



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Análisis del impacto de la suplementación con una nueva
cepa de Bifidobacterium sobre diferentes perfiles de
microbiota colónica en pacientes pediátricos con fibrosis
quística

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Vázquez Castro, Alicia

Tutor/a: Andrés Grau, Ana María

Cotutor/a: Asensio Grau, Andrea

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON UNA NUEVA CEPA DE *BIFIDOBACTERIUM* SOBRE LA MICROBIOTA COLÓNICA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

Autores: Alicia Vázquez Castro, Joaquim Calvo Lerma¹, Andrea Asensio Grau¹, Ana María Andrés Grau¹

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es una patología genética de carácter multisistémico, originada por una mutación en el gen que codifica la proteína CFTR. Esto conlleva a disfunciones respiratorias y digestivas que resultan en déficits de crecimiento, infecciones respiratorias crónicas, daño progresivo del tejido pulmonar y mortalidad prematura. Actualmente se han logrado avances significativos en la calidad de vida mediante terapias génicas que regulan la actividad de la proteína CFTR, pero la disbiosis persistente en la microbiota ha suscitado el interés por abordar la aplicación de moduladores de la microbiota colónica con el objetivo de mitigar sus efectos adversos en la salud de estos individuos. En este estudio, se realizó una simulación de la fermentación colónica utilizando el sistema dinámico SHIME®, en el que se suministró una cepa de *Bifidobacterium* a la microbiota colónica de tres pacientes pediátricos con FQ. Los resultados obtenidos mostraron diferentes respuestas en cada uno de los pacientes en función de las características de su microbiota basal. En algunos casos la cepa logró incrementar la presencia de microorganismos beneficiosos como *Akkermansia* y reducción de otros perjudiciales como *Hungatella* o *Lachnoclostridium*. La suplementación indujo un incremento en la producción de los ácidos grasos de cadena corta. No obstante, el incremento de la presencia de algunos géneros bacterianos patógenos, así como de la producción de ácidos grasos de cadena corta ramificada, plantean reservas de cara a la aplicación a corto plazo de esta cepa probiótica en pacientes con FQ. Para ello, se requiere de investigaciones adicionales para evaluar con mayor profundidad la eficacia y seguridad de esta intervención como posible opción terapéutica en el contexto de la FQ.

RESUM: La fibrosi quística (FQ) és una patologia genètica de caràcter multisistèmic, originada per una mutació en el gen que codifica la proteïna CFTR. Això comporta disfuncions respiratòries i digestives que resulten en dèficits de creixement, infeccions respiratòries cròniques, dany progressiu del teixit pulmonar i

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos - FoodUPV, Camino de Vera s/n Edificio 8E, Bloque F Universitat Politècnica de València, 46022 (Valencia)

mortalitat prematura. Actualment s'han aconseguit avanços significatius en la qualitat de vida mitjançant teràpies gèniques que regulen l'activitat de la proteïna CFTR, però la disbiosi persistent en la microbiota ha suscitat l'interés per abordar l'aplicació de moduladors de la microbiota colònica amb l'objectiu de mitigar els seus efectes adversos en la salut d'estos individus. En este estudi, es va realitzar una simulació de la fermentació colònica utilitzant el sistema dinàmic SHIME®, en el qual es va subministrar un cep de *Bifidobacterium* a la microbiota colònica de tres pacients pediàtrics amb FQ. Els resultats obtinguts van mostrar diferents respostes en cadascun dels pacients en funció de les característiques de la seua microbiota basal. En alguns casos el cep va aconseguir incrementar la presència de microorganismes beneficiosos com *Akkermansia* i reducció d'altres perjudicials com *Hungatella* o *Lachnoclostridium*. La suplementació va induir un increment en la producció dels àcids grassos de cadena curta. No obstant això, l'increment de la presència d'alguns gèneres bacterians patògens, així com de la producció d'àcids grassos de cadena curta ramificada, plantegen reserves de cara a l'aplicació a curt termini d'este cep probiòtic en pacients amb FQ. Per això, es requerix d'investigacions addicionals per avaluar amb major profunditat l'eficàcia i seguretat d'esta intervenció com a possible opció terapèutica en el context de la FQ.

ABSTRACT: Cystic fibrosis (CF) is a multisystemic genetic disease caused by a mutation in the gene encoding the CFTR protein. It leads to respiratory and digestive dysfunctions resulting in growth deficits, chronic respiratory infections, progressive lung tissue damage and premature mortality. Significant advances in quality of life have now been achieved through gene therapies that regulate CFTR protein activity, but persistent dysbiosis in the microbiota has sparked interest in addressing the application of colonic microbiota modulators with the aim of mitigating their adverse effects on the health of these individuals. In this study, a simulation of colonic fermentation was performed using the dynamic SHIME® system, in which a *Bifidobacterium* strain was supplied to the colonic microbiota of three pediatric CF patients. The results obtained showed different responses in each of the patients depending on the characteristics of their basal microbiota. In some cases, the strain increased the presence of beneficial microorganisms such as *Akkermansia* and reduced the presence of other harmful microorganisms such as *Hungatella* or *Lachnoclostridium*. Supplementation induced an increase in the production of short-chain fatty acids. However, the increased presence of some pathogenic bacterial genera, as well as the increased production of branched short-chain fatty acids, raises concerns about the short-term application of this probiotic strain in CF patients. Additional research is needed to further evaluate the efficacy and safety of this intervention as a potential therapeutic option in the context of CF.

PALABRAS CLAVE: Microbiota colónica, disbiosis, digestión in vitro, fermentación colónica, probiótico, bifidobacterium, fibrosis quística

1. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética multisistémica caracterizada por disfunciones digestivas y respiratorias que contribuyen a déficits de crecimiento, infecciones respiratorias crónicas, daño progresivo del tejido pulmonar y muerte prematura, reduciendo la esperanza de vida a 53 años (Ong & Ramsey, 2023). La mutación responsable de esta patología se encuentra en el gen que codifica la proteína CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), involucrada en el transporte de iones cloruro en las células epiteliales (Tam et al., 2022; Thavamani et al., 2021). El defecto conlleva a la secreción de moco espeso, con implicaciones sobre todo a nivel pulmonar y digestivo. Durante los últimos años, se han desarrollado tratamientos que modifican la actividad de la proteína CFTR, consiguiendo una mayor funcionalidad y por lo tanto aportando mejoras en las diferentes funciones alteradas (Shteinberg & Taylor-Cousar, 2020; Thavamani et al., 2021) y, actualmente, en pacientes con FQ (pcFQ) tratados con el medicamento de terapia génica Kaftrio, el modulador de CFTR más reciente, se ha visto una mejora de la función pulmonar, del estado nutricional y la calidad de vida (Aspinall et al., 2022; Shteinberg & Taylor-Cousar, 2020).

Sin embargo, a pesar de los avances en tratamientos farmacológicos, se ha detectado una alteración de la microbiota colónica (disbiosis) en pcFQ persistente (Coffey et al., 2019), en la que se observa una tendencia de aumento y disminución de ciertos géneros y especies (Tam et al., 2022).

Cada vez es mayor el interés por estudiar el efecto de moduladores de la disbiosis (probióticos, prebióticos, simbióticos) sobre la microbiota con el objetivo de mejorar la función pulmonar de los pacientes y otra sintomatología de FQ como la inflamación intestinal (Caley et al., 2023), pero actualmente el número de trabajos que evalúan el efecto de prebióticos y probióticos en pcFQ sobre la microbiota colónica es escaso y sus resultados contradictorios (Thavamani et al., 2021).

