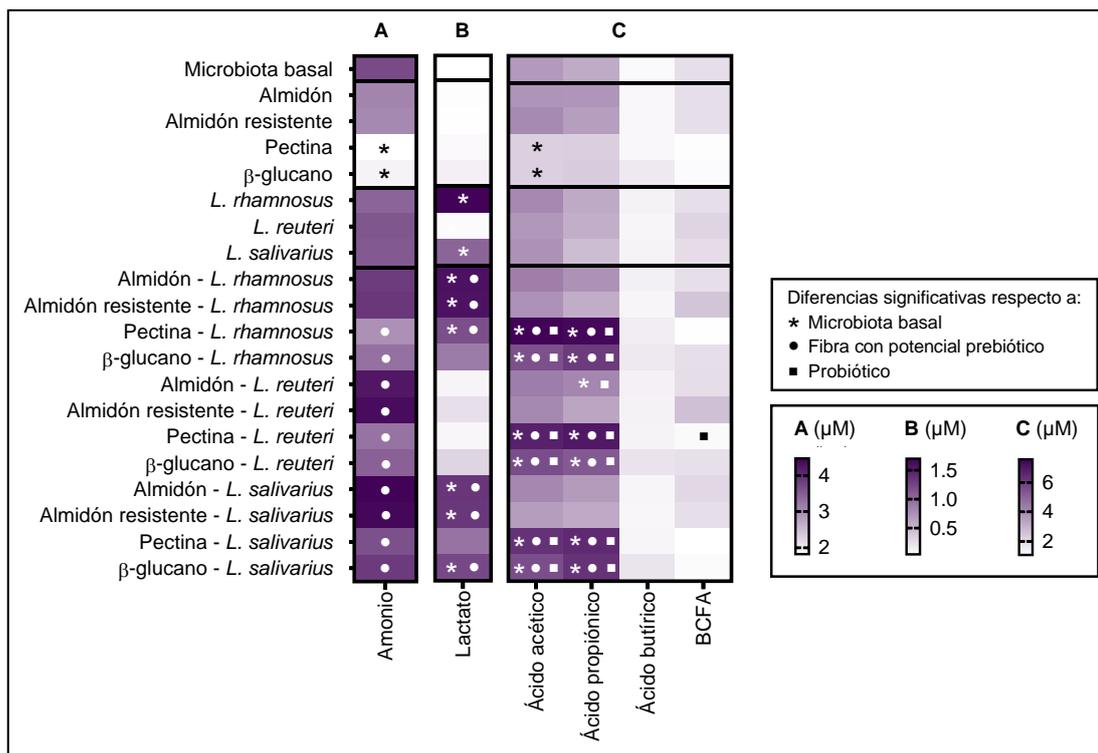


FIGURA 1. Representación de las concentraciones de metabolitos y las diferencias significativas entre muestras. A: Concentración de amonio (μM); B: concentración de lactato (μM) y C: concentración de SCFA (μM).

El **amonio** es un metabolito que se genera como producto de la fermentación de proteínas (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019). Tal y como se puede observar en la Figura 1.A, al estudiar su producción se encontraron diferencias significativas tras la fermentación de pectina y de β -glucano (ambos con un *p-valor* $<0,0001$). Ambas resultaron en un detrimento de la concentración de amonio. Mientras, la suplementación con las combinaciones de fibra y probiótico dieron lugar a mayores concentraciones en comparación con sus respectivos componentes por separado. En este sentido, no se dio un efecto sinérgico puesto que las combinaciones no potenciaron que se redujera en mayor medida la concentración de amonio producida.

