



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Digestibilidad y capacidad prebiótica de fuentes vegetales
ricas en grasa y fibra en individuos con fibrosis quística

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Escudero Urrea, Aida

Tutor/a: Andrés Grau, Ana María

Cotutor/a externo: Asensio Grau, Andrea

Director/a Experimental: Viteri Echeverría, Jazmín Dayumara

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

DIGESTIBILIDAD Y CAPACIDAD PREBIÓTICA DE FUENTES VEGETALES RICAS EN GRASA Y FIBRA EN INDIVIDUOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva que afecta principalmente a los pulmones, pero también al páncreas, hígado e intestino, originando secreciones anómalas y espesas de las glándulas exocrinas. A nivel digestivo, estas secreciones limitan la llegada del jugo pancreático y biliar al duodeno, dando lugar a una maldigestión y malabsorción de macro y micronutrientes, y en especial de las grasas. Asimismo, los enfermos de FQ presentan a menudo una microbiota colónica disbiótica consecuencia, entre otros factores, de una dieta rica en grasa y de una ingesta deficiente en fibra. Así, el objetivo general de este estudio es analizar los potenciales beneficios derivados del consumo de alimentos vegetales ricos en grasa y fibra (almendra, avellana, cacahuete, nuez, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo). Para ello, se realizarán ensayos *in vitro* de digestibilidad y de fermentación colónica simulando las condiciones gastrointestinales propias de la FQ. Concretamente, se determinará tras la etapa de digestión gastrointestinal: el índice de degradación de la matriz, la digestibilidad de proteína y lípidos, mientras que tras la etapa de fermentación colónica *in vitro* se analizarán los cambios en el perfil de la microbiota mediante secuenciación del gen ARNr 16S así como la producción de amonio, lactato y ácidos grasos de cadena corta como consecuencia de la fermentación colónica. Los resultados evidenciaron la influencia directa de las condiciones gastrointestinales FQ que dificultan la digestibilidad de lípidos y proteínas, y afectando en gran medida la bioaccesibilidad de macronutrientes. En concreto, se observó cómo, bajo estas condiciones, existe una mayor influencia de la matriz alimentaria en términos de digestibilidad de lípidos. En este sentido, la semilla de girasol fue la muestra que mayor degradación de la matriz, mejor digestibilidad de lípidos y proteínas presentó al ser digerida en condiciones FQ. Asimismo, se vio también la capacidad moduladora de estos alimentos, ricos en fibra y grasa, sobre la composición y abundancia de la microbiota colónica, observándose el impacto negativo que tiene la presencia de grasa no digerida sobre la microbiota. Concretamente, se observó una reducción de algunos géneros antiinflamatorios como *Bacteroides* y *Alistipes* y un aumento de algunos géneros proinflamatorios como *Acidaminococcus* y *Prevotella*. Se pudo observar también como la fibra de los frutos secos y semillas, fue utilizada por la microbiota para la producción de ácidos grasos de cadena corta, siendo también la semilla de girasol la que obtuvo, bajo condiciones gastrointestinales FQ, la mayor concentración.

PALABRAS CLAVE: Fibrosis quística; digestibilidad; capacidad prebiótica; microbiota; disbiosis; fibra; grasas.

DIGESTIBILITAT I CAPACITAT PREBIÒTICA DE FONTS VEGETALS RIQUES EN GREIX I FIBRA EN INDIVIDUIS AMB FIBROSI QUÍSTICA

RESUM

La fibrosi quística (FQ) és una malaltia genètica d'herència autosòmica recessiva que afecta principalment els pulmons, però també al pàncrees, fetge i intestí, originant secrecions anòmales i espesses de les glàndules exocrines. A nivell digestiu, aquestes secrecions limiten l'arribada del suc pancreàtic i biliar al duodè, donant lloc a una maldigestió i malabsorció de macro i micronutrients, i especialment dels greixos. Així mateix, els malalts de FQ presenten sovint una microbiota colònica disbiòtica conseqüència, entre altres factors, d'una dieta rica en greix i d'una ingesta deficient en fibra. Així, l'objectiu general d'aquest estudi és analitzar els potencials beneficis derivats del consum d'aliments vegetals rics en greix i fibra (ametlla, avellana, cacauet, nou, llavor de gira-sol, llavor de carabassa i llavor de sèsam). Per a això, es realitzaran assajos *in vitro* de digestibilitat i de fermentació colònica simulant les condicions gastrointestinals pròpies de la FQ. Concretament, es determinarà després de l'etapa de digestió gastrointestinal: l'índex de degradació de la matriu, la digestibilitat de proteïna i lípids, mentre que després de l'etapa de fermentació colònica *in vitro* s'analitzaran els canvis en el perfil de la microbiota mitjançant seqüenciació del gen ARNr 16S així com la producció d'amoni, lactat i àcids grassos de cadena curta a conseqüència de la fermentació colònica. Els resultats van evidenciar la influència directa de les condicions gastrointestinals FQ que dificulten la digestibilitat de lípids i proteïnes, i afectant en gran manera la bioaccessibilitat de macronutrients. En concret, es va observar com, sota aquestes condicions, existeix una major influència de la matriu alimentària en termes de digestibilitat de lípids. En aquest sentit, la llavor de gira-sol va ser la mostra que major degradació de la matriu, millor digestibilitat de lípids i proteïnes va presentar en ser digerida en condicions FQ. Així mateix, es va veure també la capacitat moduladora d'aquests aliments, rics en fibra i grassa, sobre la composició i abundància de la microbiota colònica, observant-se l'impacte negatiu que té la presència de greix no digerit sobre la microbiota. Concretament, es va observar una reducció d'alguns gèneres antiinflamatoris com *Bacteroides* i *Alistipes* i un augment d'alguns gèneres proinflamatoris com *Acidaminococcus* i *Prevotella*. Es va poder observar també com la fibra de la fruita seca i llavors, va ser utilitzada per la microbiota per a la producció d'àcids grassos de cadena curta, sent també la llavor de gira-sol la que va obtenir, baix condicions gastrointestinals FQ, la major concentració.

PARAULES CLAU: Fibrosi quística; digestibilitat; capacitat prebiòtica; microbiota; disbiosi; fibra; greixos.

DIGESTIBILITY AND PREBIOTIC CAPACITY OF VEGETABLE SOURCES RICH IN FAT AND IN INDIVIDUALS WITH CYSTIC FIBROSIS

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease of autosomal recessive inheritance that mainly affects the lungs, but also the pancreas, liver and intestine, causing abnormal and thick secretions from the exocrine glands. At the digestive level, these secretions limit the flow of pancreatic and biliary juices into the duodenum, leading to maldigestion and malabsorption of macro- and micronutrients, especially fats. Likewise, CF patients often present a dysbiotic colonic microbiota consequently, among other factors, of a diet rich in fat and a deficient fiber intake. Thus, the overall objective of this study is to analyze the potential benefits derived from the consumption of plant foods rich in fat and fiber (almond, hazelnut, peanut, walnut, sunflower seed, pumpkin seed and sesame seed). For this purpose, *in vitro* digestibility and colonic fermentation tests will be carried out simulating the gastrointestinal conditions typical of CF. Specifically, the following will be determined after the gastrointestinal digestion stage: the rate of matrix degradation, protein and lipid digestibility, while after the *in vitro* colonic fermentation stage, changes in the microbiota profile will be analyzed by 16S rRNA gene sequencing as well as the production of ammonium, lactate and short-chain fatty acids as a consequence of colonic fermentation. The results evidenced the direct influence of CF gastrointestinal conditions that hinder the digestibility of lipids and proteins, and greatly affect the bioaccessibility of macronutrients. Specifically, it was observed how, under these conditions, there is a greater influence of the food matrix in terms of lipid digestibility. In this sense, sunflower seed was the sample that showed the greatest degradation of the matrix and the best lipid and protein digestibility when digested under CF conditions. Likewise, the modulating capacity of these foods, rich in fiber and fat, on the composition and abundance of the colonic microbiota was also observed, showing the negative impact that the presence of undigested fat has on the microbiota. Specifically, a reduction of some anti-inflammatory genera such as *Bacteroides* and *Alistipes* and an increase of some pro-inflammatory genera such as *Acidaminococcus* and *Prevotella* were observed. It was also observed how the fiber of nuts and seeds was used by the microbiota for the production of short-chain fatty acids, being also the sunflower seed the one that obtained, under CF gastrointestinal conditions, the highest concentration.

KEY WORDS: Cystic fibrosis; digestibility; prebiotic potential; microbiota; dysbiosis; fiber; fats.

AGRADECIMIENTOS

Un día pones el primer pie en la que va a ser tu casa durante los próximos cuatro años y así, sin darte ni cuenta, de repente te encuentras escribiendo tu trabajo fin de grado, siendo una versión totalmente mejorada de la niña que llegó a Valencia, con mascarilla, ilusión y un poco de miedo, a estudiar Biotecnología.

Quería agradecer a todos y cada uno de los profesores y profesoras que me han brindado su conocimiento y han hecho que me enamore un poco más de este apasionante mundo.

Asimismo, me gustaría agradecer la inestimable ayuda de mis tutoras, Andrea Asensio y Ana Andrés, puesto que sin ellas este trabajo no hubiera salido adelante. Asimismo, me gustaría agradecer a Ana Heredia por su confianza y ayuda brindada. También, agradecer a todas las personas que forman parte del laboratorio y que en algún momento me han ofrecido su ayuda y conocimientos. En especial, a mi directora experimental Jazmín, por su paciencia conmigo y por hacer el día a día en el laboratorio un poco más divertido. Nunca olvidaré según que experiencias en el laboratorio (con un aroma característico) contigo.

No puedo dejar de agradecer a mi grupo de amigos de la universidad. Nunca hubiera imaginado conectar tanto con nadie como lo he hecho con vosotros y habéis hecho que mis cuatro años en Valencia hayan sido la mejor experiencia que he vivido hasta el momento porque, aunque haya habido muchos momentos difíciles... agobio de muchos, consuelo de tontos. Siempre seremos los primos. Os quiero y ya os echo de menos.

A ti, Andrea la Migueltureña, la persona que ha aguantado mis agobios de primera mano. Gracias por hacer que este último año haya sido un poquito mejor con nuestros cooking mama los domingos, las clases de spinning, y los “bueno la cocina se va de viaje”. Te espero en Barcelona.

A mi mejor amiga, Alba, que a pesar de la distancia sigues presente cada día. Gracias por escuchar cada uno de mis audios (o podcasts), por hacerme reír siempre y por hacerme sentir, cada vez que vuelvo a la isla, como si no hubiera pasado el tiempo.

A mi familia, a los que están y los que no, no podría haberme tocado una mejor. Gracias por haber hecho que sea la persona que soy hoy en día y apoyarme en cada decisión que tomo. Que sepáis que por muy lejos que me lleven mis sueños, siempre sabré cual es el camino que me lleve a casa.

A mi padre, en especial, que, aunque la vida nos haya puesto en momentos complicados, siempre has sabido como gestionarlos y ayudarnos a nosotros a hacerlo. Gracias por apoyarnos en todo lo que nos proponemos y por confiar más en mí de lo que yo lo hago. Y a ti Xavi, gracias por ser mi hermano y mejor amigo y siempre sacarme una sonrisa.

A ti mamá, que allá donde estés te sientas orgullosa. Te echamos de menos.

Y a ti, mi querida Valencia, volveré, porque uno siempre vuelve dónde fue feliz.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2.OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1 Materiales	6
3.2 Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	7
3.3 Fermentación colónica <i>in vitro</i>	8
3.4. Determinaciones analíticas	9
3.4.1 <i>Índice de degradación de la matriz (IDM (%))</i>	9
3.4.2 <i>Digestibilidad de los lípidos</i>	9
3.4.3 <i>Digestibilidad de las proteínas</i>	10
3.4.4 <i>Metabolitos producidos durante la fermentación colónica</i>	10
3.4.4.1 <i>Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)</i>	10
3.4.4.2 <i>Lactato</i>	11
3.4.4.3 <i>Amonio</i>	11
3.4.5 <i>Composición de la microbiota colónica</i>	11
3.4.6. <i>Análisis estadístico</i>	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1 Influencia de las matrices alimentarias y las condiciones gastrointestinales sobre la digestibilidad de macronutrientes.	12
4.2 Influencia de las matrices alimentarias y las condiciones gastrointestinales sobre la microbiota colónica.	19
6. REFERENCIAS	32
7. ANEXOS	I
7.1 ANEXO I. Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030.	I
7.2 ANEXO II. Hoja de información para los padres/representantes legales de los donantes.....	II
7.3 ANEXO III. Turnitin.....	VII