Existen diversas herramientas que permiten estudiar el efecto de los moduladores de la disbiosis sobre la microbiota colónica, las principales son los modelos de la fermentación colónica *in vitro* en estático o en dinámico, los ensayos utilizando modelos animales y los ensayos clínicos con pacientes *in vivo* (Wolfe et al., 2023). Mientras que la simulación en estático es el primer paso para valorar el efecto y las propiedades de estos moduladores, esta dura un máximo de 48 horas. Si bien estos modelos en estático son útiles para cribar aquellos probióticos o prebióticos con mayor potencial, es necesaria una simulación que aproxime mejor la realidad del proceso de digestión y fermentación colónica y

que permita estudiar a más largo plazo los efectos de los bióticos, antes de realizar ensayos clínicos y evitando a su vez los inconvenientes éticos del uso de modelos animales. Para este fin, los modelos de simulación en dinámico se presentan como una herramienta adecuada. Entre ellos, el sistema SHIME® (Simulador del ecosistema microbiano intestinal humano) permite investigar de forma preliminar las interacciones entre ecosistemas microbianos complejos y evaluar el impacto de cambios concretos en el flujo de entrada sobre la microbiota colónica como consecuencia de la exposición a un compuesto bioactivo, como son los probióticos (Gościński et al., 2022; Nissen et al., 2020).

Actualmente existe evidencia sobre algunas cepas de probióticos (sobre todo de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* comerciales) en la mejora de algunos parámetros en niños con FQ, pero de momento se carece de estudios suficientes que permitan establecer una recomendación sobre qué cepa probiótica es la más adecuada en este contexto. Así, recientemente se ha apuntado a que otras cepas podrían mostrar mejores resultados, y por otro lado, que la elección del probiótico debería hacerse de forma personalizada en función de las características individuales de cada sujeto (van Dorst et al., 2022).

El objetivo de este trabajo es estudiar el impacto de la suplementación con una nueva cepa de *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* – IATA01) sobre la microbiota de pacientes con FQ con diferentes características clínicas (toma de antibióticos, terapia génica y malabsorción severa) mediante el modelo de simulación de la fermentación colónica en dinámico SHIME®.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y tratamiento de la cepa probiótica

Se utilizó una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (IATA01) procedente de la colección del IATA-CSIC, aislada de microbiota fecal de una madre voluntaria sana en periodo de lactancia de la cohorte MAMI (MAternal MIcrobes) descrita en García-Mantrana et al., (2019) y seleccionada de entre otras cepas en el marco del proyecto NutriPRO-FQ (CIGE/2022/122). La cepa se cultivó en caldo MRS Difco™ (BD, France) y se traspasó a tubos con agua de peptona en una concentración mínima de 10⁹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ mL. Los tubos se congelaron a – 80°C hasta su uso y se comprobó que la viabilidad no se modificaba tras el tiempo de congelación.

Reclutamiento de sujetos de estudio

Para poder simular el entorno colónico de tres niños con FQ se emplearon tres muestras fecales humanas procedentes de heces recogidas de tres niños/as

de entre 7 y 8 años (FQ1, FQ2 y FQ3) con diferentes condiciones: FQ1: sujeto sin terapia génica, sin antibióticos y con malabsorción severa; FQ2: sujeto con terapia génica y con antibióticos; FQ3: sujeto con terapia génica. La recogida de las muestras de los niños fue aprobada por el Comité Ético de la Universitat Politècnica de València (Ref. P09_24_11_2021). Estas muestras se recogieron el mismo día de la inoculación y se almacenaron en condiciones anaeróbicas en un periodo inferior a 6 horas hasta la extracción de la microbiota y su posterior inoculación.

Simulación *in vitro* de la fermentación colónica

Para simular la fermentación colónica se utilizó el equipo SHIME® (Simulador del ecosistema microbiano intestinal humano) el cual permite la realización de estudios *in vitro* en dinámico utilizando condiciones intestinales específicas. La configuración elegida para llevar a cabo el estudio fue TripleSHIME®, en la que el estómago e intestino delgado fueron simulados en un mismo biorreactor, mientras que las regiones colon proximal (PC) y colon distal (DC) se estudiaron en distintos compartimentos, con diferentes rangos de pH: 5,6-5,9 y 6,6-6,9, respectivamente. Con esta configuración, se pudo estudiar la respuesta al probiótico de tres sujetos al mismo tiempo.

Durante la digestión y fermentación colónica, los caudales de entrada y salida en cada reactor, el pH, tiempo de retención y temperatura (37 °C) fueron controlados de manera automática. Además, se mantuvo el sistema en anaerobiosis añadiendo un flujo de nitrógeno diario durante 30 minutos. Los tres inóculos fecales se prepararon mezclando 20 g de materia fecal en 100 mL de tampón fosfato (0,1 M; pH 6,5), homogeneizando durante 10 minutos en un Stomacher y vertiendo la suspensión obtenida en tubos falcon de 50 mL. Después, se centrifugaron las muestras durante 2 minutos a 500 g-force, se recogió el sobrenadante de los tres inóculos y se inyectaron 25 mL en los biorreactores del colon proximal y 40 mL en los del colon distal.

Para la simulación de la digestión gastrointestinal se preparó el jugo pancreático compuesto por NaHCO₃ (12,5 g/L), oxgall (0,06 g/L) y pancreatina (0,9 g/L), y se mezcló siguiendo las instrucciones de Prodigest®. Durante todo el experimento se introdujo en el sistema un medio de cultivo (PDNM002B) adquirido en Prodigest® (Gante, Bélgica) para mantener las bacterias vivas. Este medio nutritivo estuvo compuesto por arabinogalactano (1,2 g/L), pectina (2 g/L), xilano (0,5 g/L), glucosa (0,4 g/L), extracto de levadura (3 g/L), peptona especial (1 g/L), mucina (1 g/L), L-cisteína-HCl (0,5 g/L) y almidón (4 g/L). El ácido y la base utilizados para controlar el pH en los distintos recipientes fueron NaOH (0,5

M) y HCL (0,5 M), respectivamente, suministrados por Chem Lab (Zedelgem, Bélgica).

El experimento con el equipo SHIME® tuvo una duración total de 9 semanas que se dividieron en cuatro etapas: 1) el periodo de estabilización, en las dos primeras semanas se llevó a cabo la estabilización de la microbiota en los biorreactores tras la introducción del inóculo fecal de los tres niños en sus correspondientes vasos (PC y DC); 2) el periodo de control, en las dos semanas siguientes (15 días), consistió en mantener las mismas condiciones que el periodo anterior para poder obtener la línea base de la microbiota; 3) el periodo de tratamiento, éste consistió en suministrar el probiótico diariamente durante 2 semanas (15 días) asumiendo una concentración de 10^9 UFC/ml en el compartimento colónico; y 4) el periodo de postratamiento, que tuvo una duración de 10 días y consistió en volver a las condiciones de la línea base (periodo de control) sin suplementar con el probiótico. Se tomaron dos alícuotas en los diferentes periodos y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Secuenciación del gen 16S

El DNA fecal total se aisló de las muestras recogidas utilizando el kit comercial Stool DNA Isolation Kit de Norgen Biotek Corp® (Ontario, Canadá), siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante. La concentración del DNA extraído se estimó empleando los reactivos para la cuantificación con el fluorómetro Qubit de Invitrogen Co. (Carlsbad, EEUU). Las muestras de la extracción se enviaron al servicio de secuenciación FISABIO (Valencia, España), donde emplearon cebadores específicos para la amplificación de las regiones V3-V4 del gen 16S del RNA ribosómico (rRNA). Los amplicones se verificaron con un chip Bioanalyzer DNA 1000 y las bibliotecas se secuenciaron utilizando una tirada de 2×300 bp paired-end (MiSeq Reagent kit v3) en una plataforma MiSeq-Illumina.

Las lecturas se filtraron utilizando el pipeline de DADA2 y después se infirieron las variantes de secuencia de amplicón exactas (ASVs). La asignación taxonómica de ASVs fue realizada también por DADA2 utilizando el conjunto de entrenamiento de la base de datos SILVA (versión 138.1). La riqueza y alfa-diversidad de la microbiota se estimaron mediante el cálculo del índice Chao1 para cada muestra utilizando el paquete Microbiome de R. Este análisis bioinformático se realizó con el apoyo del equipo perteneciente al grupo FooDiHealth.