Asimismo, entre la pectina y el β -glucano, la primera fue la fibra que dio lugar a los valores de amonio más reducidos. Este resultado coincide con la hipótesis de Aguirre et al. (2014) que postula que las pectinas pueden reducir la generación de amonio. Además, esta circunstancia se considera positiva para la salud humana puesto que, tal como defienden Oliphant & Allen-Vercoe (2019), el amonio es un metabolito potencialmente tóxico para el organismo si se encuentra en elevadas concentraciones. Se ha visto que en exceso es capaz de inhibir el consumo de oxígeno mitocondrial y de reducir el catabolismo de los SCFA en las células epiteliales del intestino. A esto se le suma que los géneros de bacterias que suelen ser productores de este metabolito tienden a ser patógenos (Richardson et al., 2013). Se podría suponer, por tanto, que un valor elevado de amonio puede ser un indicador de

la presencia de bacterias con potencial perjudicial para la salud. Por estos motivos, interesa seguir investigando aquellos compuestos que reduzcan la producción de este metabolito, como la pectina y el β -glucano.

El **lactato**, por otra parte, es una molécula señalizadora que cumple funciones en múltiples procesos celulares. Se trata de un metabolito con función energética ya que puede ser catabolizado por las células del intestino (Huang et al., 2022). Como se muestra en la Figura 1.B., se pudieron observar diferencias significativas en la producción de lactato durante la fermentación con los probióticos *L. rhamnosus* (p -valor $<0,0001$) y *L. salivarius* (p -valor = $0,0225$), al igual que con los simbióticos formados por almidón - *L. rhamnosus* (p -valor $<0,0001$), almidón resistente - *L. rhamnosus* (p -valor $<0,0001$), pectina - *L. rhamnosus* (p -valor = $0,0033$), almidón - *L. salivarius* (p -valor = $0,0003$), almidón resistente - *L. salivarius* (p -valor = $0,0003$) y β -glucano - *L. salivarius* (p -valor = $0,0019$). Tanto en los ensayos con los probióticos como con los simbióticos, los valores de lactato obtenidos aumentaron significativamente. No obstante, dado que no se encontraron diferencias significativas entre los ensayos con simbióticos respecto a los probióticos que los componen, no se puede deducir que exista un efecto de sinergia entre fibras y probióticos.

Según esta observación y los valores que se muestran en la Figura 1.B., de los compuestos mencionados, realmente el más destacable en la producción de lactato fue *L. rhamnosus*. Sin embargo, cabe la posibilidad de que los valores obtenidos no fueran demasiado elevados en comparación con los obtenidos en otros estudios (Asensio-Grau et al., 2023). Esto puede deberse a que ciertas bacterias son capaces de consumirlo dando lugar a SCFA, por lo que no es frecuente que se acumule en grandes cantidades en el medio colónico (Aguirre et al., 2014; Huang et al., 2022; Louis & Flint, 2017; Oliphant & Allen-Vercoe, 2019).

Los ácidos grasos de cadena corta (o **SCFA**) son metabolitos generados a partir de la fermentación colónica de las fibras dietéticas. Los SCFA que se producen mayoritariamente durante este proceso son el ácido acético, el propiónico y el butírico (Ventimilla-Gozalbo et al., 2021). Tal como se muestra en la Figura 1.C, en este trabajo se estudiaron estos tres SCFA principales, así como los ácidos grasos de cadena ramificada (o BCFA) ya que se consideran potencialmente nocivos para la salud (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019).

En el caso del **ácido acético**, se pudieron observar diferencias significativas tras la fermentación de pectina y β -glucano (p -valor $<0,0001$ en ambos casos). La suplementación con cada una de las dos fibras dio lugar a una reducción de la concentración de ácido acético. No obstante, contradiciendo estos resultados, se vieron también diferencias significativas tras la fermentación de los simbióticos formados precisamente por la pectina

y el β -glucano junto con los tres diferentes probióticos (p -valor $<0,0001$ en las seis combinaciones) dando lugar en este caso a valores más elevados de ácido acético.