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribución de las especies lipídicas (concentración molar (%)) de los frutos secos y semillas (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) previo a la digestión. TG: triglicéridos; 1-3 DG: diglicéridos 1-3; 1-2: diglicéridos 1-2; 2 MG: 2-monoglicéridos; 1 MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres..... 13
- Figura 2.** Índice de degradación de la matriz (IDM) de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo)15
- Figura 3.** Proteólisis (porcentaje de aminoácidos solubles en TCA (mg tirosina /g de alimento)) de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo).....16
- Figura 4.** Lipólisis (concentración molar (%)) de frutos secos y semillas (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) posterior a la digestión gastrointestinal bajo las diferentes condiciones. TG: triglicéridos; 1-3 DG: diglicéridos 1-3; 1-2: diglicéridos 1-2; 2 MG: 2-monoglicéridos; 1 MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres. A) Condiciones gastrointestinales estándar; B) Condiciones gastrointestinales FQ. (A-D): Letras mayúsculas distintas reflejan diferencias significativas entre frutos secos y semillas bajo cada condición con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$)..... 18
- Figura 5.** Abundancia relativa de la composición de la microbiota a nivel de filos tras la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco o semilla (almendra, avellana, cacahuete, nuez, semilla de girasol y semilla de sésamo) y bajo cada condición gastrointestinal (estándar y FQ). A): condición estándar; B): condición FQ. 23
- Figura 6.** Abundancia relativa en composición de la microbiota a nivel de géneros tras la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco o semilla (almendra, avellana, cacahuete, nuez, semilla de girasol y semilla de sésamo) y bajo cada condición gastrointestinal (estándar y FQ). A) condición estándar; B) condición FQ. 25
- Figura 7.** Concentración (Mm) de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por la microbiota tras la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerida obtenida tras la digestión gastrointestinal *in vitro* bajo cada condición (estándar y FQ). Ácidos grasos de cadena corta lineales (ácido butírico, ácido propiónico y ácido acético); ácidos grasos de cadena corta ramificados (ácido isocaproico, ácido isovalérico y ácido isobutírico) 28
- Figura 8.** Concentración de metabolitos producidos por la microbiota intestinal durante la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo cada condición estudiada (condición gastrointestinal estándar y FQ). A) concentración de lactato (μM) en condiciones gastrointestinales estándar; B) concentración de lactato (μM) en condiciones gastrointestinales FQ; C) concentración de amonio (mM) en condiciones gastrointestinales estándar; D) concentración de amonio (mM) en condiciones gastrointestinales FQ 30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de cada fruto seco (almendra, avellana, nuez, cacahuete) y semilla (girasol, calabaza y sésamo) en términos de contenido en agua, lípidos y fibra expresados en g/100g de alimento.....	6
Tabla 2. Composición de las disoluciones stock de sales utilizados para la preparación de los fluidos digestivos simulados (SSS, SGS, SIS) en mmol/L.....	7
Tabla 3. Diversidad α (índice Shannon e Índice Chao1) de la microbiota colónica tras la fermentación colónica <i>in vitro</i> de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo cada condición gastrointestinal (estándar y FQ).....	20
Tabla 4. Diferencias significativas (Two-way ANOVA) en los filos de la microbiota colónica tras la fermentación colónica <i>in vitro</i> con los diferentes frutos secos (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo las dos condiciones (estándar y FQ) en comparación con el control con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). 23	
Tabla 5. Diferencias significativas (Two-way ANOVA) en los géneros de la microbiota colónica tras la fermentación colónica <i>in vitro</i> de los diferentes frutos secos y semillas (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo las dos condiciones (estándar y FQ) en comparación con el control con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).	25

1. INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad de origen genético, heredada de forma autosómica recesiva. Su causa radica en mutaciones en el gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), localizado en el cromosoma 7q31.2. Este gen es el responsable de la producción de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana asociada a la fibrosis quística. Las mutaciones en este gen provocan la síntesis de una proteína defectuosa que conlleva a una deficiente o nula actividad de los canales iónicos de sodio y cloruro a lo largo de las membranas celulares (Dickinson et al., 2021). Como consecuencia se genera un moco espeso que lleva a la obstrucción de diferentes conductos del organismo, como vías respiratorias o conductos a nivel digestivo. El gen CFTR se expresa en múltiples órganos, lo que explica la gran variedad de afecciones relacionadas con la enfermedad, viéndose afectados los sistemas pulmonar, endocrino, gastrointestinal, pancreático, biliar y reproductivo. Por consiguiente, esta enfermedad se puede clasificar también como multisistémica. Aun siendo una enfermedad rara, hay alrededor de 70000 personas afectadas en todo el mundo y se estima que se suman aproximadamente 1000 casos cada año, siendo más común la enfermedad en población blanca de ascendencia norte europea, con 1 cada 2000-3000 nacimientos, y menos en asiático-americanos, con 1 cada 30000 recién nacidos (Rafeeq et al., 2017).

Los síntomas relacionados con la FQ aparecen a lo largo de la vida, con gran variabilidad en síntomas y momento de aparición en función del paciente. Aunque se trate de una enfermedad multisistémica, los principales síntomas se reflejan en los sistemas respiratorio y gastrointestinal. A nivel respiratorio, la enfermedad pulmonar es la principal causa de morbilidad y mortalidad. Se caracteriza por una infección crónica de las vías respiratorias y una inflamación que conlleva a bronquiectasias. Los síntomas cotidianos a medida que progresa la enfermedad son tos y producción de esputo, así como frecuentes infecciones bacterianas que se resuelven con terapia antibiótica constante (Fajas et al., 2017).

Por lo que respecta a la afección intestinal, la insuficiencia pancreática exocrina (EPI) está presente en aproximadamente el 80-90% de los pacientes con FQ. Un páncreas funcional secreta en el duodeno enzimas digestivas y bicarbonato para la digestión de macronutrientes tales como proteínas, grasas y almidón. En pacientes con FQ, la densidad de las secreciones conduce a la obstrucción de los conductos intrapancreáticos, lo que provoca una disminución en la liberación de enzimas digestivas hacia el duodeno y por tanto una menor digestibilidad y absorción de macro y micronutrientes y en especial de las grasas y componentes liposolubles, debida en parte por una acidificación intestinal. Como consecuencia de esta acidificación, la lipasa, enzima digestiva encargada de digerir los lípidos, es inactivada de forma irreversible a un pH por debajo de 4. Asimismo, los ácidos biliares conjugados con glicina precipitan fuera de una solución acuosa, resultado en una menor concentración biliar en disolución, lo que provoca un deterioro en la formación de micelios mediada por los mismos y, por tanto, una hidrólisis y absorción de lípidos reducida. Entre el 10-35% de los pacientes que manifiestan EPI presentan deficiencias en vitaminas liposolubles (A, D, E y K). Es por esto por lo que se les recomienda suplementación vitamínica (Ritivoiu et al., 2023).

Por otro lado, los afectados experimentan también una motilidad gastrointestinal anormal que produce una ralentización estomacal que puede afectar a la aparición temprana de saciedad y, por tanto, la limitación de la ingesta de alimentos totales (Mariotti et al., 2023). Además, dado que las infecciones pulmonares con las que cursa la enfermedad pueden provocar una disminución del apetito y vómitos, puede verse la malnutrición aún más acentuada, dando lugar a un ciclo de infección y desnutrición (Ratjen y Döring, 2003). Asimismo, los individuos con FQ presentan un gasto

incrementado de energía basal resultante de las recurrentes infecciones pulmonares crónicas y los grandes esfuerzos requeridos para la respiración. Todo esto contribuye a que no se consiga satisfacer las elevadas demandas energéticas, siendo esto especialmente preocupante en etapas tempranas de desarrollo como la niñez y adolescencia (Kaminski et al., 2019).

Es por esto por lo que las recomendaciones nutricionales en estos pacientes representan un factor clave en la práctica clínica. En relación con este aspecto, las directrices de consenso europeas y americanas recomiendan que los niños con FQ alcancen más del 120% de sus necesidades energéticas a través de la dieta. Además, se recomienda una dieta rica en grasas y proteínas. En general, el 35-40% de las calorías en una dieta FQ son obtenidas a través de las grasas, en una ingesta mayor que la recomendada para personas sanas. En relación con las grasas, los pacientes de FQ suelen consumir alimentos formulados con grasas de baja calidad nutricional como lo son las saturadas (Strandvik et al., 2022). Este hecho puede causar anomalías lipídicas conllevando a una desviación de la relación entre triglicéridos y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), ambos asociados con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Woestenenk et al., 2017). Es por esto por lo que la calidad de las grasas ingeridas debe ser tomada en cuenta en el manejo de esta enfermedad. Con respecto a las proteínas, su ingesta ha de ser más elevada en pacientes FQ que en la población sana, con el objetivo de prevenir la pérdida de masa muscular, de manera que en la dieta de estos pacientes las proteínas deben representar aproximadamente entre el 15-20% de las calorías totales (Mariotti et al., 2023). Sin embargo, este exceso calórico puede conducir a largo plazo a la aparición de obesidad y sus complicaciones asociadas como la resistencia a la insulina, dislipidemia y enfermedad cardiovascular (Kutney et al., 2021).

Por otra parte, la terapia de reemplazo de enzima pancreática (PERT) es un tratamiento necesario en el manejo del estado nutricional adecuado en la FQ. PERT hace referencia a la administración oral de enzimas pancreáticas de manera exógena, especialmente lipasa y proteasa, al lumen del duodeno, con el objetivo de asegurar la digestión correcta de grasas y proteínas (Kaminski et al., 2019). Estas enzimas pancreáticas se administran en forma de microtabletas con un recubrimiento entérico para protegerlas de la degradación del ácido gástrico asegurando así su activación en el ambiente alcalino del duodeno. La dosis de PERT recomendada por la American CF Foundation varía en función de la edad del paciente. Para niños menores de 12 meses se recomienda entre 2000-4000 unidades de lipasa por 120 ml de leche (de fórmula o de materna). Para niños de entre 1 a 4 años, las dosis de enzimas pancreáticas recomendadas son entre 2000-4000 unidades de lipasa por gramo de grasa ingerida, mientras que niños mayores de 4 años deberían recibir 500 unidades de lipasa por quilogramo de peso y por comida (Mariotti et al., 2023). Entre las consecuencias de esta enfermedad a nivel digestivo se encuentra también la disbiosis de la microbiota intestinal. Esta condición se ve agravada por la dieta hipercalórica, elevada en grasas y proteínas y, en consecuencia, baja en fibra, que llevan los pacientes. Concretamente, este tipo de dietas puede presentar un efecto negativo sobre la microbiota intestinal debido a que se produce una reducción de la fermentación de carbohidratos no digeribles o fibras, que da lugar a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), relacionados con efectos beneficiosos para la salud (Ventimilla-Gozalbo et al., 2021). Asimismo, tal y como se ha comentado anteriormente, los tratamientos frecuentes y prolongados de antibióticos, con el objetivo de tratar las recurrentes infecciones pulmonares, exacerba aún más la disbiosis intestinal, tanto a nivel taxonómico como funcional en pacientes FQ en relación con pacientes sanos (Thavamani et al., 2021).

Los frutos secos son alimentos ricos en nutrientes, caracterizados por un perfil saludable de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), fitonutrientes beneficiosos y una amplia gama de vitaminas y minerales esenciales. Después de los cereales, constituyen el grupo de alimentos

vegetales con mayor cantidad de fibra dietética. Por su parte las semillas, son también alimentos de alta densidad nutricional, y se caracterizan por un perfil lipídico saludable, monoinsaturado (MUFA) y poliinsaturados (PUFA), que se relacionan con el mantenimiento de una dieta saludable. De la misma forma que los frutos secos, presentan un elevado contenido en fibra debido a la pared celular que compone sus células (Alasalvar et al., 2021).

La estructura celular de los frutos secos y semillas hace que sean de difícil digestión en comparación con otras estructuras alimentarias. Si a esto se unen condiciones digestivas subóptimas como las que se dan en FQ, esto puede reducir aún más los beneficios derivados de su ingesta como consecuencia de una maldigestión y malabsorción. Además, la extensión de la hidrólisis de los nutrientes y su absorción en la digestión luminal pre-colónica va a condicionarla composición de la fracción de alimento no digerida que llegará al colon y que será metabolizada por la microbiota intestinal para producir metabolitos relevantes para la salud humana como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Mandalari et al., 2023) (De Souza et al., 2017). Podría ser de gran ayuda conocer mediante ensayos comparativos como diferentes matrices alimentarias son digeridas en condiciones FQ y su impacto sobre la microbiota intestinal de cara a establecer recomendaciones dietéticas para estos individuos (Mandalari, et al., 2023).

En las últimas décadas, ha crecido el interés en entender el proceso de digestión de los alimentos con el fin de reforzar posibles efectos beneficiosos de éstos en la salud humana. Los métodos *in vivo*, que se basan en administrar alimentos a animales o humanos bajo condiciones controladas, son los que ofrecen la información más fiable sobre la digestión y absorción de nutrientes. Aun así, no siempre es posible utilizar este tipo de modelos, desde el punto de vista ético y económico (Zhou et al., 2023). Por esta razón, se han propuesto distintas aproximaciones *in vitro* orientadas a simular lo que sucede en el tracto gastrointestinal *in vivo* con diferentes grados de complejidad según el modelo (Dupont et al., 2019). Además, los métodos *in vitro* presentan la ventaja de ser más rápidos, económicos, permiten muestrear en diferentes puntos del proceso, y no cuentan con restricciones éticas (Minekus et al., 2014).

Existen diversos modelos de digestión *in vitro* que, los cuales se pueden clasificar en modelos estáticos y dinámicos. Estos modelos pretenden simular las condiciones fisiológicas de las fases oral, gástrica e intestinal. Por su parte, los métodos dinámicos han demostrado ser adecuados para simular la digestión de alimentos y productos farmacéuticos en condiciones más próximas a la complejidad fisiológica que los estáticos. Aun así, estos modelos dinámicos son relativamente complejos, requieren de equipamiento específico de elevado coste y difíciles de mantener. Así, los modelos estáticos, debido a su simplicidad, han ganado cada vez más relevancia para monitorizar ensayos comparativos de digestión en los que se pretende, sobre todo, digerir un amplio número de muestras de cara a una selección previa a ensayos dinámicos o en modelos animales. En relación a los modelos *in vitro* y en estático, cabe mencionar el desarrollo de un protocolo consensuado a nivel internacional por el consorcio INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), siendo es el método de simulación *in vitro* más utilizado actualmente (Zhou et al., 2023).

De la misma forma que en el proceso gastrointestinal, múltiples estrategias han sido desarrolladas para el estudio de la fermentación colónica que presentan como objetivo común el conocimiento de la microbiota y su funcionalidad. Entre ellas, se encuentran los métodos *in vitro*; que se diferencian en la complejidad del sistema (fermentación *batch* en estático y sistemas continuos), y los métodos *in vivo*: modelos animales y estudios en humanos. Aunque estos últimos sean los que mejor mimeticen las condiciones fisiológicas del tracto digestivo, los estudios *in vitro* son esenciales para conocer el potencial prebiótico o probiótico de diferentes alimentos de forma comparativa (Pérez-Burillo et al., 2021).

Los métodos de fermentación colónica *batch* en estático *in vitro*, son generalmente llevados a cabo en tubos de ensayo por lo que permiten el análisis conjunto de múltiples muestras en un corto periodo de tiempo (24 a 48 h) (Pérez-Burillo et al., 2021). En este método, cepas individuales o aisladas de muestras fecales son agregadas, a modo de inóculo, a un medio de cultivo, mezcla que posteriormente se incorpora al compuesto alimenticio de interés. A continuación, la mezcla se introduce en un fermentador anaeróbico cerrado o en un tubo sellado preservado a 37°C, que se mantiene en simulación durante 24h (Wang et al., 2022). En el presente trabajo se va a utilizar el método *batch* en estático *in vitro* para el estudio de la fermentación colónica de niños con FQ y el potencial prebiótico y de digestibilidad que pueden presentar los alimentos analizados sobre su microbiota intestinal.