Determinaciones de metabolitos indicativos de actividad metabólica

Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

El análisis de la concentración de los ácidos grasos de cadena corta se realizó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) de acuerdo con el protocolo publicado por (Adorno et al., 2014). Para la realización de las curvas de calibrado (0 – 30 mM) de cada uno de los ácidos grasos se emplearon diferentes estándares analíticos obtenidos por Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU): ácido acético (AA), ácido propiónico (PA), ácido butírico (BA), ácido valérico (VA), ácido caproico (CA), ácido isocaproico (ICA), ácido isovalérico (IVA) y ácido isobutírico (IBA). Las muestras obtenidas de los biorreactores del SHIME® (2 mL) se mezclaron con H₂SO₄ 9,2 M (0,5 mL) y una pequeña cantidad de NaCl para eliminar de la muestra cualquier resto de agua. Posteriormente, se añadió 0,4 mL de estándar interno (Ácido 2-metilhexanoico al 52,9 M) junto con 2 mL de éter dietílico y se agitaron con un vortex al menos durante un minuto. Después, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 3000 g-force y el sobrenadante fue transferido a un vial de cromatografía e inyectado en el equipo (Agilent GC7890B-5977B GC-FID con una columna SUPELCOWAX™ (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). La temperatura del horno aumentó 90°C por cada minuto y la rampa de temperaturas comenzó en 190°C y subió hasta mantenerse en 250°C durante 30 minutos a una velocidad de 5°C/minuto. El gas portador utilizado fue el helio a un caudal de 1 mL/min, la temperatura de inyección fue de 250°C y el volumen de inyección de 2 µL. Los resultados de los ácidos grasos de cadena corta se expresaron como concentración milimolar (mM).

Amonio y lactato

Por otra parte, la concentración de amonio y lactato se midió mediante el uso de dos kits comerciales, Ammonia de R-Biopharm (Darmstadt, Alemania) y Lactate Assay kit de Sigma Aldrich® (Missouri, EEUU), respectivamente. Para el análisis se siguieron las instrucciones del fabricante y se utilizó un espectrofotómetro UV/vis Beckman Coulter (Ohio, EEUU) para el amonio y para el lactato un lector de placas Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer 51119100 (Massachusetts, EEUU).

Análisis estadístico

Para estudiar el efecto de la administración del probiótico sobre los índices de diversidad alfa, la composición de la microbiota y la producción de metabolitos en los diferentes periodos estudiados se realizaron ANOVAs simples con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) utilizando el software GraphPad Prism 9.

Por otro lado, se realizaron ANOVAs multifactoriales para evaluar las diferencias entre los metabolitos producidos entre periodos con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$) utilizando el software GraphPad Prism 9.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la suplementación con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IATA01 en la comunidad microbiana de pacientes con FQ (pcFQ)

En primer lugar resaltar que se observaron diferencias significativas en la composición de la microbiota basal de los tres sujetos de estudio. El impacto observado del tratamiento de suplementación con el probiótico fue dependiente del sujeto y de la región colónica y, además, se detectaron respuestas específicas en algunos géneros bacterianos en el periodo posterior al tratamiento (Figura 1).

En cuanto a la microbiota basal de los sujetos, el sujeto FQ1 se caracterizó por tener una alta presencia de *Lachnoclostridium* y *Clostridium*, que se ha relacionado con la administración de antibióticos a largo plazo y la aparición de diarrea grave y/o colitis pseudomembranosa (de Freitas et al., 2018). Por otra parte, la microbiota del sujeto FQ2 destacó por la elevada cantidad de *Hungatella*, que se ha descrito en estudios anteriores como potencial biomarcador asociado al cáncer colorectal, ya que promueve la proliferación del epitelio colónico a través de la hipermetilación del ADN en la región promotora de genes supresores de tumores (Gilbert et al., 2023). En cambio, en la microbiota del sujeto FQ3 se observó una composición de géneros más variada, coincidiendo con una mayor diversidad, aunque se detectó también la presencia del género *Hungatella*.

Uno de los parámetros comúnmente empleados para la evaluación del estado de la microbiota es la α -diversidad, que resume la estructura de una comunidad microbiana teniendo en cuenta su riqueza (número de grupos taxonómicos) y/o uniformidad (distribución de las abundancias de estos grupos) (Kristensen et al., 2020; Willis, 2019). En la Tabla 1 se muestra la representación de la α -diversidad según el índice Chao1. En ella se observa un aumento de la diversidad con respecto al control o línea base en los sujetos FQ1 y FQ3 durante la etapa de tratamiento y postratamiento en el colon proximal y distal (PC y DC). En cambio, en el sujeto FQ2, la α -diversidad aumentó únicamente en el PC, volviendo a los mismos valores que el control tras el postratamiento en el DC.

Estudios realizados previamente relacionan una diversidad elevada con un mayor estado de equilibrio de la microbiota (Beyhan & Yıldız, 2023), mientras que se ha visto en varios estudios con pacientes con FQ que la disminución de este parámetro se relaciona con el estado de disbiosis intestinal (Bondue et al., 2020;

Coffey et al. 2019 & Nielsen et al., 2017). De acuerdo con los resultados obtenidos, este efecto positivo de aumento de la diversidad microbiana se ha observado en los días posteriores a la administración del probiótico, concretamente durante la etapa de postratamiento, aunque hubiera sido conveniente alargar esta etapa para comprobar si este efecto se mantiene con el tiempo.

TABLA 1. α -diversidad según el índice Chao1 en las dos regiones del colon (PC: proximal; DC: distal) de los sujetos con FQ. C: Control o Baseline; T: tratamiento con probiótico; PT: postratamiento.

Etapa	Días en cada etapa	Sujeto FQ1		Sujeto FQ2		Sujeto FQ3	
		PC1	DC1	PC2	DC2	PC3	DC3
C	15	363	306	277	385	458	462
T	5	478	396	417	392	434	517
	15	411	367	400	423	474	554
PT	10	530	351	522	391	584	707

Además de la α -diversidad, se estudiaron las diferencias en las abundancias relativas de géneros a lo largo del tratamiento. En la Figura 1 se muestra una selección de 17 géneros cuyos cambios se han relacionado previamente con la disbiosis de sujetos con FQ (Coffey et al., 2019; Gilbert et al., 2023b; Kristensen et al., 2020; Schippa et al., 2013; Tam et al., 2022; Thavamani et al., 2021).

Respecto al efecto de la administración del probiótico en el colon proximal (PC), en primer lugar, se detectó que la respuesta al probiótico sobre la microbiota fue diferente en cada uno de los sujetos. Durante la etapa de administración del probiótico y la etapa de postratamiento, se observaron diversas variaciones en las abundancias relativas. En los PCs de los sujetos FQ2 y FQ3 se observó en común una mayor abundancia en *Enterobacter* junto a una reducción de *Hungatella*. En cambio, en el PC1, aumentaron los géneros *Prevotella*, *Enterobacter*, *Lachnoclostridium*, *Acidaminococcus*, *Enterococcus* y *Pseudomonas*, mientras que *Bacteroides*, *Klebsiella* y *Clostridium* disminuyeron tras el tratamiento. En el PC2, el tratamiento con el probiótico conllevó a un aumento de *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Lachnoclostridium*, a la vez que a una disminución muy marcada de *Hungatella*. En el PC3, la bifidobacteria suministrada produjo un incremento del género *Megasphaera* así como *Bacteroides* y *Acidaminococcus*, mientras que la abundancia relativa de

Hungatella, al igual que en el PC2, disminuyó. Como se ha indicado anteriormente, *Hungatella* es un género asociado al cáncer colorectal, por lo que en estos sujetos la suplementación con el probiótico tendría un resultado beneficioso para mejorar la presencia de géneros de bacterias beneficiosas a partir de la reducción de aquellos géneros que no lo son.