Además, también se observaron diferencias significativas entre las seis combinaciones comentadas en comparación con los respectivos compuestos que los forman (pectina, β -glucano, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* y *L. salivarius*). En estas se puede considerar que sí se dio un efecto sinérgico puesto que la combinación de los compuestos aumentó la concentración de ácido acético en mayor medida que la fibra y el probiótico por separado. Por tanto, según lo comentado y lo que se puede observar en la Figura 1.C, los compuestos que más cantidad de ácido acético produjeron con diferencia fueron el formado por pectina - *L. rhamnosus*, seguido del de pectina - *L. reuteri* y, por último, el de pectina - *L. salivarius*.

Por lo que respecta al **ácido propiónico**, se encontraron también diferencias significativas en los ensayos de fermentación con los simbióticos formados por pectina y β -glucano junto con los diferentes probióticos (p -valor $<0,0001$ en todos los casos), así como con el simbiótico formado por almidón - *L. reuteri* (p -valor = 0,0356). En todos los casos las concentraciones de ácido propiónico producidas se vieron aumentadas.

En este caso, se observó también que sí se dio un efecto sinérgico entre los diferentes probióticos en combinación con la pectina y el β -glucano, así como en el caso de *L. reuteri* en combinación con el almidón. Todas estas combinaciones tuvieron un efecto mayor que los compuestos que las formaban por separado. De todos ellos, según se puede observar en la Figura 1.C, el simbiótico que dio lugar a los valores más elevados de ácido propiónico fue aquel formado por pectina - *L. rhamnosus*.

Por otro lado, por lo que respecta al **ácido butírico**, no se vio ninguna diferencia significativa en ninguno de los ensayos, tal como se refleja en la Figura 1.C.

Como se ha comentado, los compuestos con mejores resultados en los tres SCFA analizados fueron los simbióticos. Esto puede deberse a que, por una parte, contienen fibras con potencial prebiótico que actúan como sustrato (Markowiak-Kopec & Slizewska, 2020) y, por otra, bacterias específicas (probióticos) encargadas de fermentar este sustrato. La fermentación de estas fibras tanto por la microbiota como por los probióticos da como producto final SCFA (Aguirre et al., 2014). Estos metabolitos desempeñan un papel fundamental en la salud del huésped ya que tienen efecto antiinflamatorio y representan la principal fuente energía para las células epiteliales intestinales y (Louis & Flint, 2017; Markowiak-Kopec & Slizewska, 2020; Oliphant & Allen-Vercoe, 2019)

Por último, en cuanto a los **BCFA**, no se encontraron diferencias significativas en ninguna muestra suplementada. En este sentido, este resultado se considera positivo ya que se ha visto que estos metabolitos son potencialmente citotóxicos y proinflamatorios (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019).

Impacto de las fibras prebióticas, compuestos probióticos y su combinación sobre la composición de la microbiota colónica

La Figura 2 recoge los resultados obtenidos tras evaluar la influencia de la presencia de las fibras dietéticas, compuestos probióticos y de su combinación sobre los géneros de bacterias presentes en el colón. En ella están representadas tanto la abundancia relativa en tanto por 1, como las diferencias significativas existentes con respecto a la microbiota basal y a los respectivos compuestos con potencial prebiótico y probiótico.