2.OBJETIVOS

Tal y como se ha comentado anteriormente, las recomendaciones de dietas ricas en grasas y proteínas para pacientes con FQ provoca que su dieta sea pobre en carbohidratos, así como en grasas de elevada calidad nutricional. El presente trabajo, que ha sido realizado en el marco del proyecto Fibriotic, financiado por la UPV (PAID-06-22), tiene como objetivo general evaluar el impacto de diferentes fibras dietéticas, presentes en alimentos ricos en grasa, como son los frutos secos o las semillas, sobre la microbiota colónica de niños con FQ.

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el impacto de las condiciones gastrointestinales FQ (condiciones pre-colónicas) sobre la digestibilidad de la grasa y proteínas en comparación con las condiciones estándar de un adulto sano.
- Evaluar el impacto de la presencia de fibra sobre la digestibilidad de los lípidos y proteínas.
- Analizar la influencia de la grasa no digerida sobre la microbiota colónica de individuos FQ.
- Evaluar el potencial modulador del tipo de fibra sobre los cambios en la abundancia relativa de los filos y géneros de la microbiota colónica de individuos FQ y actividad metabólica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Para poder llevar a cabo la digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*, así como las determinaciones analíticas se adquirieron diferentes reactivos procedentes de las siguientes casas comerciales. Las sales de grado analítico (cloruro potásico, cloruro sódico y bicarbonato sódico), pancreatina de páncreas porcino (8 x USP, P7545), bilis bovina (desechada, no fraccionada, B3883), etanol (96%, grado HPLC), el ácido tricloroacético (TCA), el ácido etilendiaminoetraacético (EDTA, reactivo ACS, 99, 4-100), la urea (ReagentPlus®, ≥99,5%), la L-tirosina, el dietiléter (99,7%), diclorometano (>99,8%), el mix de ácidos grasos (46975-U, Sigma) y cloroformo deuterado (MagniSolv) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EE.UU). El NaOH (1N) y el HCl (1N) se adquirieron en AppliChem Panreac así como el suplemento enzimático comercial utilizado fue suministrado por el Hospital La Fe (Kreon® 10.000 LU, Maylan, Irlanda).

Por otro lado, las matrices alimentarias evaluadas fueron 4 frutos secos: almendra, avellana, cacahuete y nuez; y 3 semillas: de girasol, de calabaza y de sésamo. En concreto, todos los frutos secos y semillas se adquirieron en el supermercado Family Cash, al natural, sin sal añadida ni procesado. En todos los ensayos fueron utilizados los frutos secos y semillas del mismo lote.

La composición proximal de los frutos secos y semillas analizadas se muestra en la Tabla 1 de acuerdo con la información del etiquetado.

Tabla 1. Composición proximal de cada fruto seco (almendra, avellana, nuez, cacahuete) y semilla (girasol, calabaza y sésamo) en términos de contenido en agua, lípidos y fibra expresados en g/100g de alimento.

Alimento	Humedad (g/100 g)	Lípidos (g/100 g)	Proteína (g/100g)	Fibra (g/100g)
Almendra	4,33	50,00	21,00	12,00
Avellana	4,90	60,00	15,00	9,00
Nuez	2,78	60,00	13,30	6,70
Cacahuete	1,66	50,00	29,00	11,00
Semilla de girasol	4,10	50,00	22,00	18,00
Semilla de sésamo	4,80	46,10	33,30	2,00
Semilla de calabaza	1,51	48,00	28,00	12,00

3.2 Digestión gastrointestinal *in vitro*

Todos los frutos secos y semillas analizados (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) se digieren tanto en condiciones estándar publicadas por el grupo INFOGEST (Brodkorb et al., 2019) como FQ, cuyas condiciones se simulan aplicando diferentes modificaciones al protocolo estandarizado (Asensio-Grau et al., 2020). Estas consisten en la modificación del pH, siendo 7 en condiciones estándar y 6 en FQ; la concentración biliar, siendo 10 mM en condiciones estándar y 1 mM en condiciones FQ; y la utilización del suplemento KREON como fuente de pancreatina, en condiciones FQ, en lugar de pancreatina en la etapa intestinal, en condiciones estándar.

El protocolo seguido para llevar a cabo la digestión gastrointestinal *in vitro* se ha realizado de acuerdo con el método estandarizado publicado por el grupo INFOGEST (Minekus et.al 2014) con algunas modificaciones de Brodkorb, et al. (2019).

La Tabla 2 muestra la composición de las sales utilizadas en las disoluciones stock que se utilizarán posteriormente para preparar los fluidos gastrointestinales: stock salivar simulado (SSS), stock gástrico simulado (SGS) y stock intestinal simulado (SIS). A partir de estas disoluciones stock se simularon los fluidos utilizados en cada etapa de la digestión: fluido salivar simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS) y se procedió a realizar la digestión gastrointestinal *in vitro* como se indica a continuación:

Tabla 2. Composición de las disoluciones stock de sales utilizados para la preparación de los fluidos digestivos simulados (SSS, SGS, SIS) en mmol/L.

Electrolito	SSS mmol/L	SGS mmol/L	SIS mmol/L
KCl	15,10	6,90	6,80
KH ₂ PO ₄	3,70	0,90	0,80
NaHCO ₃	13,60	25,00	85,00
NaCl	-	47,20	38,40
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,12	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,50	-
HCl	1,10	15,60	8,40
CaCl ₂	1,50	0,15	-

Etapa Oral: Cada uno de los frutos secos y semillas (almendra, avellana, cacahuete, nuez, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) se homogenizaron con un molinillo de café (Jata ML-469 INOX 150W) con el objetivo de obtener un tamaño de partícula de alimento (>2 mm) y se introdujo en tubos Falcon de 50 ml la cantidad necesaria para obtener 2,5 g grasa por tubo. Posteriormente, se adicionó el SSS en una proporción 1:1 (p/v), se ajustó el pH a 7 y se homogenizó durante 2 minutos utilizando un vortex (Heidolph, Reax top) para así obtener un bolo con la consistencia adecuada para su deglución (Brodkorb et al., 2019).

Etapa Gástrica: Tras la fase oral, se adicionó el FGS a los tubos que contenían el bolo oral en proporción 1:1 (v/v) y se ajustó el pH a 3 con HCl 1M y se midió con un pHmetro (SevenCompact™ S210, Mettler Toledo). La pepsina contenida en el FGS se añadió para alcanzar una concentración de 2000 U/ml en la mezcla gástrica. Los tubos se introdujeron en el incubador (P-SELECTA, modelo Boxcult 3000957), simulando los movimientos peristálticos que tienen lugar *in vivo*, con un agitador rotativo (Intelli-Mixer RM-2) durante 2 horas a 37°C.

Etapa Intestinal: una vez finalizada la etapa gástrica, se adicionó el fluido intestinal simulado (FIS, pH 7) en una proporción 1:1 (v/v) a cada tubo que contenía el quimo gástrico. El pH de las mezclas fue ajustado con HCl 1M según la condición estudiada, a pH 6.0 en el caso de las condiciones de FQ y a pH 7 en el caso de las condiciones estándar. De la misma manera, la concentración de sales biliares también se añadió dependiendo de la condición estudiada, siendo 1 mM en la condición de FQ y 10 mM en la condición estándar. La pancreatina se añadió únicamente en las condiciones estándar (2000 UL/ml) mientras que en las condiciones de FQ se añadió KREON a una concentración de 2000 UL/g grasa. La administración de KREON se realiza en un rango comprendido entre 0 y 4000 UL/ grasa. Para este trabajo, se seleccionó una concentración media del rango. Una vez ajustado el pH con NaOH 1 M, los tubos se introdujeron en el incubador (P-SELECTA, modelo Boxcult 3000957) a 37°C durante 2 horas simulando los movimientos que tienen lugar in vivo mediante un agitador rotativo (Intelli-Mixer RM-2). Tras finalizar la digestión, se bajó la temperatura para posteriormente almacenar las muestras a -20°C para conservarlas para sus posteriores determinaciones.

3.3 Fermentación colónica *in vitro*

Las muestras previamente sometidas a la digestión gastrointestinal se pasaron a fermentación colónica utilizando el protocolo de Pérez-Burillo et al. (2019).

Previamente a la simulación se preparó por un lado el medio de cultivo a partir de una disolución de peptona (15 g de peptona en 800 ml de agua purificada), disolución reductora (312 mg de cisteína, 312 mg de sulfito de sodio hidratado en 2 ml de NaOH 1M junto con 48 ml de agua purificada previamente autoclavada) y disolución de Resazurina (2 mg sal sódica de Resazurina en 2 ml de agua purificada). Una vez preparadas la disolución de peptona y la disolución de Resazurina se autoclavaron antes de ser utilizadas mientras que la disolución de cisteína se añadió utilizando un filtro de jeringuilla esterilizante (Filtro inyección Sterifix) ya que la cisteína es sensible a las altas temperaturas. Finalmente, el medio de cultivo se preparó a partir de 1L de disolución de peptona con 5 ml de disolución reductora y 1,25 ml de disolución de Resazurina.

Por otro lado, también se preparó el inóculo fecal que contenía las bacterias utilizadas para la fermentación colónica. Para ello, en primer lugar, se reclutaron pacientes pediátricos con fibrosis quística cuyos tutores legales firmaron el consentimiento informado (Anexo II) para participar en el proyecto previamente aceptado por el comité de ética de la Universitat Politècnica de València (P03_25-07-2022). 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 presencia de dos mutaciones causantes de FQ en el gen CFTR y una confirmación de diagnóstico de insuficiencia pancreática exocrina (elastasa fecal <200µg/g en heces). Por otro lado, los criterios de exclusión fueron: presencia de infecciones agudas, dolor abdominal agudo y/o estar en tratamiento con terapia moduladora del gen CFTR.

Se emplearon un total de 3 muestras fecales frescas (máximo 12 horas desde la recogida) y se mezclaron en partes iguales. Posteriormente, se pesaron 32 gramos de la mezcla fecal y se añadió 100 ml de una disolución de tampón fosfato (0,1M) ajustada a pH 7 y previamente autoclavada. A continuación, la materia fecal junto con el tampón fosfato, se introdujo durante 10 min en un BagMixer 400 P de Interscience (St Nom, Francia) para homogenizarlo. Pasado ese tiempo se vertió el contenido en tubos Falcon que se centrifugaron a 550 g durante 5 minutos y el sobrenadante fue utilizado como el inóculo fecal.

Antes de comenzar la fermentación colónica *in vitro*, los tubos procedentes de la digestión gastrointestinal se centrifugaron a 4000 g durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se pesó 0,33g de la fase sólida y se añadió el 10% del sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 1,11 ml de inóculo fecal al 32% (p/v) y 4,17 ml de medio de cultivo. Para retirar el oxígeno se utilizó una corriente de nitrógeno durante 1 minuto y se introdujeron 2 bolsas de anaerobiosis en la cámara de fermentación (contenedor BD GasPak™ EZ) y se dejó incubar durante 20 h a 37°C en una incubadora ICN 120 SUPER (ArgoLab) con una oscilación de 20 rpm mediante un agitador de balanceo Swing 3D (OVAN). Transcurrido ese tiempo se recogieron alícuotas y se congelaron a -40°C hasta realizar las posteriores determinaciones.

3.4. Determinaciones analíticas

3.4.1 Índice de degradación de la matriz (IDM (%))

El IDM (%) representa la proporción de material sólido que se recupera después de la etapa intestinal y representa una medida indirecta del nivel de digestión alcanzado en cada caso. Este parámetro fue determinado de acuerdo con Lamothe et al., (2014). El contenido total de los tubos se centrifugó (4000g, 20 minutos) y después mediante un tamiz metálico (malla de 1.6 mm x 1.6 mm) se filtró para separar la fracción sólida. La fracción líquida se utilizó para la determinación de proteólisis. Para determinar la masa de las partículas sólidas grandes, la fracción sólida se introdujo en una estufa de aire forzado a 60°C (J.P Selecta 2000201) durante 48 horas hasta alcanzar peso constante. El IDM (%) se refiere a la proporción de sólidos que han sido degradados tras la digestión gastrointestinal respecto a los sólidos iniciales presentes en la muestra. Se calculó mediante la siguiente ecuación (1):

$$IDM (\%) = \frac{CS_0 - CS_t}{CS_0} \times 100 \quad (1)$$

Donde: CS_0 = contenido de sólidos antes de la digestión y CS_t = contenido de sólidos tras la digestión.

3.4.2 Digestibilidad de los lípidos

La H^1 -RMN (Resonancia Magnética Nuclear) es una técnica de gran precisión que permite identificar y cuantificar las especies presente en una muestra (en nuestro caso, las especies lipídicas: Triglicéridos, Diglicéridos, Monoglicéridos y Ácidos grasos). El grado de lipólisis se determinó a partir de los resultados obtenidos mediante esta técnica. En primer lugar, se realizó una extracción lipídica de las muestras digeridas y de las muestras antes de la digestión. Para la extracción de los digeridos se utilizó diclorometano en proporción 2:3 (v/v) mientras que la extracción de lípidos de los alimentos se realizó con una proporción de diclorometano de 1:2 (p/v). Una vez añadido el diclorometano, se centrifugaron los tubos a 6000 g durante 4 minutos y se colocó su interior en un matraz aforado al que se le añadió una disolución de sal saturada (270 g/L) para mejorar la separación de la fracción acuosa de la fracción lipídica disuelta en el diclorometano. Una vez recolectado el diclorometano, se rota-vaporó para eliminar el disolvente y recuperar la fracción lipídica. Se tomaron 200 μ L de las muestras lipídicas y se añadieron 400 μ L de cloroformo deuterado que contenía 0,2% de cloroformo no deuterado y una pequeña cantidad [0.03% (v:v)] de tetrametilsilano (TMS) que se utilizó como patrón interno. Para la adquisición de los espectros de H^1 -RMN de las muestras digeridas, éstas se introdujeron en un tubo dimétrico de 5 mm y se registraron los espectros en un

espectrofotómetro Bruker Avance 400 operando a 400 MHz. Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: anchura espectral 6410 Hz, retardo de relajación 3 s, número de barridos 64, tiempo de adquisición 4,819 segundos y anchura de pulso de 90°.