En cuanto al impacto del probiótico en el colon distal, se observó un incremento en el DC1 de *Akkermansia*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Enterobacter*, *Enterococcus* y *Acidaminococcus*, mientras que la abundancia relativa de *Bacteroides* y *Clostridium* descendió. En la microbiota del DC2, aumentaron los géneros *Enterobacter*, *Lachnoclostridium* y *Veillonella*, mientras que en DC3 aumentaron los géneros *Enterococcus*, *Acidaminococcus* y *Megasphaera* a la vez que disminuyó *Clostridium*. Sin embargo, tanto en DC2 como DC3 los niveles de *Hungatella* y *Bacteroides* fluctuaron durante toda la simulación. Así pues, no se pudo observar un aumento de *Bacteroides* frente a *Hungatella* en ninguno de estos sujetos (FQ2 y FQ3) tras el tratamiento.

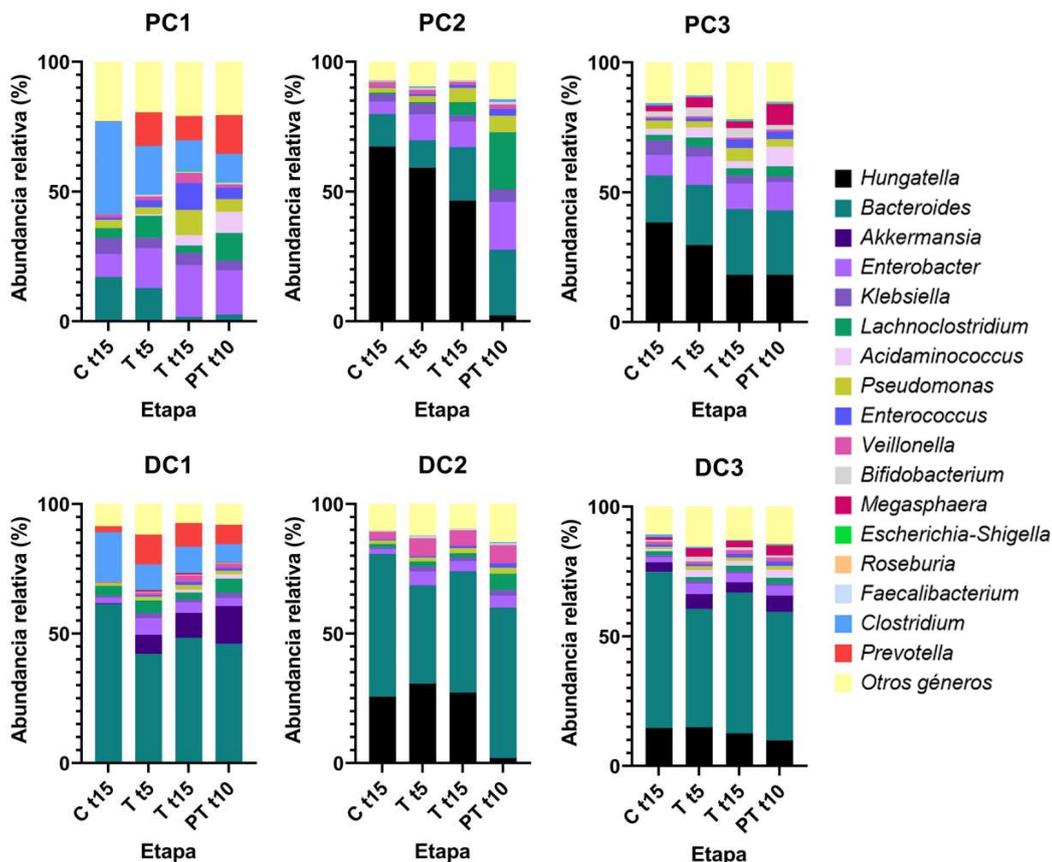


FIGURA 1. Abundancia relativa de géneros microbianos en el PC y DC de los sujetos con FQ.

La alta abundancia relativa de los géneros *Veillonella*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* se ha descrito como característico de los pcFQ y asociado a

disbiosis, junto con un descenso en *Akkermansia*, una bacteria beneficiosa implicada en la protección de las mucosas (Caley et al., 2023; Françoise & Héry-Arnaud, 2020). *Veillonella* es un género que se ha visto incrementado en el tracto intestinal de pcFQ y en sus pulmones, señalando un eje intestino-pulmón en el que los microorganismos son diseminados desde el intestino hasta los pulmones (Price & O'Toole, 2021). Este mismo estudio indica que en el caso del género *Pseudomonas* la dirección de transferencia en el eje intestino-pulmón no está clara, pues se han detectado transferencias en ambas direcciones. Además, la presencia de *Enterobacter* como *Pseudomonas* se ha correlacionado con un aumento de la inflamación de las vías respiratorias (Zemanick et al., 2015). En cambio, la abundancia relativa de *Bacteroides* se ha correlacionado tanto positiva como negativamente en diversos estudios con FQ por lo que no ha sido posible encontrar un patrón (Caley et al., 2023). Por lo tanto, en base a la bibliografía actual, el aumento de estos géneros durante y tras el tratamiento con la cepa probiótica se considera un resultado perjudicial de la suplementación.

Como características diferenciales entre sujetos, se puede destacar la presencia de *Prevotella* y *Clostridium* en FQ1 y de *Megasphaera* en FQ3. Además, cabe mencionar que el sujeto FQ3 es el que presentó menos fluctuaciones en las abundancias relativas de los diferentes géneros.

Respecto al impacto del postratamiento sobre la microbiota colónica, se puede apreciar que para el FQ1 todos los cambios previamente descritos durante el tratamiento se mantuvieron tras suprimir la administración del probiótico. En el sujeto FQ2, *Lachnoclostridium* aumentó en la etapa final de tratamiento en el PC y durante el postratamiento en ambos PC y DC y cabe destacar la acusada disminución de *Hungatella* en el colon proximal y distal durante el postratamiento. Por el contrario, el sujeto FQ3 no experimentó variaciones significativas desde los niveles basales en el pretratamiento hasta el postratamiento, aunque sí aumentó la abundancia relativa de *Megaesphaera* en PC y DC. Estas respuestas podrían atribuirse a la heterogeneidad en la microbiota basal de los sujetos, influenciada por factores intrínsecos (genética, edad) y extrínsecos (medio ambiente, dieta, estilo de vida) del individuo (Ballan et al., 2020). La suplementación con la cepa de *Bifidobacterium* también presentó respuestas diferentes en cada sujeto, resultando la microbiota colónica del sujeto FQ3 la más resiliente ante cambios en la composición.

Efecto de la suplementación con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IATA01 sobre la producción de metabolitos

Lactato

El lactato es un metabolito producido en el intestino como resultado del metabolismo fermentativo de las bacterias presentes. Este compuesto no suele acumularse ya que es precursor de otros metabolitos como ácido acético, butírico y propiónico (SCFAs) (Wang et al., 2019).

La Figura 2 muestra la concentración de lactato en las diferentes partes del colon (proximal y distal) en los periodos estudiados. Se puede observar que previamente a la administración del probiótico, los niveles de lactato fueron superiores en el PC1 y el PC2, mientras que en PC3 la concentración de este metabolito aumentó tras 15 días de tratamiento con el probiótico.

Por otra parte, en el DC se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de lactato para los tres pcFQ en el tiempo 15 de tratamiento con respecto al control. Además, en el postratamiento de FQ3 también se mantuvieron los niveles de lactato significativamente superiores al control, mientras que en FQ1 y FQ2 no mostraron diferencias con los niveles pretratamiento.

Estos cambios en la concentración se relacionan con la presencia de géneros de bacterias productoras y consumidoras de lactato a lo largo de las diferentes etapas, como son *Bifidobacterium* y *Blautia*; y *Eubacterium*, *Anaerostipes*, *Megaesphaera*, *Veillonella* y *Prevotella*, respectivamente (Caley et al., 2023; Firrman et al., 2023; Martín-Núñez et al., 2021; Peterson et al., 2022).

Amonio

El amonio es producido por la actividad proteolítica de las bacterias a la vez que el catabolismo de proteínas en aminoácidos. Este ion suele ser absorbido y excretado en la orina, aunque la acumulación del metabolito en el colon se ha relacionado con una disminución de la absorción de SCFAs, por lo que una elevada concentración es indeseada (Scott et al., 2013).