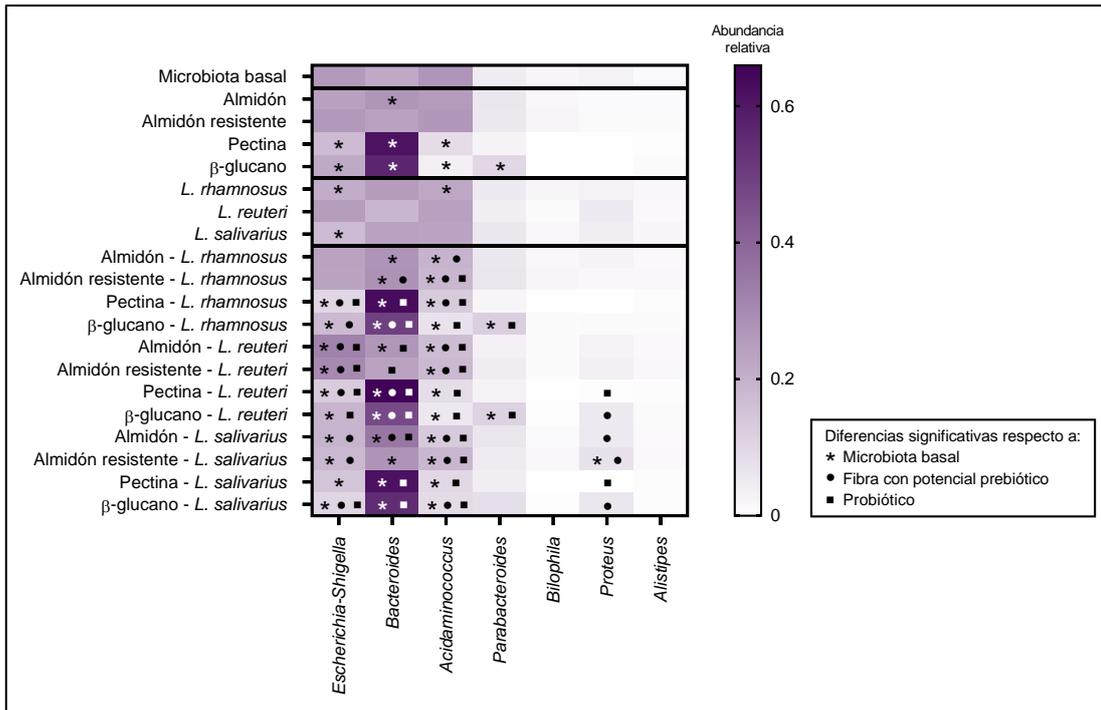


FIGURA 2. Representación de la abundancia relativa de los diferentes géneros de la microbiota colónica y las diferencias significativas entre muestras.

En primer lugar, por lo que respecta a *Escherichia-Shigella* es un género considerado como proinflamatorio (Testa et al., 2022). Al analizarlo se observaron diferencias significativas en su abundancia relativa tras la fermentación de las fibras pectina y β-glucano (p -valor $<0,0001$ y $0,0228$ respectivamente), los probióticos *L. rhamnosus* y *L. salivarius* (p -valor = $0,0228$ y $<0,0001$ respectivamente) y todos los simbióticos (p -valor en un rango entre $0,0257$ y $<0,0001$), a excepción de los formados por almidón y almidón resistente con *L. rhamnosus*. La fermentación de los compuestos mencionados, salvo los simbióticos formados por almidón y almidón resistente junto con *L. reuteri*, redujeron la abundancia de *Escherichia-Shigella*.

De entre las diferentes combinaciones, se observaron diferencias significativas, con respecto a las fibras y a los probióticos que los formaban, en los simbióticos de pectina - *L. rhamnosus*, almidón - *L. reuteri*, almidón resistente - *L. reuteri*, pectina - *L. reuteri* y β-glucano - *L. salivarius*. En aquellos

que se componían de pectina o β -glucano el efecto consistió en una reducción de la presencia de *Escherichia-Shigella*. Mientras que los compuestos formados por almidón y almidón resistente dieron lugar a un aumento de la abundancia relativa de esta bacteria.

Es decir, en este caso, los compuestos con mayor potencial tanto a nivel de simbiosis como a nivel de reducción de abundancia de *Escherichia-Shigella* fueron el simbiótico formado por pectina - *L. rhamnosus*, seguido del de β -glucano - *L. salivarius* y, por último, el de pectina - *L. reuteri*. Estos tres compuestos simbióticos serían los más indicados para seguir estudiando en este caso dado que la presencia abundante de *Escherichia-Shigella* en la microbiota colónica promueve el desequilibrio microbiano al ser proinflamatoria (Testa et al., 2022). Además, se ha visto que en personas con FQ y disbiosis intestinal la abundancia de este género suele estar aumentada, en algunos casos hasta 10 veces más, en comparación con la microbiota intestinal de una persona sana (Caley et al., 2023; Coffey et al., 2019)