Los espectros obtenidos se analizaron con el programa MestreNova y a partir de las ecuaciones publicadas por Nieva-Echevarría et al., 2015 se determinó la concentración molar de los triglicéridos (TG), diglicéridos (1-2 DG y 1-3 DG), monoglicéridos (1 MG y 2 MG) y ácidos grasos libres (AGL).

3.4.3 Digestibilidad de las proteínas

El contenido de aminoácidos libres es un parámetro indirecto que nos indica el grado de digestibilidad de las proteínas, ya que cuando las proteínas se hidrolizan por acción de las enzimas pepsina y proteasas dan lugar a aminoácidos libres. Así pues, se determinó el contenido de aminoácidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) utilizando el protocolo previamente descrito por Ketnawa et al. (2018). Una vez terminada la digestión, se añadieron 0,1 ml de muestra digerida a 0,9 ml de TCA (5% p/v). Posteriormente, las muestras se mezclaron en un vortex y se dejaron incubar durante 1 hora a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 8000 rpm se añadió 1 ml de EDTA-UREA (50 mM EDTA, 8M UREA; pH 10) a 50 ml del sobrenadante y se procedió a medir la absorbancia a 280 nm mediante el espectrofotómetro DU 730 UV/Vis de Beckman Coulter (California, EE.UU). Para realizar la recta de calibrado se utilizó tirosina como patrón interno (0-5 mg/ml) y los resultados se expresaron como mg de tirosina/ g de alimento.

3.4.4 Metabolitos producidos durante la fermentación colónica

Una vez finalizada la fermentación colónica, se determinaron los siguientes metabolitos producidos por la misma: Ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lactato y amonio.

3.4.4.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Para la determinación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se siguió el protocolo adoptado por Adorno et al. (2014) con algunas modificaciones (Asensio-Grau et al. 2023). En primer lugar, se realizó una extracción con dietiléter a partir de alícuotas de 2 ml de las muestras de la fermentación colónica. A continuación, las muestras fueron mezcladas con H₂SO₄ (9,2M) y, con el propósito de eliminar la posible presencia de agua en el extracto, se introdujo una pequeña cantidad de NaCl. Posteriormente, se adicionó la solución de patrón interno (ácido 2-metilhexanoico) y el dietiléter. Estas muestras se mezclaron con ayuda de un vortex y centrifugaron a 3000 g durante 3 minutos, tras los cuales se retiró el sobrenadante que fue transferido a los viales de cromatografía para su análisis. Se utilizó la cromatografía de gases con ionización de llama como detector (GC-FID), con un inyector capilar split (splitless) y una columna HP-INNOWAX C30 (30mx0.25mm x 0.25 µm) (Agilent Technologies, La Jolla, USA). El gas portador fue el hidrógeno, con un flujo de 1ml/min y la temperatura del detector y el inyector fue de 260°C. Para realizar la recta de calibrado se utilizó un mix de ácidos grasos volátiles (Supelco Volatile Free Acid Mix (46975-U, Sigma)) que contenía los siguientes ácidos: acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valerico e isocaproico; de los cuales se consideraron ramificados el isobutírico, isovalérico e isocaproico mientras que los restantes fueron considerados como lineales. Los resultados se expresaron como concentración milimolar (mM).

3.4.4.2 Lactato

Para determinar la concentración de lactato producido en las muestras procedentes de la fermentación colónica se utilizó el kit enzimático comercial Lactate Assay de Sigma-Aldrich (Missouri, EE.UU) y un lector de placas Multiskan FC de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EE.UU), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En primer lugar, se realizó una curva de estándares que se empleó para la determinación de la concentración de lactato en cada muestra mediante la absorbancia. Asimismo, se realizó un blanco con el propósito de corregir los valores obtenidos en las lecturas pudiendo eliminar así el efecto sobre el fondo ejercido por el NADH o NADPH presente en las muestras. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/L}$.

3.4.4.3 Amonio

Previo a la determinación de la concentración de amonio, se sometieron cada una de las muestras a una desproteización para eliminar la interferencia proteica en la posterior cuantificación del amonio. Para ello, se empleó el kit enzimático comercial Deproteinizing Sample Preparation Kit (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU). Una vez estuvieron las muestras desproteizadas, se procedió a la determinación de la concentración de amonio mediante el kit enzimático comercial Enzytec Liquid Ammonia de R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania) y el espectrofotómetro DU 730 UV/Vis de Beckman Coulter (California, EE.UU) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 340nm y los resultados se expresaron en mmol/L .

3.4.5 Composición de la microbiota colónica

Transcurrida la fermentación colónica, y con el objetivo de la determinación de la composición de los filos y géneros de bacterias presentes, se realizó una extracción del ADN utilizando el kit comercial de extracción de ADN fecal Norgen Biotec Corp (Ontario, Canadá), siguiendo el protocolo y las recomendaciones del propio fabricante.

A continuación, las muestras de ADN extraído fueron analizadas mediante un 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). Para poder unir las secuencias forward y reverse de las lecturas, éstas fueron previamente sometidas a evaluación de calidad y filtrado. Para la asignación de la taxonomía de las secuencias resultantes, las ASVs (del inglés, Amplicón Sequence Variants), se utilizó la base de datos del gen 16S SILVA.

3.4.6. Análisis estadístico

Para estudiar las diferencias significativas entre muestras y entre condiciones, se realizaron análisis de la varianza unifactorial (ANOVA) para cada variable estudiada, con un nivel de confianza del 95% ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Para ello, se emplearon los programas GraphPad y Statgraphics Centurión XIX. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Influencia de las matrices alimentarias y las condiciones gastrointestinales sobre la digestibilidad de macronutrientes.

Como es sabido los frutos secos y semillas son alimentos ricos en fibra y lípidos de buena calidad. El elevado contenido en fibra de frutos secos y semilla proviene principalmente de la pared celular, compuesta por celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina. En concreto el tipo de fibra que compone estos alimentos es de tipo insoluble (Timm et al., 2023). Asimismo, muchos de estos alimentos presentan elevadas cantidades de lignina, concretamente aquellos con una cobertura dura como en el caso de las semillas de sésamo (Salas-Salvadó y Pascual-Compte, 2023). En cuanto a los lípidos, se acumulan en los frutos secos y semillas principalmente de manera intracelular en forma de triglicéridos (TG) almacenados como gotas lipídicas formadas por una monocapa de fosfolípidos, proteínas intrínsecas y lípidos neutros entre los que se incluyen los TG. Esto es así, puesto que es una de las formas más eficientes de almacenamiento de energía para poder ser empleada en el proceso de germinación de la semilla y el crecimiento de la planta. (Chen et al., 2023).

La Figura 1 muestra la distribución de especies lipídicas de los frutos secos y semillas analizadas previo a la digestión. Tal y como se puede observar, los triglicéridos (TG) son la especie lipídica que representa el mayor porcentaje, siguiéndole por detrás ácidos grasos libres (AGL) y los diglicéridos 1-3 (1-3 DG). De esta manera, se constata que, en los frutos secos y semillas, y previo a la digestión, las grasas se presentan en su gran mayoría en forma de triglicéridos, que posteriormente serán hidrolizados durante el proceso digestivo. Esto coincide con el hecho de que comúnmente la grasa es consumida en forma de triglicéridos puesto que es la estructura lipídica predominante en los alimentos (Omer y Chiodi, 2024) (Guo et al., 2017).

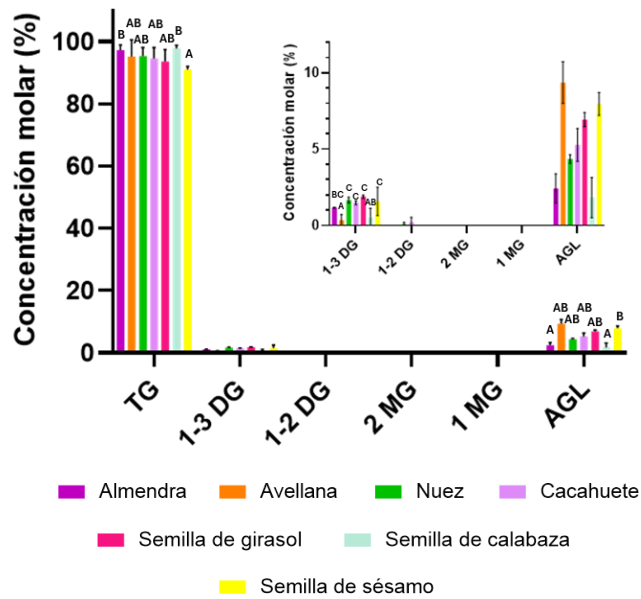


Figura 1. Distribución de las especies lipídicas (concentración molar (%)) de los frutos secos y semillas (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) previo a la digestión. TG: triglicéridos; 1-3 DG: diglicéridos 1-3; 1-2: diglicéridos 1-2; 2 MG: 2-monoglicéridos; 1 MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres. A-C: Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre los frutos secos y semillas en cada fracción lipídica con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

La matriz alimentaria se define como la organización de las moléculas constituyentes del alimento en múltiples escalas espaciales. Juega un papel clave en cómo se disgrega el alimento a lo largo del tracto gastrointestinal y, en la liberación, hidrólisis y absorción de los nutrientes que componen ese alimento (Guo et al., 2017). Durante el proceso digestivo, se produce la disgregación de la estructura inicial del alimento mediante procesos físicos, químicos y enzimáticos, con la participación de enzimas digestivas, y como consecuencia de los cambios en el pH, y procesos físicos o mecánicos, como la masticación o los movimientos peristálticos o de segmentación. Gracias a esta degradación se favorece la liberación e hidrólisis de nutrientes para que los metabolitos resultantes puedan ser absorbidos por el organismo (Kong y Singh, et al. 2008). Esto se conoce con el término bioaccesible, que se refiere a la proporción de un nutriente o compuesto fitoquímico liberado de una matriz alimentaria compleja durante el proceso digestivo y, por tanto, potencialmente susceptible a ser absorbido en el tracto gastrointestinal (Mandalari et al. 2018). El índice de degradación de la matriz (IDM %) está estrechamente relacionado con los cambios fisicoquímicos que se producen durante el proceso digestivo (Asensio-Grau et al., 2018). Asimismo, la eficiencia de los agentes enzimáticos depende en gran medida de las condiciones del medio intestinal (pH intestinal y concentración de sales biliares) (Li y Somerset, 2014).

Los frutos secos y las semillas también son considerados como buena fuente de proteína vegetal (entre 8 y 25% de energía) debido a la composición proteica, su elevado contenido en proteína y de su digestibilidad, dotando a este tipo de alimento de una calidad nutricional mayor a otras fuentes de proteína vegetal (Zhao et al., 2022) Durante el proceso digestivo, las proteínas son fragmentadas en péptidos más pequeños gracias a la acción de la pepsina, la enzima proteolítica principal del jugo gástrico, en el ambiente ácido del estómago, proceso conocido como proteólisis (Somaratne et al., 2020). A continuación, en el duodeno gracias a la acción de la proteasa pancreática los péptidos procedentes del entorno gástrico se hidrolizan a moléculas más pequeñas, aminoácidos, ya absorbibles por las vellosidades del duodeno. Aunque la digestión y absorción del huésped sea eficiente, algunos péptidos pueden escapar de la digestión enzimática del huésped en el intestino delgado y ser metabolizados por la microbiota. Las bacterias proteolíticas que componen la microbiota, fragmentan esos péptidos no digeridos mediante proteasas extracelulares y peptidasas liberando aminoácidos libres y péptidos que pueden ser aprovechados por las propias bacterias o el huésped. (Diether et al., 2019)

Los resultados obtenidos en el Índice de degradación de la matriz (IDM%) así como la extensión de la proteólisis tras la digestión *in vitro* se muestran en la Figura 2 y Figura 3 respectivamente. El IDM (%) va a influenciar como de bioaccesibles se encontrarán los macro y micronutrientes que componen el alimento y por tanto la digestibilidad y absorción de estos. De esta forma, a mayor IDM (%) mayor bioaccesibilidad y, por consiguiente, mayor digestibilidad. Tal y como se ha comentado anteriormente, el IDM (%) se va a ver en gran parte influenciado por la naturaleza de la matriz. De esta forma, los alimentos que presenten un mayor IDM (%) será debido a que presentan una matriz que permite una mayor liberación de los macronutrientes por lo que estos estarán más accesibles para las enzimas y, por consiguiente, la bioaccesibilidad de sus nutrientes va a ser mayor. En referencia a esto, los frutos secos y semillas que mayor IDM (%) alcanzaron en condiciones estándar fueron la nuez y la semilla de girasol. Por otro lado, se puede ver claramente también la disminución en la eficiencia de degradación de la matriz bajo las condiciones FQ en comparación con las condiciones estándar. Esto expone la gran influencia que tienen también, además de la naturaleza de la propia matriz, las condiciones gastrointestinales en cuanto a la degradación de la matriz. Este hecho puede explicarse debido a que los enzimas encargados de degradar esa matriz (amilasas, proteasas y lipasas) se encuentra alrededor de 7 y 9 (Li y Somers, 2014). Por tanto, el pH intestinal de 7, que coincide con la condición estándar, aumenta la capacidad hidrolítica de los enzimas obteniéndose como resultado una mayor degradación de la matriz. Asimismo, la concentración de sales biliares de 10 mM, propia de las condiciones estándar también mejora la emulsificación de los lípidos permitiendo una mayor superficie de contacto entre la enzima y el sustrato. En concreto, fueron los dos alimentos que mayor IDM (%) presentaron bajo las condiciones estándar (nuez y semilla de girasol) los que más afectados se vieron por las condiciones gastrointestinales FQ. Esto puede ser debido a que, concretamente en estos dos alimentos, gran parte de la degradación de la matriz se realice de forma enzimática, y al disminuir la eficiencia de las enzimas encargadas de la hidrólisis de esta, su degradación se vea afectada negativamente.