En el PC se observó un descenso estadísticamente significativo en todos los pcFQ en el día 5 de tratamiento que solo se mantuvo a lo largo del tratamiento para el FQ2, mientras que en FQ1 y FQ3 los valores en el día 15 de tratamiento aumentaron hasta volver a alcanzar los valores del control. Sin embargo, en los días posteriores al tratamiento los niveles de amonio aumentaron significativamente con respecto al pretratamiento.

En el DC se produjo una bajada en los niveles de amonio durante el tratamiento en FQ1, y en FQ2 y FQ3 la concentración de amonio fue aumentando durante tratamiento y postratamiento hasta alcanzar niveles significativamente superiores a los del control.

Este aumento en los niveles de amonio se relaciona con un aumento del metabolismo de la fermentación proteolítica y de géneros productores de amonio, siendo *Bacteroides* el principal. Además, lo esperable es que la mayor actividad de fermentación proteolítica se produzca en el colon distal, puesto que las bacterias colónicas suelen favorecer la fermentación de carbohidratos inicialmente y la proteolítica queda relegada para el momento en el que no quedan carbohidratos y el pH es superior (Korpela, 2018).

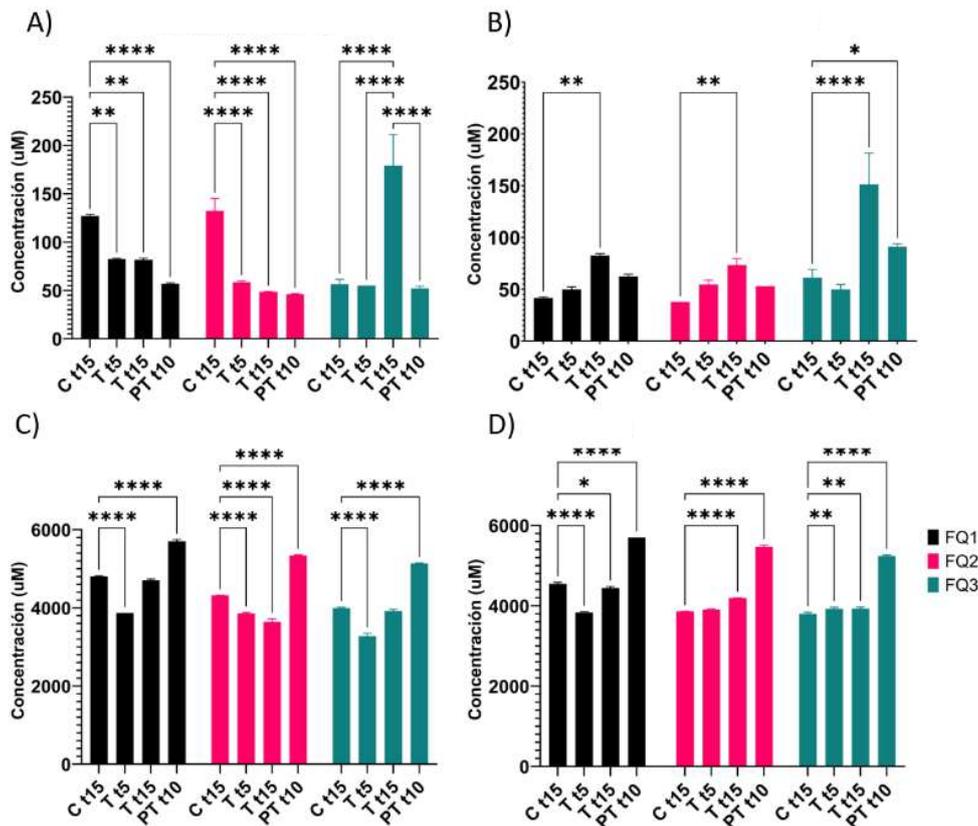


FIGURA 2. Concentración de lactato en colon proximal (A), lactato en colon distal (B), amonio en colon proximal (C) y amonio en colon distal (D). *p-value<0,05; **p-value<0,01; ****p-value<0,0001.

Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)

Los SCFAs son unos de los metabolitos resultantes de la actividad de la microbiota colónica, producidos por la fermentación bacteriana de fibras como almidón resistente, azúcares simples y polisacáridos y han mostrado funciones reguladoras en el metabolismo del colesterol y la glucosa, la respuesta antiinflamatoria e inmune y la integridad de la barrera intestinal (Nogal et al., 2021). Los SCFAs lineales principalmente estudiados son ácido acético, ácido butírico y ácido propiónico y habitualmente se calcula su ratio, siendo este en pacientes adultos sanos de 60:20:20 (Nogal et al., 2021) y en pacientes neonatos sanos 75:19:6 (Bondue et al., 2020). Los bSCFAs conocidos como ácidos grasos

de cadena corta ramificados son aquellos que se relacionan con la presencia de ciertos géneros, principalmente *Bacteroides* y *Clostridium*, que destacan por su mayor actividad proteolítica. A continuación, la Figura 3 muestra la concentración de los tres SCFAs mayoritarios: ácido acético, propiónico y butírico así como de los ácidos grasos ramificados (bSCFAs) que son la suma de la concentración del ácido isovalérico, isobutírico e isocapróico.

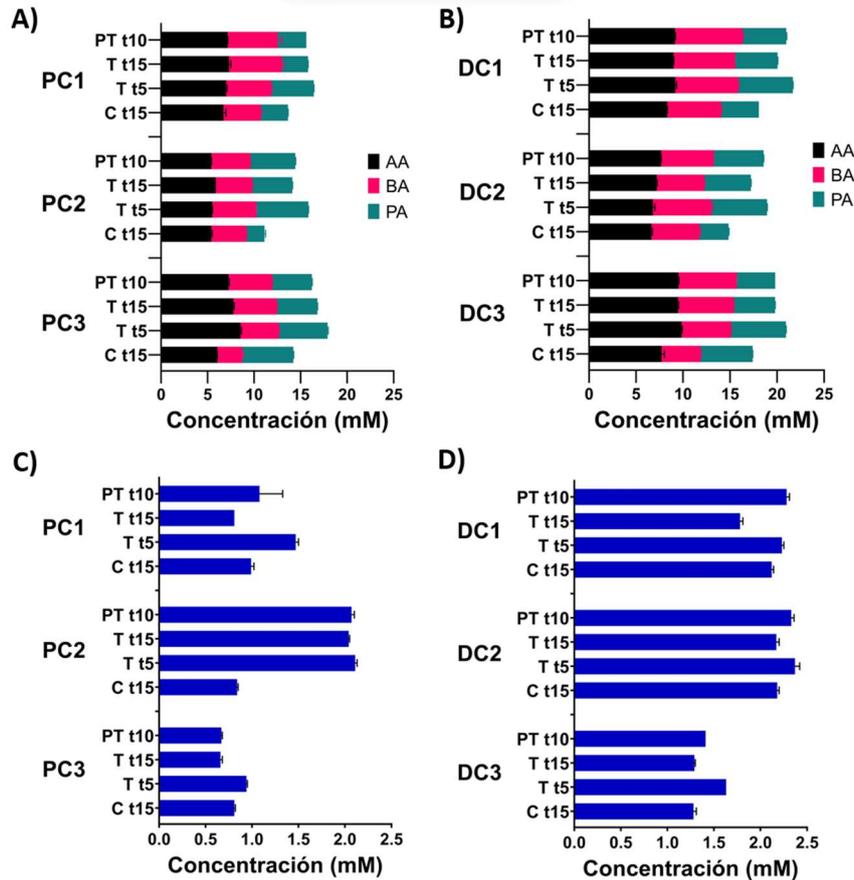


FIGURA 3. Concentración de SCFAs y bSCFAs (mM) de los tres donantes en el colon proximal (PC) y colon distal (DC) durante las diferentes etapas: SCFAs en PC (A); SCFAs en DC (B); bSCFAs en PC (C); bSCFAs en DS (D).

En cuanto a los niveles generales de SCFAs, lo habitual es que haya una mayor concentración en el colon proximal y que esta disminuya en el colon distal debido a la absorción de estos metabolitos (Nogal et al., 2021). Sin embargo, como el SHIME® no dispone de estos mecanismos de absorción, se produce una acumulación de SCFA en los PCs.