Por otro lado, también se analizó la abundancia del género ***Bacteroides***, que desempeña un papel inmunomodulador en la microbiota colónica (Antosca et al., 2019) y es productor de ácido acético y propiónico (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019). En este caso se observó que prácticamente todas las fibras dietéticas excepto el almidón resistente (*p*-valor <0,0001 en la pectina y el β -glucano y 0,0008 en el almidón), así como todos los compuestos simbióticos salvo el formado por almidón resistente - *L. reuteri* (*p*-valor en un rango entre 0,0023 y <0,0001), presentaron diferencias significativas. La fermentación de los compuestos mencionados resultó en una mayor abundancia relativa del género *Bacteroides*. Además, se compararon las combinaciones de fibras y probióticos y se pudo advertir un potencial efecto simbiótico en los compuestos formados por β -glucano - *L. rhamnosus*, β -glucano - *L. reuteri*, pectina - *L. reuteri* y almidón - *L. salivarius*. Todos ellos se diferenciaron significativamente tanto de la fibra como del probiótico que los formaban dando lugar a una abundancia relativa mayor en aquellas muestras que combinaban los compuestos.

De todos los simbióticos, los que mayor abundancia de *Bacteroides* mostraron fueron aquellos que contenían pectina. En concreto, por orden de abundancia relativa generada, fueron el de pectina - *L. reuteri* en primer lugar, seguido del de pectina - *L. rhamnosus* y, por último, del de pectina - *L. salivarius*. Aunque en la literatura existen diversidad de hallazgos respecto a la abundancia relativa de *Bacteroides* en la microbiota de personas con disbiosis por FQ (Caley et al., 2023), varios autores han encontrado que en estos casos suele haber una menor presencia de este género en la microbiota colónica respecto a la que se puede encontrar en personas sanas (Antosca et al., 2019; Testa et al., 2022). Además, Testa et al. (2022) afirman que una baja proporción de *Bacteroides* aumenta el riesgo de desarrollar atopía y asma. Por estos motivos, sería interesante seguir investigando los compuestos comentados para aplicar en personas con FQ.

Por lo que respecta a ***Acidaminococcus*** es un género que tiene capacidad para producir BCFA (Asensio-Grau et al., 2023). Al analizarlo se

observaron diferencias significativas tras la fermentación de pectina y β -glucano (p -valor $<0,0001$), así como de *L. rhamnosus* (p -valor = $0,0077$) y de todas las combinaciones de fibras y probióticos (p -valor $<0,0001$). En estos casos se vio un aumento en la abundancia de *Acidaminococcus*. Por otro lado, se advirtieron potenciales efectos simbióticos entre el almidón junto con *L. reuteri* y *L. salivarius*, el almidón resistente junto con los tres diferentes probióticos, la pectina con *L. rhamnosus* y el β -glucano con *L. salivarius*.

De todos los compuestos, aquellos que dieron lugar a una menor abundancia de *Acidaminococcus* fueron el β -glucano añadido de forma aislada, seguido de las combinaciones de β -glucano - *L. reuteri* y de pectina - *L. reuteri* y, por último, la pectina por separado. En el caso de la pectina - *L. reuteri*, esta combinación produjo valores más reducidos de abundancia relativa en comparación tanto con la pectina como con *L. reuteri*, por lo que sí se podría hablar de una simbiosis. No obstante, en el caso del β -glucano, esta fibra dietética por separado dio lugar a resultados más reducidos que sus respectivas combinaciones con probióticos, por lo que no se podría decir que exista un efecto simbiótico.

En este caso, puesto que se ha asociado el género *Acidaminococcus* con la presencia de inflamación intestinal en FQ (Coffey et al., 2019; Testa et al., 2022), interesarían aquellos compuestos que reduzcan su abundancia en mayor medida. Según los resultados obtenidos estos fueron el β -glucano como fibra dietética y el simbiótico de pectina - *L. reuteri*. Estos datos concuerdan con los de Asensio-Grau et al. (2023) que defienden que la suplementación *L. reuteri* supone una disminución significativa de la abundancia de *Acidaminococcus*.