Por otro lado, la semilla de calabaza es uno de los alimentos que menor IDM (%) presenta bajo las dos condiciones. Este hecho podría deberse a una mayor compactación de su matriz, con respecto al resto de frutos secos y semillas, que dificulta su desintegración.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en condiciones FQ, el pH del estómago no alcanza la acidez necesaria para que las enzimas digestivas se encuentren en su pH óptimo y, por tanto, en su mayor eficiencia hidrolítica. Entre estas enzimas se encuentran las proteasas, encargadas de la hidrólisis de las proteínas. Por esta razón, la digestión de las proteínas se encuentra disminuida bajo

condiciones FQ. Debido a esto, y tal y como se puede observar en la Figura 3, bajo las condiciones FQ, la extensión de la proteólisis es, en todos los casos, menor en comparación con la condición estándar. La semilla de girasol, así como la semilla de sésamo y la nuez fueron los alimentos que más aminoácidos solubles en TCA obtuvieron. Esto puede explicarse debido a que fueron también las que mayor IDM presentaron bajo estas condiciones, y tal y como se ha explicado anteriormente, a mayor IDM (%) mayor bioaccesibilidad de nutrientes y mayor digestibilidad, en este caso de proteínas. Bajo las condiciones FQ, la nuez, la semilla de calabaza y la semilla de sésamo fueron las que más negativamente influenciadas se vieron por las condiciones gastrointestinales. En el caso de la nuez y la semilla de calabaza podría relacionarse al hecho de que, bajo estas condiciones, la degradación de su matriz también se vio muy afectada, por lo que, también la digestión de sus proteínas. Asimismo, la composición proximal del propio alimento influencia en gran parte el grado de proteólisis adquirido, por lo que cuanto mayor sea la digestibilidad de la proteína contenida, mayor cantidad de proteínas podrán llegar a ser digeridas. Este es el caso de la semilla de girasol, que incluso habiendo disminuido la cantidad de aminoácidos solubles en TCA bajo la condición FQ en comparación con la estándar, sigue siendo la semilla que mayor extensión de proteólisis presenta. Por esta razón, se puede pensar que es la semilla que presenta la proteína de mejor digestibilidad bajo las condiciones FQ. El cacahuete es el fruto seco que mayor porcentaje de proteína presenta en su composición (33%). Aun así, la extensión de proteólisis que presenta bajo ambas condiciones no es de las más elevadas además de que no difiere significativamente entre ambas condiciones, lo que se podría explicar por el hecho de la presencia de ácido fítico en su matriz que se ha asociado con la disminución de la bioaccesibilidad de macronutrientes debido a su capacidad de unión con ellos (Arya et al., 2016). Por otro lado, las semillas de calabaza y sésamo también presentan un alto porcentaje de proteínas en su composición que, bajo condiciones estándar, son digeridas eficientemente. Aun así, fueron estas dos semillas las que más afectadas se vieron en términos de proteólisis por las condiciones gastrointestinales, obteniéndose una gran disminución de aminoácidos solubles en TCA bajo condiciones FQ en comparación con las condiciones estándar.

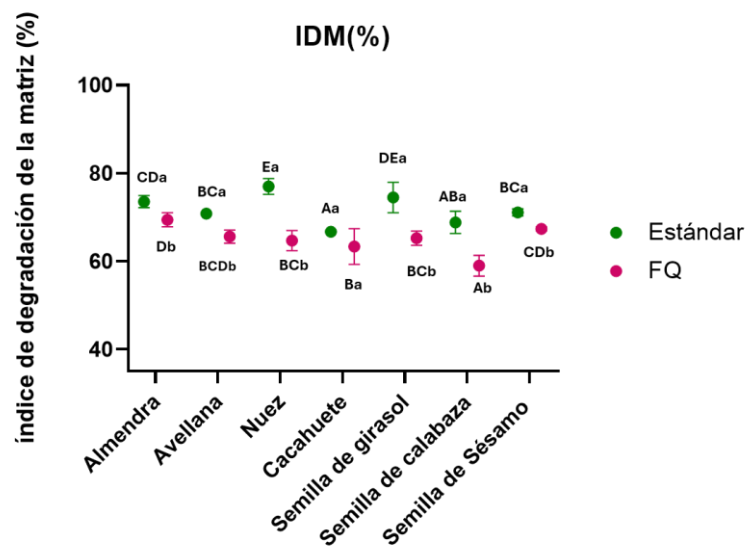


Figura 2. Índice de degradación de la matriz (IDM) de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo). A-E: Letras mayúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre los diferentes alimentos bajo cada condición gastrointestinal para un nivel de significancia del 95%. ($p < 0,05$). a-b: Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre las dos condiciones con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

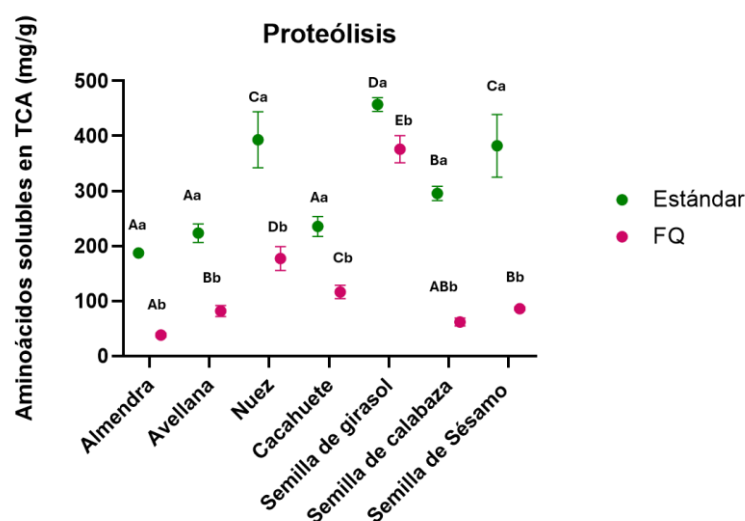


Figura 3. Proteólisis (porcentaje de aminoácidos solubles en TCA (mg de tirosina/g de alimento)) de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo). A-E: Letras mayúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre los diferentes alimentos bajo cada condición gastrointestinal para un nivel de significancia del 95%. ($p < 0,05$). a-b: Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre las dos condiciones con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Los frutos secos y semillas son alimentos de alta densidad nutricional que se caracterizan por contener una elevada cantidad de lípidos de gran calidad, entre los que se encuentran los ácidos grasos monoinsaturados y polinsaturados, siguiendo únicamente por detrás a los aceites vegetales como los alimentos de origen vegetal más ricos en grasa (Ros et al., 2021) (Alasalvar et al., 2021). Se conoce como lipólisis al proceso de hidrólisis enzimática a la que son sometidos los lípidos durante su digestión que les permite ser absorbidos posteriormente en el intestino delgado. En los alimentos, estos lípidos se presentan mayoritariamente en forma de triglicéridos, biomoléculas formadas por glicerol y tres ácidos grasos, localizados intracelularmente, por lo que un factor crítico en su digestión es la suficiente disgregación de la pared celular durante el proceso de masticación y su paso por el tracto gastrointestinal (Li et al., 2020). Su digestión comienza en la cavidad oral y el estómago, donde las lipasas lingual y gástrica inician la hidrólisis de los enlaces éster, liberando los ácidos grasos de los extremos de los triglicéridos en su forma libre (AGL). Aun así, la mayor parte de su digestión tiene lugar en el intestino delgado por acción de las lipasas pancreáticas que contribuyen a la liberación de más ácidos grasos y 2-monoacilglicerol (2-MG) (Omer et al., 2024) (Guo et al., 2017).

La insuficiencia pancreática es una condición muy frecuente en pacientes con FQ (~85%) por la cual los enzimas pancreáticos (lipasas, amilasas o proteasas), son secretados por el páncreas exocrino en menor medida de lo normal (McDonald et al., 2024). Además, el bicarbonato, se ve también reducido debido a la disfunción del CFTR. Como consecuencia, el pH duodenal en pacientes con FQ se encuentra entre 1 y 2 puntos más ácido que en condiciones estándar, provocando la inactivación de las lipasas, enzimas encargadas de la hidrólisis de los lípidos, y como consecuencia una malabsorción de las grasas (Wouthuyzen-Bakker et al., 2011).

En la Figura 4 se observa el perfil lipídico tras la digestión (concentración molar (%)). La concentración molar (%) de AGL es el parámetro que indica la digestión de los lípidos. Se puede observar la influencia de las condiciones intestinales, así como de los diferentes frutos secos y semillas sobre la extensión de la lipólisis. Tal y como se ha comentado anteriormente, la bioaccesibilidad de los macronutrientes va a ir ligada a la degradación de la matriz que haya sufrido el alimento durante los primeros pasos del proceso de digestión. En los alimentos de origen vegetal en concreto, los lípidos son almacenados intracelularmente, por lo que para ser digeridos y absorbidos se necesitan roturas de la pared celular que permitan la exposición de estas biomoléculas a las enzimas digestivas, en este caso lipasas. Por esta razón, la extensión de la lipólisis va a estar estrechamente ligada al grado de rotura de las paredes celulares de las células que componen el alimento, en este caso frutos secos y semillas (Li et al. 2020). Es por esto, que uno de los factores más relevantes para tener en cuenta es la naturaleza de la pared celular de los alimentos ingeridos, así como de la eficiencia en los procesos implicados en la rotura de esta pared celular. A parte de esto, la digestión de lípidos se verá influenciada también por las condiciones gastrointestinales, dado que bajo condiciones FQ, las enzimas encargadas de su digestión no se encontrarán en su pH óptimo y por tanto su eficiencia se verá disminuida.

Como cabía esperar, la extensión de la lipólisis fue menor bajo las condiciones FQ en comparación con las condiciones estándar, presentando un mayor porcentaje de triglicéridos (TG), poniendo así de manifiesto la dificultad en la digestión de los lípidos bajo estas condiciones. Asimismo, en condiciones FQ, se observaron diferencias importantes entre alimentos evidenciando una mayor influencia de la matriz alimentaria en la modulación de la hidrólisis de las grasas en condiciones subóptimas, frente a estándar, como las que se dan en FQ. Concretamente, los perfiles lipídicos de la nuez, semilla de calabaza y la semilla de sésamo presentaron mayores porcentajes de TG sin digerir en comparación con el resto de los alimentos. Este hecho se puede relacionar con su disminución en la degradación de la matriz bajo estas condiciones dado que se sabe que las matrices varían en composición entre frutos secos y semillas y esto es lo que hace que la digestibilidad de cada uno de ellos sea distinta. Debido a esto, sus lípidos estén menos bioaccesibles para la digestión. Asimismo, concretamente en la nuez, se ha visto que, bajo un pH disminuido, la hidrólisis de las oleosinas se ve facilitada. Las oleosinas son las proteínas mayoritarias de los cuerpos lipídicos cuya función es estabilizar los lípidos contenidos. De este modo la degradación de estas proteínas favorece la coalescencia de los lípidos evitando así su digestión (Cirrincione et al., 2023). Este efecto podría estar teniendo lugar también en las dos semillas contribuyendo a la disminución de la lipólisis. Asimismo, se ha comprobado que los compuestos fenólicos presentes en los frutos secos y semillas pueden formar complejos covalentes con las proteínas y los lípidos de la matriz evitando la unión de proteasas y lipasas y, por tanto, la lipólisis e hidrólisis de las proteínas (Jian et al., 2023). Concretamente la nuez es el fruto seco que mayor contenido de compuestos fenólicos presenta (Rocchetti et al., 2018). Estos factores podrían haber contribuido, además de las condiciones subóptimas que se dan en el caso de FQ, a la disminución en la lipólisis y no tanto a la proteólisis, dado que, la nuez, es uno de los frutos secos que mayor grado de proteólisis presentó, hecho que se puede relacionar con lo que se ha comentado anteriormente de la facilidad en la hidrólisis de las oleosinas en el caso de este fruto seco.

Por el contrario, los frutos secos y semillas que mayor IDM (%) obtuvieron, bajo estas condiciones, (almendra, avellana y semilla de girasol) coinciden con los que mayor extensión de lipólisis consiguieron, volviendo a poner de manifiesto la gran influencia que presenta la fisicoquímica de la matriz alimentaria en el proceso digestivo. En concreto, fue la semilla de girasol el alimento que mayor digestión de lípidos obtuvo bajo las condiciones FQ, hecho que puede relacionarse con que se consiguiese una degradación de la matriz lo suficientemente eficiente como para poder exponer sus lípidos para digestión.

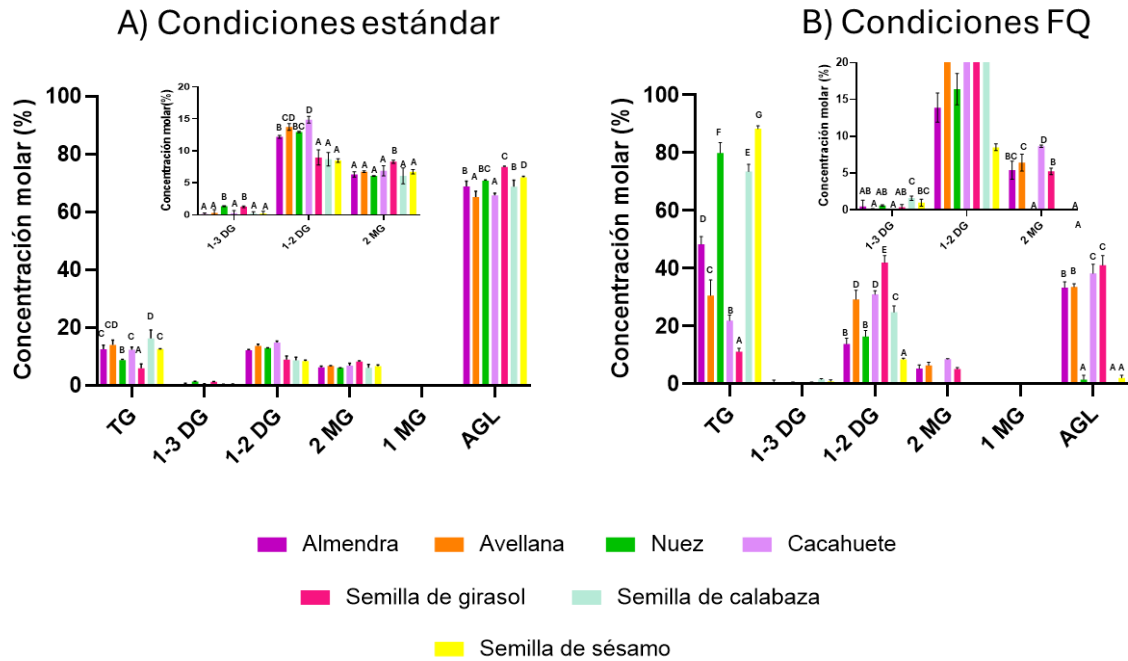


Figura 4. Lipólisis (concentración molar (%)) de frutos secos y semillas (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) posterior a la digestión gastrointestinal bajo las diferentes condiciones. TG: triglicéridos; 1-3 DG: diglicéridos 1-3; 1-2: diglicéridos 1-2; 2 MG: 2-monoglicéridos; 1 MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres. A) Condiciones gastrointestinales estándar; B) Condiciones gastrointestinales FQ. (A-D): Letras mayúsculas distintas reflejan diferencias significativas entre frutos secos y semillas bajo cada condición con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