El sujeto FQ1 mostró un aumento en BA y PA, el FQ2 un aumento en PA y el FQ3 un aumento de los tres SCFAs: AA, BA y PA. Los estudios realizados señalan que el ácido acético es el SCFA más abundante en PC y DC puesto que es un subproducto de la fermentación sacarolítica de numerosas bacterias, entre ellas las bifidobacterias (Moens et al., 2019). Esto se puede relacionar con el aumento general en AA observado durante la administración de la cepa de *Bifidobacterium*

estudiada. Además, el AA sirve como sustrato para la producción de BA por otras bacterias, como las del género *Megaesphaera* y el aumento de este SCFA se ha relacionado con una mejoría en el estado de salud (Moens et al., 2019; Ríos-Covián et al., 2016). Por lo tanto, el aumento observado en BA durante y después de la administración del probiótico tendría un potencial efecto beneficioso.

En cambio, uno de los objetivos buscados para mejorar la disbiosis en pcFQ es disminuir los niveles de bSCFAs, ya que estos se relacionan con un empeoramiento de la salud (Moens et al., 2019). Tras el estudio de estos SCFAs, se observó que los ácidos grasos ramificados de cadena corta no cambiaron significativamente en PC1, mientras que en PC2 aumentaron significativamente en las etapas de tratamiento como postratamiento y en PC3 aumentaron al inicio del tratamiento (t5), volviendo posteriormente a unos valores similares a los de la línea base (t15). Para el colon distal, en DC1 se observó un aumento significativo en el tiempo 5 del tratamiento y en el postratamiento, al igual que en DC2 y DC3, pero en este último se observó una bajada significativa en el tiempo 15 de tratamiento. Esta tendencia sugiere que con una exposición más prolongada al tratamiento se podría conseguir la disminución de estos bSCFAs en pcFQ, dando el sujeto FQ3 una respuesta más rápida. Además, también se observa que los niveles de bSCFAs en FQ1 son inferiores en todos los casos con respecto al resto de pacientes.

Estudio de las posibles asociaciones entre la microbiota y los metabolitos producidos en pcFQ suplementados con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IATA01

Para comprender mejor la relación entre los metabolitos y la función de la comunidad microbiana, se realizó el análisis de correlaciones de Spearman de la microbiota del colon distal y proximal de cada sujeto y de los metabolitos producidos (Figura 4). Sin embargo, antes de analizar las particularidades de cada sujeto, es necesario introducir el concepto de redundancia funcional, es decir, el hecho de que distinta composición bacteriana puede mostrar similar funcionalidad (Ferrer et al., 2014; Moya & Ferrer, 2016). Es por ello que pueden existir correlaciones de metabolitos con diferentes bacterias en función del entorno de cada sujeto y que la actividad metabólica en una comunidad microbiana puede variar entre ecosistemas, es decir, puede producirse un cambio en las asociaciones metabolito-microorganismo entre etapas dentro de un mismo individuo debido a la incorporación de un nuevo miembro, como sería la cepa probiótica, dando lugar a cambios en la composición de géneros e intercambios en las actividades metabólicas de los distintos géneros.

Los resultados de este análisis mostraron correlaciones estadísticamente significativas para ciertos metabolitos, diferentes entre sujetos. Empezando por el amonio, este únicamente mostró correlaciones significativas en el PC con *Bacteroides*, en el sujeto FQ2 y con *Escherichia-Shigella* en el sujeto FQ3, ambas positivas y relacionadas con un metabolismo fermentativo de proteínas previamente observado en ambos géneros (Richardson et al., 2013; Vince & Burrige, 1980). Estos resultados son coherentes puesto que la mayor actividad de producción de amonio ocurre en el DC, donde sí se encontraron correlaciones positivas entre el amonio y distintos géneros, como *Acidaminococcus*, *Pseudomonas*, *Akkermansia* o *Enterococcus*, aunque estas correlaciones variaron entre sujetos; y correlaciones negativas entre el metabolito amonio y *Clostridium* para los sujetos FQ1 y FQ3.

En cuanto al lactato, inicialmente cabría esperar una correlación positiva entre la producción de lactato y géneros como son *Enterococcus* y *Bifidobacterium*, pues estos taxones convierten la lactosa en lactato (LAB - *Lactic Acid Bacteria*). Sin embargo, eso no ocurre así y se puede explicar debido a que el lactato no suele acumularse en el tracto gastrointestinal porque es utilizado rápidamente por los bacterias intestinales. Por otra parte, *Acidaminococcus* fue negativamente correlacionado con el lactato para los sujetos FQ1 y FQ3 en el colon proximal, mientras que en el colon distal apenas hubieron correlaciones con lactato salvo *Escherichia-Shigella* en los sujetos FQ1 y FQ3 y *Enterococcus* en el sujeto FQ3, ambas positivas. Estas pocas correlaciones encajan con lo esperado ya que en el colon distal el metabolismo principal es el de proteínas y no el de carbohidratos.

En cuanto a la producción de SCFAs, para el ácido acético (AA) no se observaron correlaciones significativas en el colon proximal pero sí en el colon distal, siendo estas positivas para *Enterobacter* y *Klebsiella* en el sujeto FQ1 y para *Bifidobacterium* en el sujeto FQ3. El ácido propiónico (PA), por otra parte, se correlacionó negativamente con *Klebsiella* y positivamente con *Escherichia-Shigella* en el colon proximal de los sujetos FQ1 y FQ3, solo en el PC1 positivamente con *Acidaminococcus* y *Prevotella* y negativamente con *Bacteroides*, en el PC2 no se detectaron correlaciones y en el PC3 positivamente con *Bacteroides* y *Enterococcus* y negativamente con *Hungatella* y *Clostridium*. Para el colon distal, el PA mostró una relación directamente proporcional con *Akkermansia*, *Acidaminococcus* y *Pseudomonas* en los sujetos FQ1 y FQ3, siendo *Akkermansia* una de las principales especies productoras de este SCFA (Nogal et al., 2021). Para el DC1, *Enterococcus*, *Veionella* y *Prevotella* también mostraron una correlación positiva con PA y *Hungatella* y *Clostridium* una correlación negativa, mientras que en el DC2 el único género correlacionado positivamente con PA fue *Bifidobacterium*. En el DC3, *Megasphaera* y

Escherichia-Shigella se correlacionaron positivamente con PA y *Bacteroides* negativamente.

En cuanto a la producción de ácido butírico (BA), esta se correlacionó negativamente con *Pseudomonas* en el colon proximal de FQ1 y FQ3, mientras que se vio una correlación positiva en FQ2. Asimismo, el DC1 mostró correlación positiva de este metabolito con *Bacteroides* y negativa con *Acidaminococcus* y *Escherichia-Shigella* y el DC2, positiva con *Enterobacter* y *Bifidobacterium* y negativa con *Hungatella*. En cambio, en el colon distal se presentaron correlaciones positivas con PA para *Klebsiella* en FQ2 y FQ3. En el DC1 *Clostridium* y *Hungatella* mostraron una relación directamente proporcional con PA, mientras que en *Akkermansia*, *Acidaminococcus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* esta relación fue inversamente proporcional. En DC2, *Lachnoclostridium* y *Veionella* correlacionaron positivamente con el SCFA y mientras que en el DC3 solo *Enterobacter* mostró una correlación positiva con PA.

Enterococcus, *Veionella* y *Acidaminococcus* son géneros productores de SCFAs que se han visto aumentados en pcFQ (van Dorst et al., 2022) y concretamente, los productos del metabolismo de *Acidaminococcus* se han asociado con una respuesta tumorigénica (Gilbert et al., 2023a), aunque este género se vio correlacionado positivamente con PA y negativamente con BA. Con todas estas correlaciones, se debe tener presente la redundancia funcional, que explica por qué se observaron diferentes aumentos y reducciones de un género con respecto a un metabolito entre individuos y colonos.