En cuanto al género ***Parabacteroides***, se ha visto que ejerce un papel inmunomodulador en la microbiota colónica (Testa et al., 2022). Al analizarlo se pudieron observar diferencias significativas únicamente en los ensayos con β -glucano añadido de forma aislada (p -valor = $0,0013$) y sus combinaciones con *L. rhamnosus* y *L. reuteri* (p -valor $<0,0001$ en ambos simbióticos). Tras las fermentaciones de estos tres compuestos se pudo observar una mayor abundancia relativa de *Parabacteroides*.

De todos ellos, el que mayor abundancia produjo fue el β -glucano - *L. rhamnosus*, seguido del β -glucano - *L. reuteri* y, por último, del β -glucano. Estos serían los compuestos a seguir investigando puesto que el género *Parabacteroides* se ha relacionado con la producción de ácido acético y propiónico que tienen propiedades beneficiosas para la salud (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019). Además, se ha visto que suele estar reducido en la microbiota colónica de personas con disbiosis por FQ (Testa et al., 2022).

En lo que respecta al género ***Proteus***, se considera una bacteria proinflamatoria de la microbiota colónica (Zhang et al., 2021). La única diferencia significativa que se observó en este caso fue tras la fermentación del simbiótico formado por almidón resistente - *L. salivarius* (p -valor = $0,0389$), el cual dio lugar a un aumento en la abundancia de *Proteus*.

Por otro lado, las muestras que presentaron una menor abundancia relativa de *Proteus* fueron la pectina y los simbióticos que contenían esta fibra. No obstante, no se podría hablar de que estos compuestos presenten un potencial de reducción de *Proteus* ya que no difirieron significativamente de la microbiota basal. Sería interesante seguir investigando compuestos capaces de disminuir la presencia de este género en la microbiota colónica de personas con FQ, puesto que se considera que tiene potencial proinflamatorio y patogénico (Zhang et al., 2021). Asimismo, aunque no se han encontrado estudios sobre el género *Proteus* en particular, se ha visto que el filo *Proteobacteria* al que pertenece suele estar aumentado en la microbiota intestinal en casos de disbiosis por FQ (Coffey et al., 2019; Testa et al., 2022).

Los resultados de los otros dos géneros analizados, *Bilophila* y *Alistipes*, no fueron relevantes ni en cuanto a la abundancia relativa ni tampoco respecto a las diferencias significativas entre muestras. Por lo que respecta al género *Bilophila*, no encontraron referencias ni de su abundancia en casos de FQ ni del efecto que tiene en general sobre el organismo. Mientras que el género *Alistipes*, según Caley et al. (2023) y Coffey et al. (2019), suele estar reducido en la microbiota colónica de pacientes con FQ en comparación con personas sanas. Además se ha visto que produce ácido acético y propiónico que son beneficiosos para el organismo (Oliphant & Allen-Vercoe, 2019), por lo que las futuras búsquedas podrían enfocarse en buscar compuestos que aumenten la abundancia relativa de este género.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, contrastados con los datos encontrados en la bibliografía, muestran que las fibras dietéticas que tuvieron la repercusión más positiva sobre la microbiota colónica fueron la pectina y el β -glucano. Los efectos deseables observados fueron la reducción de la producción de amonio, el aumento de la producción de ácido acético, la disminución de la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* y *Acidaminococcus* y el aumento de *Bacteroides*, y, en el caso del β -glucano, de *Parabacteroides*.

Se encontró que los probióticos suplementados por separado generaron un impacto bastante más reducido que el de las fibras. Al compararlos entre ellos se pudo observar que los que mejores resultados fueron *L. rhamnosus* y *L. salivarius*. La simulación de la fermentación colónica de estos dos probióticos produjeron un incremento significativo de la concentración de lactato, y un detrimento de la presencia de *Escherichia-Shigella*, así como de *Acidaminococcus* en el caso de *L. rhamnosus*.