4.2 Influencia de las matrices alimentarias y las condiciones gastrointestinales sobre la microbiota colónica.

La microbiota colónica se define como el conjunto de microorganismos que habitan en la superficie colónica del huésped que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del mismo, dado que pueden llevar a cabo diversos procesos que no pueden ser realizados por el propio huésped (Schoeler y Caesar, 2019). A nivel de la microbiota colónica, es fundamental para proveer de nutrientes y energía al huésped mediante la fermentación de componentes dietéticos no digeridos, liberando metabolitos que pueden influenciar la fisiología del huésped, tanto positiva como negativamente (Tojo et al., 2014). Debido a que el intestino grueso contiene el mayor número y diversidad de microbiota y que tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del huésped, una disbiosis de la microbiota se relaciona con múltiples condiciones gastrointestinales, entre la que se encuentra la fibrosis quística (FQ). La disbiosis se define como los cambios o desbalances en la composición de la microbiota del colón. Asimismo, la diversidad de la microbiota se relaciona con un buen estado de salud, por lo que una reducción en ésta se asocia también con múltiples enfermedades inflamatorias, metabólicas e inmunes (Testa et al., 2022). En individuos con FQ, se ha demostrado que la microbiota del colon difiere tanto taxonómica como funcionalmente de individuos sanos, con una reducción de la abundancia y de la riqueza de especies. Asimismo, la disbiosis funcional de los pacientes con FQ se relaciona también con la malabsorción de las grasas, provocando que la microbiota este constantemente expuesta a una elevada concentración luminal de lípidos (Thavamani et al. 2021).

La diversidad α es una medida de la diversidad dentro de la muestra de una comunidad microbiana, que se describe frecuentemente en términos de riqueza (número) o distribución (uniformidad) de organismos en una muestra. Comúnmente una baja diversidad α sugiere una disbiosis del microbioma colónico pues pacientes con FQ presentan una diversidad α significativamente reducida en comparación con la de una microbiota estándar (Testa et al., 2022). El índice Shannon es un índice cuantitativo que representa la abundancia y uniformidad de las especies que residen en el huésped. (Hills et al., 2019). Por su parte, el índice Chao1 representa la riqueza microbiana (Kim et al., 2023).

En la Tabla 3 se recogen el índice Shannon y el índice Chao 1 (Diversidad α) de la microbiota colónica tras la fermentación colónica *in vitro* de los diferentes frutos secos y semillas bajo cada condición gastrointestinal. Dado que el control en ambas condiciones representa las condiciones gastrointestinales sin alimento, las variaciones en los ensayos hacen referencia a la influencia que tiene cada alimento sobre la microbiota bajo esas condiciones gastrointestinales (estándar y FQ). En el índice Shannon, el cacahuete fue el único fruto seco en el que existieron diferencias significativas con respecto al control, bajo condiciones estándar. En concreto, se vio una disminución de este índice lo que implica una disminución de la abundancia y uniformidad de las especies presentes en la microbiota. Podría pensarse que una disminución en la abundancia se relacionase con un efecto negativo, pero, esta disminución podría deberse a la ausencia de algunas especies perjudiciales tras la digestión de este fruto seco. En el índice Chao1, bajo las condiciones estándar, todos los frutos secos y semillas, excepto la semilla de sésamo, aumentaron el valor de este índice. Aun así, únicamente la avellana lo incrementó de forma significativa con respecto al control. Esto expone, que, bajo la digestión de este fruto seco, en condiciones estándar, se aumenta la riqueza de la microbiota.

De la misma forma que en las condiciones estándar, bajo las condiciones FQ, el cacahuete fue el único fruto seco que difirió significativamente del control en el Índice Shannon. Esta diferencia se basa en una disminución en el valor de este índice, lo que implica una disminución de la abundancia y uniformidad de las especies que componen la microbiota, por lo que podría deberse a la ausencia de especies que contribuyen negativamente a la salud. Por otro lado, la almendra, la avellana y la nuez, aumentaron significativamente el valor del Índice Chao1. Esto expondría que la ingesta de estos frutos secos aumentaría la riqueza de la microbiota colónica.

Tabla 3. Diversidad α (índice Shannon e Índice Chao1) de la microbiota colónica tras la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo cada condición gastrointestinal (estándar y FQ). (*) expone las diferencias significativas con respecto al control en cada condición gastrointestinal con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Fruto seco o semilla	Índice Shannon		Índice Chao1	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Condición gastrointestinal estándar				
Control	5,10	0,01	730,50	13,50
Almendra	4,97	0,06	876,67	65,50
Avellana	5,13	0,05	899,33	102,18*
Nuez	5,10	0,04	782,33	78,59
Cacahuete	4,88	0,12 ***	825,00	102,43
Semilla girasol	5,12	0,01	777,33	59,35
Semilla calabaza	5,16	0,06	792,67	38,53
Semilla sésamo	5,12	0,11	690,00	83,14
Condición gastrointestinal FQ				
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Control	5,15	0,01	718,50	20,50
Almendra	5,02	0,01	916,00	109,53**
Avellana	5,22	0,01	896,00	86,71*
Nuez	5,28	0,03	886,67	6,66*
Cacahuete	4,93	0,07***	815,67	88,95
Semilla girasol	5,14	0,05	815,00	42,57
Semilla calabaza	5,10	0,05	768,33	14,47
Semilla sésamo	5,22	0,07	768,67	54,50

En una microbiota colónica estándar, se incluyen tanto Bacteria, Archaea, Virus y Fungi. Entre los filos bacterianos, se encuentran predominando, con un 90-95%, Firmicutes y Bacteroidetes, seguidos de Proteobacteria y Actinobacteria. Factores tanto externos como internos pueden influenciar en la composición y la actividad metabólica de la microbiota colónica. Por ejemplo, cambios en la dieta o la exposición a medicamentos, como los antibióticos, así como la disponibilidad de nutrientes, el entorno anaeróbico, secreciones antimicrobianas, como el ácido gástrico o la bilis, y la movilidad gastrointestinal afectan considerablemente a la microbiota colónica (Tojo et al., 2014). A nivel de géneros, existen diversas diferencias a nivel taxonómico de pacientes con FQ en comparación con una microbiota estándar. Se ha visto una notable disminución de géneros bacterianos (entre paréntesis) del filo Bacteroidetes (*Bacteroides*), Firmicutes (*Faecalibacterium*), Actinobacteria

(*Bifidobacterium*) y Verrucomicrobia (*Akkermansia*), todos relacionados con una microbiota saludable. Asimismo, existe un aumento de géneros pro-inflamatorios como Proteobacteria (*Escherichia coli/Shigella spp.*) y algunos Firmicutes (*Veillonella* y *Clostridium* entre otros) (Barrack et al., 2024).

En la Figura 5 se muestran la abundancia relativa de la microbiota a nivel de filos tras la fermentación colónica *in vitro* de los frutos secos y semillas, bajo cada condición. En la tabla 4 se muestran las diferencias significativas obtenidas en comparación con el control a nivel de filos. Se compararon los resultados respecto al control de las dos condiciones gastrointestinales (estándar y FQ). Cabe destacar que ambos casos el inóculo fecal provenía de un pool de heces de niños con FQ por lo que lo que se pretende comparar es el impacto de las condiciones gastrointestinales (estándar o FQ) sobre una microbiota FQ.

Tanto en la condición estándar como en condición FQ, los filos más abundantes fueron Bacteroidota, Firmicutes y Proteobacteria, coincidiendo con la bibliografía.

Dado que el control procede de haber realizado el blanco de la digestión gastrointestinal sin alimento, pero utilizando la cantidad de enzimas y fluidos correspondiente a ambas condiciones gastrointestinales, esto nos permite observar el efecto de la digestión de los frutos secos y semillas bajo cada condición analizada sobre la microbiota FQ. Tal y como se puede observar tanto en la Figura 5 como en la Tabla 4, los frutos secos y semillas fueron capaces de modular la abundancia relativa de los filos que componen la microbiota FQ de manera significativa bajo ambas condiciones gastrointestinales. Esto corrobora el hecho de que la composición de la microbiota fluctúa con factores externos como los cambios en la dieta (Tojo et al, 2014).

Tal y como se ha comentado anteriormente los filos Bacteroidota, Firmicutes y Proteobacteria son los filos mayoritarios que componen la microbiota colónica (Rinninella et al., 2019). El filo Proteobacteria es considerado un marcador de disbiosis en múltiples enfermedades en las que se encuentra representando un elevado porcentaje del total de filos que comprenden la microbiota (Rizzatti et al. 2017). Esto sucede en una microbiota FQ y este filo se asocia con un fenotipo proinflamatorio y por tanto, perjudicial para la salud del huésped. Bajo ambas condiciones testadas (estándar y FQ) este filo aumentó su abundancia relativa. Lo hizo significativamente bajo condiciones estándar en el caso de la Almendra, Nuez, Semilla de girasol, Semilla de calabaza y Semilla de sésamo. Por otro lado, bajo condiciones gastrointestinales FQ aumento significativamente en almendra, nuez y semilla de girasol. Se debe tener en cuenta que los lípidos pueden ejercer un efecto bactericida, sobre todo contra bacterias Gram -, como es el caso de Proteobacteria, pudiendo contribuir a la disbiosis. Asimismo, cabe destacar que bajo las condiciones FQ, tal y como se ha comentado anteriormente, la digestión de los lípidos es ineficiente, provocando que los lípidos no digeridos alcancen el colon. Aun así, bajo condiciones estándar, donde el proceso de digestión se da de una manera eficiente, se ha comprobado que, en dietas ricas en grasa, alrededor de un 7% de los lípidos ingeridos también pueden alcanzar la microbiota colónica en forma de ácidos grasos libres (Coelho et al., 2019). De la misma forma, el aumento de la abundancia del filo Proteobacteria y Firmicutes, así como la reducción de Bacteroidota se ha relacionado con dietas ricas en grasa (Méndez-Salazar et al., 2018). De forma general existe una tendencia a seguir este patrón en los frutos secos y semillas evaluadas. Aun así, las diferencias observadas entre frutos secos y semillas pueden deberse a las diferencias en abundancia y composición de lípidos ya que el tipo de ácido graso, el tamaño de la cadena de carbonos y el grado de saturación de la misma puede influenciar de manera diferencial la composición de la microbiota (Coelho et al., 2019).

Dado que el experimento fue realizado *in vitro*, con la fracción no digerida de los alimentos y el 10% del sobrenadante de la fracción digerida, en la Figura 5 se puede observar el efecto que ha tenido la grasa no digerida, así como el 10% de estos lípidos digeridos, sobre la microbiota colónica. Bajo condiciones FQ, la exposición a lípidos no digeridos es mayor, dado que la digestión de lípidos se ve dificultada, en comparación con las condiciones estándar, donde este proceso tiene lugar correctamente. A grandes rasgos se puede ver cómo, bajo condiciones estándar, existe una mayor abundancia relativa de Proteobacteria en comparación con las condiciones FQ. Asimismo, existe una menor abundancia relativa de Firmicutes y Bacteroidota en condiciones estándar en comparación con las condiciones FQ.

Se ha visto como a menor exposición de grasa no digerida aumenta la abundancia relativa de Proteobacteria. Esto se puede observar en el caso de la semilla de girasol, que fue la matriz alimentaria que mayor digestibilidad de lípidos obtuvo bajo condiciones FQ y la que incrementó de forma significativa la abundancia relativa de este filo. El aumento de este filo se ve también de manera significativa en condiciones gastrointestinales estándar en almendra, nuez, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo, donde la digestión de lípidos se da de manera eficiente. Por tanto, se podría pensar que la grasa no digerida de los frutos secos y semillas, tiene un efecto negativo sobre la abundancia relativa de este filo. En este caso, se puede ver el efecto bactericida de las grasas, comentado anteriormente, sobre bacterias Gram -, como las que comprenden el filo Proteobacteria (Coelho et al., 2019).

Por el contrario, Firmicutes tiende a disminuir cuando hay baja exposición de grasa no digerida como en el caso de almendra y semilla de girasol, en condiciones FQ. A diferencia de que aumenta cuando hay mayor exposición a grasas no digeridas como en el caso de nuez, cacahuete, semilla de calabaza y semilla de sésamo. El hecho de que aumente significativamente su abundancia relativa en Avellana y Cacahuete, bajo condiciones gastrointestinales estándar, donde realmente el proceso de digestión de lípidos se ha dado correctamente, puede deberse a que, aun siendo el proceso eficiente, no lo es al 100%, y que una pequeña parte de lípidos no digeridos de estos frutos secos hayan ejercido su acción en la microbiota.

Bacteroidota tiende a disminuir su abundancia relativa independientemente de las condiciones gastrointestinales. Este hecho puede deberse a que los frutos secos y semillas son alimentos con un alto porcentaje de lípidos y se ha visto que dietas ricas en grasa tienden a disminuir este filo (Conlon et al. 2014).