Bifidobacterium es un género implicado en la producción de ácido acético, butírico y propiónico, además de lactato (Nogal et al., 2021), con lo cual las correlaciones observadas en los distintos colonos de los sujetos, positivas en su mayoría, apuntan hacia un efecto beneficioso de la bifidobacteria suministrada sobre la microbiota colónica del sujeto.

Finalmente, para los ácidos grasos de cadena corta ramificada (bSCFAs), en FQ3 no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa, en tanto que en el PC1 correlacionó positivamente *Bacteroides* con los bSCFAs y negativamente *Pseudomonas* y *Escherichia-Shigella*, en el FQ2 la relación fue directamente proporcional para *Enterobacter* y *Pseudomonas* e inversamente proporcional para *Hungatella*. Por otro lado, en el DC1, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Prevotella* mostraron una correlación positiva y *Bacteroides* y *Clostridium* negativa, si bien en FQ2 la única correlación significativamente positiva de los bSCFAs fue con *Clostridium*.

Con todo esto, se observa que los sujetos 1 y 3 (FQ1 y FQ3) coinciden en un gran número de correlaciones, siguiendo una tendencia similar en cuanto a relación metabolito-género. Esto podría indicar que, aunque las características clínicas no son las mismas, puesto que uno tiene malabsorción severa y el otro terapia génica, la respuesta de sus microbiotas a la bifidobacteria es similar. De hecho, en el trabajo llevado a cabo por Lkhagva et al. (2021) se demostró que los factores externos de los pacientes, como puede ser el ejercicio físico, tenían un mayor impacto sobre la microbiota que la propia dieta, lo cual apunta hacia otras opciones de tratamiento para pcFQ más allá de la medicación. Por el contrario, la microbiota colónica del sujeto FQ2 responde de manera diferente posiblemente debido, en parte, al efecto del antibiótico, ya que se ha visto que en la FQ los antibióticos disminuyen la abundancia relativa de bacterias comensales, como *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, y reducen la alfa-diversidad (Caley et al., 2023).

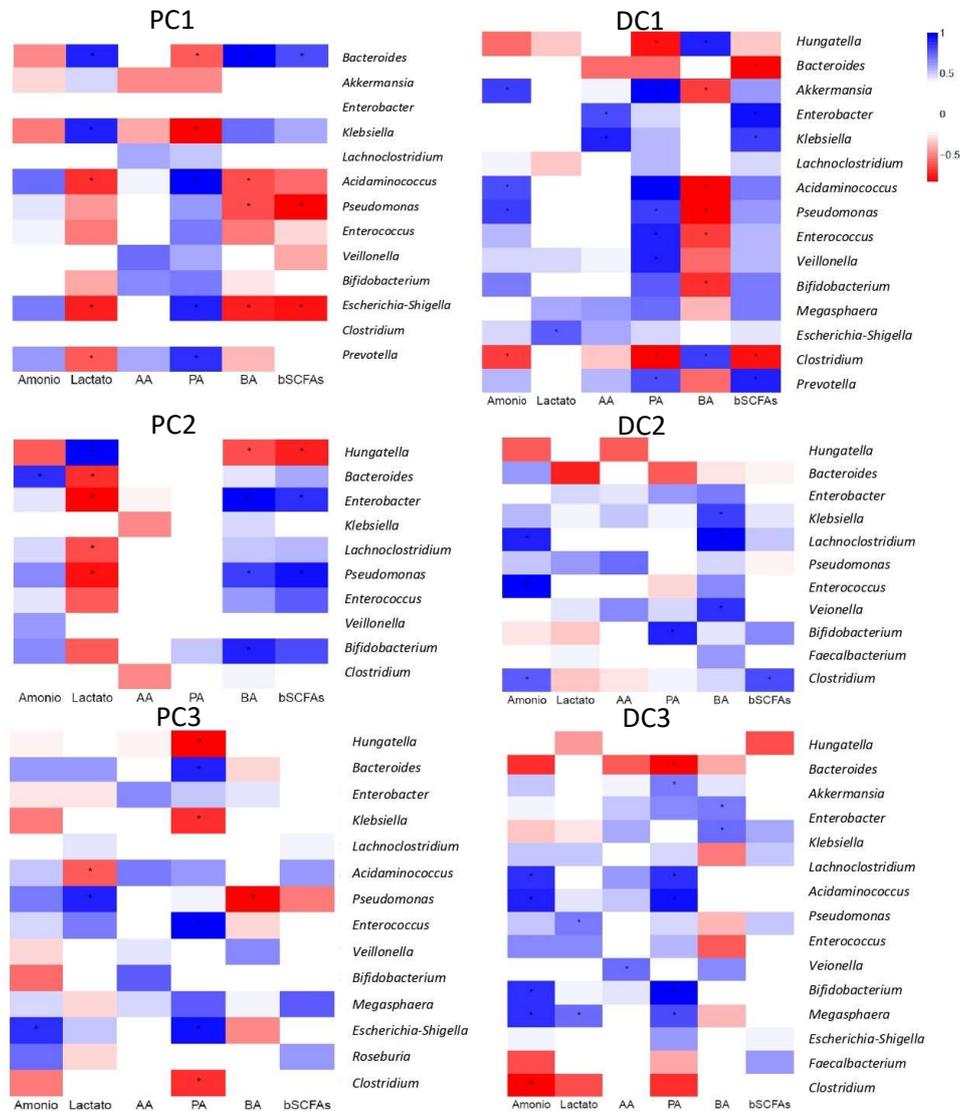


FIGURA 4. Correlación de Spearman entre los taxones identificados y los metabolitos detectados. Los asteriscos indican correlaciones significativas con un coeficiente de Spearman superior a 0,7 o inferior a -0,7)

4. CONCLUSIONES

Para concluir, si bien estos análisis sugieren que la suplementación con la cepa de *Bifidobacterium* estudiada en sujetos con FQ daría lugar a un aumento de la producción microbiana de SCFAs, lo cual se relaciona con una mejora de la disbiosis, es importante tener en cuenta otros posibles cambios perjudiciales sobre la microbiología intestinal. Además, cabe señalar la respuesta variable de la microbiota de los sujetos de estudio ante la administración de una misma cepa probiótica, lo cual sugiere que el abordaje para modular esta microbiota, incluyendo qué cepa seleccionar, debe ser personalizado y teniendo en cuenta sus características clínicas.

El conjunto de variables que intervienen sobre este ecosistema es muy amplio y sujeto-dependientes, lo cual dificulta encontrar correlaciones significativas. Por ello, la evidencia continúa siendo insuficiente y es necesario seguir investigando antes de poder recomendar específicamente la administración de probióticos para el tratamiento de la disbiosis intestinal en la fibrosis quística.