Por lo que respecta a las combinaciones de prebióticos y probióticos, los que mostraron un efecto sinérgico en la producción de metabolitos beneficiosos para la salud fueron aquellos que contenían pectina o β -glucano. En concreto, la simulación de la fermentación colónica de las combinaciones de los diferentes probióticos con estas dos fibras dietéticas resultó en valores más elevados en la producción de lactato, de ácido acético y de ácido propiónico.

Al analizar los cambios en la composición de la microbiota colónica, se observó que prácticamente todas las combinaciones de fibra y probiótico ensayadas tuvieron un efecto positivo. La simulación de la fermentación colónica de estos compuestos con potencial simbiótico resultó en una reducción de la abundancia relativa de *Escherichia-Shigella* y de *Acidaminococcus*, y en un aumento de *Bacteroides*. Resaltar que, las combinaciones que dieron lugar a efectos más beneficiosos en comparación con sus respectivas fibras y probióticos, fueron aquellas que contenían la pectina o el β -glucano.

En conclusión, de los compuestos estudiados en el presentes trabajo, los más destacables son la pectina y el β -glucano, tanto de forma aislada como en combinación con los diferentes probióticos ensayados. Estos podrían ser utilizados en ensayos de simulación dinámicos para evaluar la respuesta en condiciones más próximas a la realidad.

REFERENCIAS

- Adorno, M. Á., Hirasawa, J. S., & Varesche, M. B. (2014). Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry*, 5(7), 406-414. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049>
- Aguirre, M., Jonkers, D. M., Troost, F. J., Roeselers, G., & Venema, K. (2014). *In vitro* Characterization of the Impact of Different Substrates on Metabolite Production, Energy Extraction and Composition of Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113864>
- Antosca, K. M., Chernikova, D. A., Price, C. E., Ruoff, K. L., Li, K., Guill, M. F., Sontag, N. R., Morrison, H. G., Hao, S., Drumm, M. L., MacKenzie, T. A., Dorman, D. B., Feenan, L. M., Williams, M. A., Dessaint, J., Yuan, I. H., Aldrich, B. J., Moulton, L. A., Ting, L., ... Madan, J. C. (2019). Altered Stool Microbiota of Infants with Cystic Fibrosis Shows a Reduction in Genera Associated with Immune Programming from Birth. *J Bacteriol.*, 201(16). <https://doi.org/10.1128/jb.00274-19>
- Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Ferriz-Jordán, M., García-Hernández, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2023). Effect of Lactobacillaceae Probiotics on Colonic Microbiota and Metabolite Production in Cystic Fibrosis: A Comparative In Vitro Study. *Nutrients*, 15(17), 3846. <https://doi.org/10.3390/nu15173846>
- Caley, L. R., White, H., de Goffau, M. C., Floto, R. A., Parkhill, J., Marsland, B., & Peckham, D. G. (2023). Cystic Fibrosis-Related Gut Dysbiosis: A Systematic Review. *Dig Dis Sci.*, 68, 1797-1814. <https://doi.org/10.1007/s10620-022-07812-1>
- Coffey, M. J., Nielsen, S., Wemheuer, B., Kaakoush, N. O., Garg, M., Needham, B., Pickford, R., Jaffe, A., Torsten, T., & Ooi, C. Y. (2019). Gut Microbiota in Children With Cystic Fibrosis: A Taxonomic and Functional Dysbiosis. *Sci Rep.*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55028-7>
- Françoise, A., & Héry-Arnaud, G. (2020). The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes (Basel)*, 11(5), 536. <https://doi.org/10.3390/genes11050536>
- Fu, J., Zheng, Y., Gao, Y., & Xu, W. (2022). Dietary Fiber Intake and Gut Microbiota in Human Health. *Microorganisms*, 10, 2507. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122507>
- Huang, C., Xu, H., Zhou, X., Liu, M., Li, J., & Liu, C. (2022). Systematic Investigations on the Metabolic and Transcriptomic Regulation of Lactate in the Human Colon Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.*, 23, 6262. <https://doi.org/10.3390/ijms23116262>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.*, 19(1), 29-41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Markowiak-Kopec, P., & Slizewska, K. (2020). The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 12, 1107. <https://doi.org/10.3390/nu12041107>
- Oliphant, K., & Allen-Vercoe, E. (2019). Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: Major fermentation byproducts and their impact on host health. *Microbiome*, 7, 91. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0704-8>
- Pérez-Burillo, S., Molino, S., Navajas-Porras, B., Valverde-Moya, Á. J., Hinojosa-Nogueira, D., López-Maldonado, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. Á. (2021). An in vitro batch fermentation protocol for studying the contribution of food to gut microbiota composition and functionality. *Nat Protoc.*, 16, 3186-3209. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00537-x>
- Pranke, I., Golec, A., Hinzpeter, A., Edelman, A., & Sermet-Gaudelus, I. (2019). Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol.*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00121>
- Richardson, A. J., McKain, N., & Wallace, R. J. (2013). Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids. *BMC Microbiol.*, 13(6). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-6>
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol.*, 91, 878-887. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01446.x>