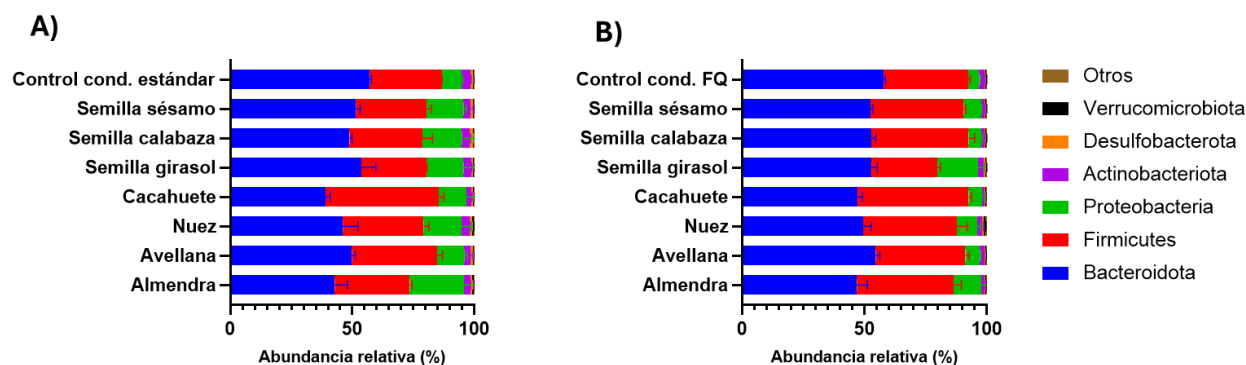


Figura 5. Abundancia relativa de la composición de la microbiota a nivel de filos tras la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco o semilla (almendra, avellana, cacahuete, nuez, semilla de girasol y semilla de sésamo) y bajo cada condición gastrointestinal (estándar y FQ). A): condición estándar; B): condición FQ.

Tabla 4. Diferencias significativas (Two-way ANOVA) en los filos de la microbiota colónica tras la fermentación colónica *in vitro* con los diferentes frutos secos (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo las dos condiciones (estándar y FQ) en comparación con el control con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Filos	Fruto seco o semilla	p-valor ajustado
Condiciones gastrointestinales estándar		
Bacteroidota	Almendra	<0,0001
	Avellana	0,0005
	Nuez	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de calabaza	<0,0001
	Semilla de sésamo	0,0115
	Firmicutes	Avellana
	Cacahuete	<0,0001
Proteobacteria	Almendra	<0,0001
	Nuez	0,0004
	Semilla de girasol	0,0010
	Semilla de calabaza	<0,0001
	Semilla de sésamo	0,0010
Condiciones gastrointestinales FQ		
Bacteroidota	Almendra	<0,0001
	Avellana	0,303
	Nuez	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de girasol	0,0002
	Semilla de calabaza	<0,0001
	Semilla de sésamo	<0,0001
Firmicutes	Almendra	0,0002
	Nuez	0,0041
	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de girasol	<0,0001
	Semilla de calabaza	<0,0001
	Semilla de sésamo	0,0070
Proteobacteria	Almendra	<0,0001
	Nuez	0,0072
	Semilla de girasol	<0,0001

En lo que a los géneros se refiere, los resultados obtenidos en términos de abundancia relativa se muestran en la Figura 6. En la Tabla 5 se muestran las diferencias significativas con respecto al control a nivel de géneros. Tal y como se puede observar, la influencia de las matrices alimentarias, así como las condiciones gastrointestinales, también han tenido efecto en la modulación de la composición de la microbiota a nivel de géneros.

Bacteroides es un género perteneciente al filo Bacteroidota que se encarga de la producción de ácido acético y propiónico, ejerciendo un papel antiinflamatorio, así como participa en la fermentación proteolítica (Portincasa et al., 2022). El efecto negativo que ejercen las grasas no digeridas sobre este género se puede observar claramente dado que en condiciones FQ, la semilla de girasol, que es la semilla que mejor digestión de lípidos presentó, es la que no reduce la abundancia relativa de este género asociado con un papel beneficioso. Asimismo, bajo las condiciones estándar la tendencia es a mantener su abundancia relativa y en aquellos frutos secos donde se disminuye podría deberse al hecho de que, al no ser la extensión de la lipólisis 100% efectiva, alguna pequeña fracción no digerida haya alcanzado el colon y ejercido este efecto perjudicial.

Acidaminococcus es un género que se considera patógeno oportunista y que por tanto se relaciona con un efecto negativo sobre la salud del huésped (Amaretti et al. 2019). En términos generales, *Acidaminococcus* aumenta su abundancia relativa en todos los frutos secos y semillas bajo ambas condiciones gastrointestinales. En el caso de la semilla de girasol, no se ve una influencia clara de las condiciones gastrointestinales en la modulación de la abundancia de este género.

Allistipes se ha asociado con efectos tanto beneficiosos en protección contra algunas enfermedades entre las que se incluyen la fibrosis hepática y colitis, entre otras, como patogénicos en desarrollo del cáncer colorectal y signos mentales de depresión (Parker et al., 2020). Este género disminuye bajo ambas condiciones gastrointestinales y no se ve un claro efecto de la grasa no digerida sobre su abundancia relativa.

El género *Suturella*, considerado como proinflamatorio y, por tanto, perjudicial para la salud del huésped (He et al., 2020), ve aumentada significativamente su abundancia relativa bajo condiciones gastrointestinales estándar y bajo condición FQ, únicamente en semilla de girasol y almendra. Por tanto, existe un patrón en el incremento de la abundancia relativa de este género cuando la digestión de los lípidos es elevada, es decir no está expuesto a lípidos no digeridos. En el caso de la almendra bajo condiciones FQ, aunque su digestión de lípidos no haya sido completa, el aumento de la abundancia relativa puede deberse a que el porcentaje de grasa sí digerido haya sido suficiente como para que el porcentaje de grasa no digerida no haya influenciado negativamente sobre este género.

Prevotella es un género que se asocia con dietas ricas en fibra en el que se encuentran cepas tanto con un papel beneficioso, así como cepas patógenas que favorecen la aparición de diversas enfermedades como la obesidad o enfermedades inflamatorias, entre otras (Precup et al., 2019). Únicamente bajo la condición gastrointestinal FQ, Almendra, Avellana, Cacahuete, Semilla de calabaza y Semilla de sésamo incrementan significativamente la abundancia relativa de este género con respecto al control. Por el contrario, en condiciones estándar este género no difiere significativamente con respecto al control. Por ello, se podría pensar que este género se adapta a entornos con exposición de lípidos no digeridos.

Por tanto, en términos generales se observa cómo hay un aumento de géneros proinflamatorios como *Acidaminococcus* y *Prevotella* mientras que disminuyen géneros antiinflamatorios como *Bacteroides* y *Alistipes* bajo la exposición a un entorno de lípidos no digeridos.

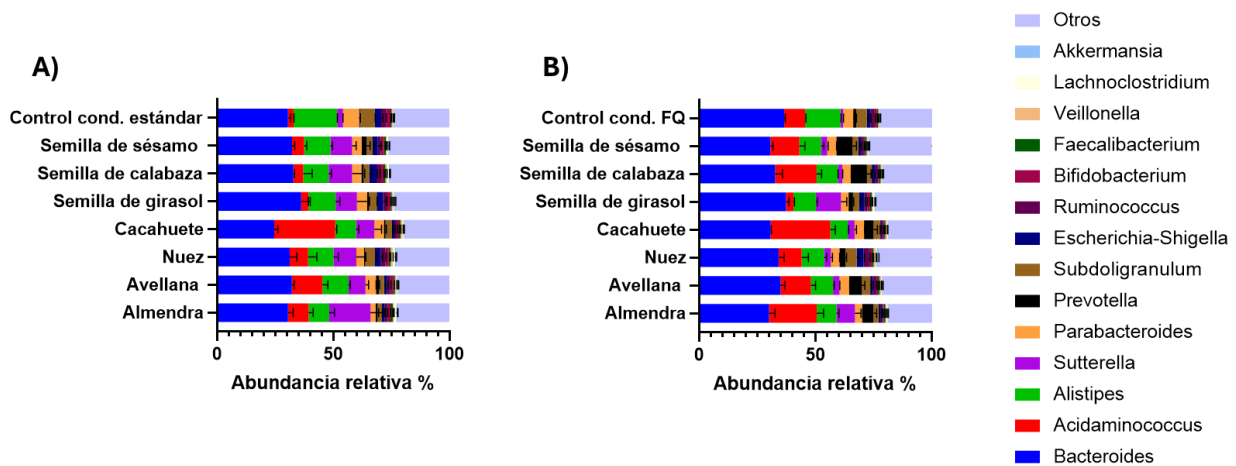


Figura 6. Abundancia relativa en composición de la microbiota a nivel de géneros tras la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco o semilla (almendra, avellana, cacahuete, nuez, semilla de girasol y semilla de sésamo) y bajo cada condición gastrointestinal (estándar y FQ). A) condición estándar; B) condición FQ.

Tabla 5. Diferencias significativas (Two-way ANOVA) en los géneros de la microbiota colónica tras la fermentación colónica *in vitro* de los diferentes frutos secos y semillas (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo las dos condiciones (estándar y FQ) en comparación con el control con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Género	Fruto seco o semilla	p-valor ajustado
Condiciones gastrointestinales estándar		
<i>Bacteroides</i>	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de girasol	<0,0001
<i>Acidaminococcus</i>	Almendra	<0,0001
	Avellana	<0,0001
	Nuez	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
<i>Alistipes</i>	Almendra	<0,0001
	Avellana	<0,0001
	Nuez	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de girasol	<0,0001
<i>Sutterella</i>	Semilla de calabaza	<0,0001
	Semilla de sésamo	<0,0001
	Almendra	<0,0001
	Avellana	0,0002
<i>Parabacteroides</i>	Nuez	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de girasol	<0,0001
	Semilla de calabaza	<0,0001
<i>Subdoligranulum</i>	Semilla de sésamo	<0,0001
	Almendra	0,0003
	Nuez	0,0072
	Almendra	0,0005
	Avellana	0,0021
<i>Otros</i>	Cacahuete	0,0086
	Semilla de girasol	0,0420
	Semilla de calabaza	0,0029
	Semilla de sésamo	0,0055
<i>Otros</i>	Cacahuete	0,0011

Condiciones gastrointestinales FQ		
<i>Bacteroides</i>	Almendra	<0,0001
	Nuez	0,0167
	Cacahuete	<0,0167
	Semilla de calabaza	<0,0001
	Semilla de sésamo	<0,0001
<i>Acidaminococcus</i>	Almendra	<0,0001
	Avellana	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
	Semilla de girasol	<0,0001
	Semilla de calabaza	<0,0001
<i>Alistipes</i>	Semilla de sésamo	<0,0001
	Almendra	<0,0001
	Avellana	<0,0001
	Nuez	<0,0001
	Cacahuete	<0,0001
<i>Sutterella</i>	Semilla de girasol	<0,0001
	Almendra	<0,0001
	Avellana	<0,0001
	Cacahuete	0,0038
	Semilla de calabaza	<0,0001
<i>Prevotella</i>	Semilla de sésamo	<0,0001
	Almendra	0,0163
<i>Subdoligranulum</i>	Semilla de calabaza	0,0174
	Almendra	0,0001
Otros	Cacahuete	0,0001
	Semilla de sésamo	<0,0001

Los frutos secos, cuentan con una matriz extracelular compleja, conocida como pared celular, que contiene celulosa, hemicelulosa, pectina y algunas proteínas que suelen ser enzimas que participan en el mantenimiento de la integridad de esta. Además, en la pared celular secundaria, también se puede encontrar lignina, polímeros formados de unidades de fenilpropanoides. Todo ello, confiere una gran estabilidad de pared que favorece el mantenimiento de la estructura celular intacta tras la digestión en el tracto gastrointestinal superior, y con ella, los lípidos y polifenoles polimerizados que van a poder ser metabolizados por la microbiota colónica para producir moléculas bioactivas beneficiosas para la salud humana (Mandalari et al., 2023). Por ello, a nivel nutricional, la pared celular de los frutos secos y semillas es la principal fuente de fibra dietética. La fibra dietética se define como carbohidratos de origen vegetal que no son digeridos por la enzimas endógenas ni absorbidas por el intestino delgado (Augustin et al., 2020). Únicamente mediante la fermentación anaeróbica microbiana o por rotura física puede desestructurarse la pared celular y liberarse así los componentes celulares para hacerlos disponibles para la absorción (Baer et al., 2023). Por esto, una vez alcanzan el intestino grueso, concretamente el colon, los componentes alimentarios no digeridos, como la fibra, son fermentados por la microbiota colónica, encargada de generar como producto, mayoritariamente, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que serán absorbidos por el organismo y utilizados como fuente de energía. Entre los AGCC se encuentran mayoritariamente acetato (60%), propionato (20%) y butirato (20%), que son los principales metabolitos generados durante el catabolismo de carbohidratos y proteínas (Singh et al., 2023). Estas moléculas se relacionan con

múltiples funciones metabólicas asociadas con la salud y el consumo de dietas elevadas en fibra se ha asociado con un incremento en la producción de AGCC por parte de la microbiota (Beam et al., 2021). Asimismo, el consumo de fibra se relaciona también con efectos beneficiosos sobre la microbiota en términos de riqueza y composición. (Augustin et al., 2020). De la misma forma, la fermentación proteolítica por parte de la microbiota genera como producto AGCC, concretamente AGCC ramificados entre los que se encuentran el ácido isobutírico, el ácido isocaproico y el ácido isovalérico (Rinninella et al., 2023).

La concentración de AGCC fluctúa durante el tiempo y estos cambios se relacionan con la composición de la microbiota, concretamente en la abundancia de las especies productoras. El butirato y el propionato son principalmente producidos por especies del filo Firmicutes. Por otro lado, el acetato es producido en su mayoría por cepas de Bifidobacteria y para su producción las bacterias necesitan de fibras conocidas como acetogénicas como la inulina o galacto-oligosacáridos. De los tres AGCC lineales el butirato es el más relevante a nivel de impacto fisiológico, por lo que la abundancia de las bacterias productoras será muy importante. Estos microorganismos son esenciales para mantener un ambiente saludable del intestino dado que compiten por el nicho con otras bacterias, concretamente bacterias patógenas. Asimismo, la producción de este ácido contribuye a mantener el ambiente anaeróbico del intestino evitando también así la entrada de patógenos aeróbicos como podrían ser la Salmonella o E.coli. (Fusco et al., 2023).