5. REFERENCIAS

- Adorno, M. A. T., Hirasawa, J. S., & Varesche, M. B. A. (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*, 05(07), 406–414. <https://doi.org/10.4236/ajac.2014.57049>
- Aspinall, S. A., Mackintosh, K. A., Hill, D. M., Cope, B., & McNarry, M. A. (2022). Evaluating the Effect of Kaftrio on Perspectives of Health and Wellbeing in Individuals with Cystic Fibrosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(10), 6114. <https://doi.org/10.3390/ijerph19106114>
- Ballan, R., Battistini, C., Xavier-Santos, D., & Saad, S. M. I. (2020). *Interactions of probiotics and prebiotics with the gut microbiota* (pp. 265–300). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.03.008>
- Beyhan, Y. E., & Yildiz, M. R. (2023). Microbiota and parasite relationship. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 106(4), 115954. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115954>
- Bondue, P., Lebrun, S., Taminiau, B., Everaert, N., LaPointe, G., Hendrick, C., Gaillez, J., Crèvecoeur, S., Daube, G., & Delcenserie, V. (2020). Effect of Bifidobacterium crudilactis and 3'-sialyllactose on the toddler microbiota using the SHIME® model. *Food Research International*, 138, 109755. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109755>
- 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. *Digestive Diseases and Sciences*, 68(5), 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., Thomas, T., & Ooi, C. Y. (2019). Gut Microbiota in Children With Cystic Fibrosis: A Taxonomic and Functional Dysbiosis. *Scientific Reports*, *9*(1), 18593. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55028-7>
- de Freitas, M. B., Moreira, E. A. M., Tomio, C., Moreno, Y. M. F., Daltoe, F. P., Barbosa, E., Ludwig Neto, N., Buccigrossi, V., & Guarino, A. (2018). Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. *PLOS ONE*, *13*(6), e0198457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198457>
- Ferrer, M., Martins dos Santos, V. A., Ott, S. J., & Moya, A. (2014). Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy. *Gut Microbes*, *5*(1), 64–70. <https://doi.org/10.4161/gmic.27128>
- Firrman, J., Liu, L., Mahalak, K., Hu, W., Bittinger, K., Moustafa, A., Jones, S. M., Narrowe, A., & Tomasula, P. (2023). An in vitro analysis of how lactose modifies the gut microbiota structure and function of adults in a donor-independent manner. *Frontiers in Nutrition*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1040744>
- Françoise, A., & Héry-Arnaud, G. (2020). The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes*, *11*(5), 536. <https://doi.org/10.3390/genes11050536>
- García-Mantrana, I., Alcántara, C., Selma-Royo, M., Boix-Amorós, A., Dzidic, M., Gimeno-Alcañiz, J., Úbeda-Sansano, I., Sorribes-Monrabal, I., Escuriet, R., Gil-Raga, F., Parra-Llorca, A., Martínez-Costa, C., & Collado, M. C. (2019). MAMI: a birth cohort focused on maternal-infant microbiota during early life. *BMC Pediatrics*, *19*(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1502-y>
- Gilbert, B., Kaiko, G., Smith, S., & Wark, P. (2023a). A systematic review of the colorectal microbiome in adult cystic fibrosis patients. *Colorectal Disease*, *25*(5), 843–852. <https://doi.org/10.1111/codi.16472>
- Gilbert, B., Kaiko, G., Smith, S., & Wark, P. (2023b). A systematic review of the colorectal microbiome in adult cystic fibrosis patients. *Colorectal Disease*, *25*(5), 843–852. <https://doi.org/10.1111/codi.16472>
- Gościniak, A., Eder, P., Walkowiak, J., & Cielecka-Piontek, J. (2022). Artificial Gastrointestinal Models for Nutraceuticals Research—Achievements and Challenges: A Practical Review. *Nutrients*, *14*(13), 2560. <https://doi.org/10.3390/nu14132560>
- Korpela, K. (2018). Diet, Microbiota, and Metabolic Health: Trade-Off Between Saccharolytic and Proteolytic Fermentation. *Annual Review of Food Science and Technology*, *9*(1), 65–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012830>
- Kristensen, M., Prevaes, S. M. P. J., Kalkman, G., Tramper-Stranders, G. A., Hasrat, R., de Winter- de Groot, K. M., Janssens, H. M., Tiddens, H. A., van Westreenen, M., Sanders, E. A. M., Arets, B., Keijser, B., van der Ent, C. K., & Bogaert, D. (2020). Development of the gut microbiota in early life: The impact of cystic fibrosis and antibiotic treatment. *Journal of Cystic Fibrosis*, *19*(4), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.04.007>

- Lkhagva, E., Chung, H.-J., Ahn, J.-S., & Hong, S.-T. (2021). Host Factors Affect the Gut Microbiome More Significantly than Diet Shift. *Microorganisms*, 9(12), 2520. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122520>
- Martín-Núñez, G. M., Cornejo-Pareja, I., Clemente-Postigo, M., Tinahones, F. J., & Moreno-Indias, I. (2021). Helicobacter pylori Eradication Therapy Affect the Gut Microbiota and Ghrelin Levels. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.712908>
- Moens, F., Van den Abbeele, P., Basit, A. W., Dodoo, C., Chatterjee, R., Smith, B., & Gaisford, S. (2019). A four-strain probiotic exerts positive immunomodulatory effects by enhancing colonic butyrate production in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.020>
- Moya, A., & Ferrer, M. (2016). Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. *Trends in Microbiology*, 24(5), 402–413. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.002>
- Nissen, L., Casciano, F., & Gianotti, A. (2020). Intestinal fermentation *in vitro* models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review. *FEMS Microbiology Letters*, 367(12). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa097>
- Nogal, A., Valdes, A. M., & Menni, C. (2021). The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. *Gut Microbes*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1897212>
- Ong, T., & Ramsey, B. W. (2023). Cystic Fibrosis. *JAMA*, 329(21), 1859. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.8120>
- Peterson, C. T., Perez Santiago, J., Iablokov, S. N., Chopra, D., Rodionov, D. A., & Peterson, S. N. (2022). Short-Chain Fatty Acids Modulate Healthy Gut Microbiota Composition and Functional Potential. *Current Microbiology*, 79(5), 128. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02825-5>
- Price, C. E., & O'Toole, G. A. (2021). The Gut-Lung Axis in Cystic Fibrosis. *Journal of Bacteriology*, 203(20). <https://doi.org/10.1128/JB.00311-21>
- 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 Microbiology*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-6>
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Schippa, S., Iebba, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., De Biase, R. V., Stamato, A., Bertasi, S., Lucarelli, M., Conte, M. P., & Quattrucci, S. (2013). Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Allelic Variants Relate to Shifts in Faecal Microbiota of Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE*, 8(4), e61176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061176>

- Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*, *69*(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- Shteinberg, M., & Taylor-Cousar, J. L. (2020). Impact of CFTR modulator use on outcomes in people with severe cystic fibrosis lung disease. *European Respiratory Review*, *29*(155), 190112. <https://doi.org/10.1183/16000617.0112-2019>
- Tam, R. Y., van Dorst, J. M., McKay, I., Coffey, M., & Ooi, C. Y. (2022). Intestinal Inflammation and Alterations in the Gut Microbiota in Cystic Fibrosis: A Review of the Current Evidence, Pathophysiology and Future Directions. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(3), 649. <https://doi.org/10.3390/jcm11030649>
- Thavamani, A., Salem, I., Sferra, T. J., & Sankararaman, S. (2021). Impact of Altered Gut Microbiota and Its Metabolites in Cystic Fibrosis. *Metabolites*, *11*(2), 123. <https://doi.org/10.3390/metabo11020123>
- van Dorst, J. M., Tam, R. Y., & Ooi, C. Y. (2022). What Do We Know about the Microbiome in Cystic Fibrosis? Is There a Role for Probiotics and Prebiotics? *Nutrients*, *14*(3), 480. <https://doi.org/10.3390/nu14030480>
- Vince, A. J., & Burridge, S. M. (1980). Ammonia production by intestinal bacteria: the effects of lactose, lactulose and glucose. *Journal of Medical Microbiology*, *13*(2), 177–191. <https://doi.org/10.1099/00222615-13-2-177>
- Wang, Y., Leong, L. E. X., Keating, R. L., Kanno, T., Abell, G. C. J., Mobegi, F. M., Choo, J. M., Wesselingh, S. L., Mason, A. J., Burr, L. D., & Rogers, G. B. (2019). Opportunistic bacteria confer the ability to ferment prebiotic starch in the adult cystic fibrosis gut. *Gut Microbes*, *10*(3), 367–381. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1534512>
- Willis, A. D. (2019). Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02407>
- Wolfe, W., Xiang, Z., Yu, X., Li, P., Chen, H., Yao, M., Fei, Y., Huang, Y., Yin, Y., & Xiao, H. (2023). The Challenge of Applications of Probiotics in Gastrointestinal Diseases. *Advanced Gut & Microbiome Research*, *2023*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2023/1984200>
- Zemanick, E. T., Wagner, B. D., Robertson, C. E., Stevens, M. J., Szeffler, S. J., Accurso, F. J., Sagel, S. D., & Harris, J. K. (2015). Assessment of Airway Microbiota and Inflammation in Cystic Fibrosis Using Multiple Sampling Methods. *Annals of the American Thoracic Society*, *12*(2), 221–229. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201407-310OC>