- Testa, I., Crescenzi, O., & Esposito, S. (2022). Gut Dysbiosis in Children with Cystic Fibrosis: Development, Features and the Role of Gut–Lung Axis on Disease. *Microorganisms*, *11*(1), 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010009>
- Ventimilla-Gozalbo, E., Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2021). In Vitro Simulation of Human Colonic Fermentation: A Practical Approach towards Models' Design and Analytical Tools. *Appl Sci.*, *11*, 8135. <https://doi.org/10.3390/app11178135>
- Zhang, J., Hoedt, E. C., Liu, Q., Berendsen, E., Teh, J. J., Hamilton, A., O'Brien, A. W., Ching, J. Y. L., Wei, H., Yang, K., Xu, Z. X., Wong, S. H., Mak, J. W. Y., Sung, J. J. Y., Morrison, M., Yu, J., Kamm, M. A., & Ng, S. C. (2021). Elucidation of *Proteus mirabilis* as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. *Gastroenterology*, *160*(1), 317-330. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.036>
- Zhou, D., Ma, Z., Xu, J., Li, X., & Hu, X. (2019). Resistant starch isolated from enzymatic, physical, and acid treated pea starch: Preparation, structural characteristics, and *in vitro* bile acid capacity. *LWT*, *116*, 108541. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108541>

ANEXOS

Anexo I. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.		X		
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.		X		
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Descripción de la alineación del TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

El presente trabajo está altamente relacionado con el ODS número 3 que hace referencia a la salud y el bienestar de las personas. Dado que el objetivo de esta investigación es identificar compuestos dietéticos que mejoren el estado de la microbiota intestinal de niños con FQ y que, a su vez, esta microbiota está asociada a su salud integral, se puede considerar que los hallazgos pueden contribuir a garantizar una vida sana y promover el bienestar de personas con FQ.

Por otro lado, también se puede ver relacionado, aunque en menor medida, con los ODS número 10 y 12 referentes a la reducción de las desigualdades y a la producción y el consumo responsables. Por lo que respecta a las desigualdades, teniendo en cuenta que las personas con enfermedades crónicas forman parte de un colectivo vulnerable, intentar mejorar la calidad de vida podría reducir el riesgo de exclusión o las limitaciones sociales que las personas afectadas pueden estar sufriendo. Por otra parte, en cuanto a la producción y el consumo responsables, puesto que hay pocos estudios relacionados con la suplementación en personas con FQ, este trabajo podría ayudar a dilucidar una línea de investigación encaminada a aumentar la eficiencia de la alimentación de las personas con dicha enfermedad, así como a promover un estilo de vida más saludable.