Los resultados obtenidos en el análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lineales y ramificados, tras la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco y semilla se muestran en la Figura 7. Dado que el control se trata de las dos condiciones gastrointestinales testadas (estándar y FQ) sin alimento, el efecto que se observa en los resultados es el producido por el fruto seco o semilla analizado en cada caso. Tal y como se puede observar, bajo la condición FQ todos los ácidos lineales (butírico, propiónico y acético) se vieron significativamente aumentados con respecto al control. Bajo la condición estándar únicamente el ácido butírico, en el cacahuete, y el ácido propiónico, en las 3 semillas estudiadas (girasol, calabaza y sésamo), aumentaron de manera significativa su concentración con respecto al control. Esto puede explicarse por dos motivos. El primero es que la administración de estos frutos secos y semillas proporciona una fuente eficiente de fibra que puede ser utilizada por la microbiota colónica para la producción de estos AGCC. Por otro lado, que haya habido un aumento en la producción de estos ácidos implica que, tras la digestión de estos alimentos, en la microbiota se haya incrementado la abundancia de las especies productoras. Esto expone que la administración de estos frutos secos y semillas proporcionan un sustrato para la producción de AGCC, sobre todo lineales, cuyo aumento de concentración se observa claramente bajo las condiciones FQ, resultados que son positivos dado que, tal y como se ha comentado anteriormente la producción de estos AGCC se relaciona con múltiples beneficios a nivel de salud. De esta forma, fueron el cacahuete, la semilla de girasol y la semilla de sésamo los alimentos que mayor concentración de AGCC lineales obtuvieron, por lo que pueden ser estos alimentos los que consiguen que una mayor cantidad de fibra llegue al colon para ser fermentada por la microbiota de manera eficiente.

En relación con la producción de los AGCC ramificados (isocaproico, isovalérico e isobutírico), no se ven tantas diferencias bajo las condiciones estándar, únicamente en cacahuete se ve significativamente disminuido el ácido isovalérico. En condición gastrointestinal FQ se observa como el ácido isovalérico aumenta significativamente en almendra, avellana, semilla de girasol y semilla de calabaza. En estas mismas condiciones, la semilla de girasol es la que mayor producción de AGCC ramificados obtiene. Esta semilla, obtuvo una elevada extensión de proteólisis y, dado que la presencia de AGCC ramificados es un marcador de fermentación proteolítica, este hecho podría

explicar por qué es en concreto esta semilla la que mayor producción de este tipo de ácidos alcanzó. Algunas bacterias son capaces de utilizar como sustratos los aminoácidos debido a que secretan enzimas exógenas específicas para ello, las serin proteasas. Entre estas bacterias se encuentran Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria y Fusobacteria. (Hou et al., 2021).

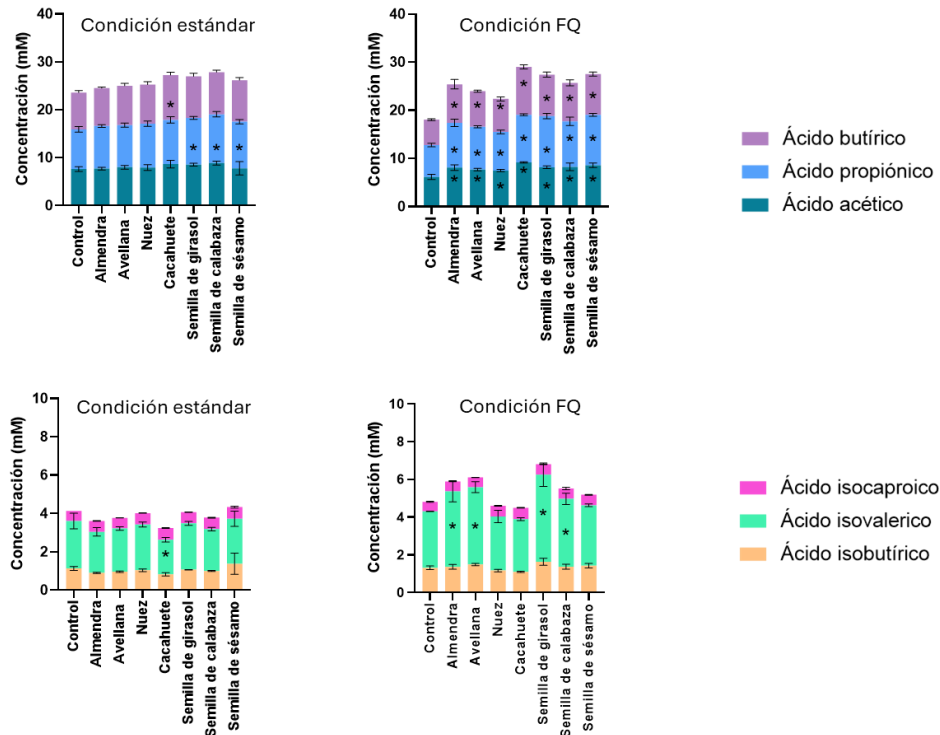


Figura 7. Concentración (mM) de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por la microbiota tras la fermentación colónica *in vitro* de la fracción no digerida obtenida tras la digestión gastrointestinal *in vitro* bajo cada condición (estándar y FQ). Ácidos grasos de cadena corta lineales (ácido butírico, ácido propiónico y ácido acético); ácidos grasos de cadena corta ramificados (ácido isocaproico, ácido isovalérico y ácido isobutírico). (*) expone diferencias significativas entre frutos secos y semillas de cada AGCC con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Asimismo, durante el proceso de fermentación colónica algunos microorganismos anaeróbicos de la microbiota son capaces de convertir los carbohidratos de la dieta en otros ácidos orgánicos como el lactato (Lin y Zhang, 2017). Además, tal y como se ha comentado anteriormente, algunos péptidos evitan la degradación en el intestino delgado llegando al colon donde, gracias a proteasas exógenas secretadas por algunos microorganismos, son degradadas, liberando como subproducto amonio. Las concentraciones de este metabolito son resultado tanto del metabolismo de los enterocitos, como de la desaminación y síntesis proteica microbiana. Estas concentraciones pueden verse disminuidas por el incremento de la fermentación de carbohidratos y el crecimiento bacteriano puesto que se aumenta la incorporación de este metabolito por parte de la microbiota (Diether et al., 2019). Su acumulación se relaciona con efectos negativos sobre la salud humana, contribuyendo al riesgo de padecer ciertas enfermedades dado que se ha comprobado los efectos dañinos que provoca sobre el epitelio colónico, así como la promoción de señales inflamatorias (Wu et al., 2022) (Rodríguez-Romero, et al., 2022).

En la figura 8 se representan los resultados obtenidos en las concentraciones de amonio (mM) y lactato (μ M) tras la fermentación colónica *in vitro* de los frutos secos y semillas y bajo las dos condiciones gastrointestinales (estándar y FQ).

Se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control, bajo la condición FQ, en la producción de amonio en la almendra, nuez y semilla de sésamo, viéndose una reducción en su concentración. Esto podría explicarse por el hecho de que estos frutos y semillas también obtuvieron un valor muy reducido en la proteólisis y por tanto de aminoácidos solubles. Dado que, aunque este metabolito se produce, en gran parte como consecuencia de la desaminación de los péptidos no digeridos previamente, puede que su tamaño sea demasiado grande como para estar biodisponibles para ser utilizados por la microbiota. Bajo la condición estándar, no existieron diferencias significativas con respecto al control.

En la condición FQ, existieron diferencias significativas con respecto al control en la producción de lactato en todos los frutos secos y semillas, excepto en la semilla de girasol. Estas diferencias, se asocian a una disminución en su acumulación con respecto al control. En adultos, la acumulación de lactato se asocia con la disbiosis, que podría ser el resultado de la falta de bacterias metabolizadoras de lactato (Louis y Flint, 2017). En concreto, en un colon donde se produce esta acumulación se ven reemplazados Bacteroidota y Firmicutes por Actinobacteria y Proteobacteria. En nuestro caso, se ve como la acumulación de lactato se reduce significativamente bajo condiciones FQ, excepto en la semilla de girasol que no difiere significativamente del control, aun habiéndose visto aumentadas Proteobacteria y reducidas Bacteroidota y Firmicutes. Dado que la producción de AGCC se ve aumentada bajo estas condiciones, podría pensarse que esto es debido a que otras especies metabolizadoras del lactato han podido utilizarlo eficientemente como sustrato para la generación de AGCC como butirato y propionato, ambos beneficiosos para la salud del huésped (Wang et al., 2020).

Bajo la condición estándar, no existieron diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los frutos secos y semillas.

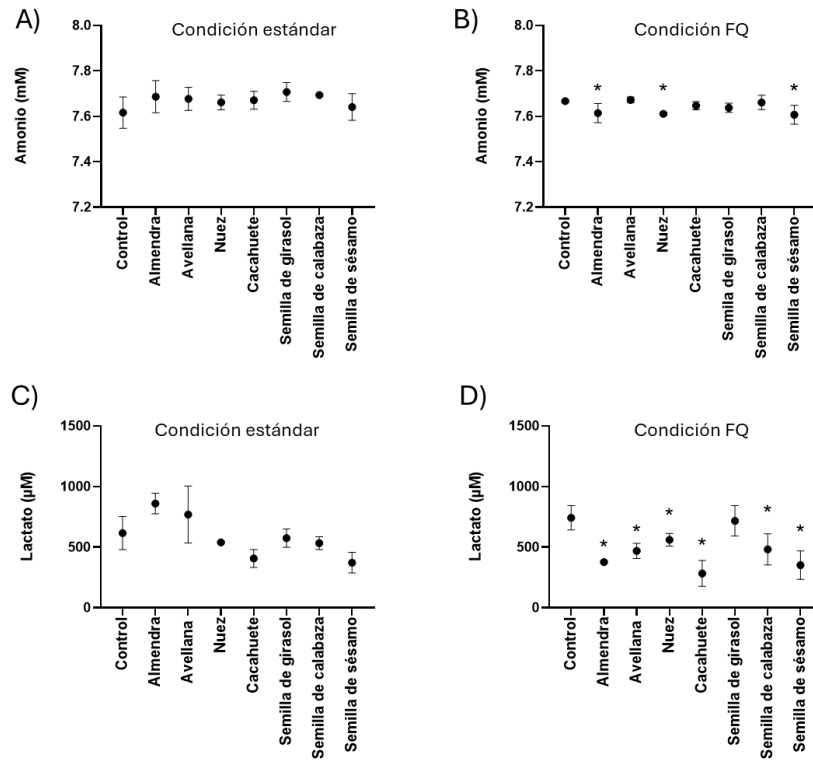


Figura 8. Concentración de metabolitos producidos por la microbiota intestinal durante la fermentación colónica *in vitro* de cada fruto seco y semilla (almendra, avellana, nuez, cacahuete, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo) bajo cada condición estudiada (condición gastrointestinal estándar y FQ). A) concentración de amonio (mM) en condiciones gastrointestinales estándar; B) concentración de amonio (mM) en condiciones gastrointestinales FQ; C) concentración de lactato (µM) en condiciones gastrointestinales estándar; D) concentración de lactato (µM) en condiciones gastrointestinales FQ. (*) expone diferencias significativas respecto al control con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó el potencial digestivo y prebiótico de fuentes vegetales ricas en fibra y grasa como son los frutos secos y semillas bajo dos condiciones gastrointestinales: estándar y FQ. Los resultados muestran que la digestibilidad tanto de lípidos como de proteínas, bajo las condiciones FQ, se ven significativamente alteradas en comparación con las condiciones estándar, poniendo de manifiesto la dificultad que presentan los individuos con esta condición para la digestión de estos macronutrientes. Asimismo, bajo las condiciones FQ las propiedades de la matriz de los frutos secos y semillas influyeron de manera directa en la digestión de los lípidos y proteínas. Aquellos alimentos que presentaron un mayor IDM (%) fueron los que mejores resultados en término de digestibilidad de macronutrientes obtuvieron, siendo la semilla de girasol la que mejor digestibilidad tanto de lípidos como proteínas obtuvo bajo esta condición, convirtiéndose en una de las potenciales fuentes vegetales ricas en fibra y grasa que puede proporcionar una mayor digestibilidad de lípidos en condiciones FQ, en el que este proceso se ve dificultado. Por el contrario, la nuez fue la matriz alimentaria que menor digestibilidad de lípidos obtuvo bajo las condiciones gastrointestinales FQ a diferencia del elevado grado de proteólisis conseguido en dichas condiciones. Asimismo, se observó como en condiciones FQ, existe una mayor influencia de la matriz alimentaria en la modulación de la hidrólisis de las grasas.

Dado que los frutos secos y semillas son alimentos de origen vegetal, las células que los componen cuentan con pared celular, que es la principal fuente de fibra que, al ser resistente a la digestión en el tracto gastrointestinal y, por ende, alcanzar la microbiota colónica, los microorganismos que la componen la pueden aprovechar como sustrato en la fermentación para la producción de metabolitos beneficiosos para el huésped como los AGCC. Como consecuencia de la fermentación colónica de estas matrices alimentarias se observaron, en todos los casos, diferencias significativas en la producción de AGCC lineales en las muestras fermentadas con inóculos procedentes de individuos con FQ, bajo condiciones gastrointestinales FQ, poniendo de manifiesto el efecto positivo de estas fibras en la producción de estos ácidos bajo estas condiciones. La semilla de girasol fue la que, en conjunto, produjo mayores concentraciones de AGCC, tanto lineales como ramificados, bajo las condiciones FQ, resultado que expone que además de su gran contenido en fibra, ésta es la fibra más eficientemente utilizada por la microbiota FQ, entre todos los frutos secos y semillas analizados.

Asimismo, es conocida la existente disbiosis en individuos con FQ debida a una disminución de filos relacionados con una microbiota saludable, como Firmicutes y Bacteroidetes. Se ha comprobado el efecto negativo que produce la presencia de grasa no digerida en términos de composición y abundancia de la microbiota colónica FQ observándose un patrón común en la reducción de la abundancia relativa de géneros antiinflamatorios como *Bacteroides* y *Alistipes*, relacionados con la salud, y un aumento de géneros proinflamatorios como *Acidaminococcus* y *Prevotella*. Aun así, la semilla de girasol fue la matriz alimentaria que menos influencia por las condiciones intestinales obtuvo y, por tanto, la que menos incremento de géneros proinflamatorios presentó.

Tras conocer los resultados obtenidos *in vitro*, sería conveniente comprobar el papel que puede jugar la ingesta de estas matrices alimentarias *in vivo*, sobre todo aquellas en las que se ha obtenido un resultado favorable, como la semilla de girasol. Asimismo, debido a la escasez bibliográfica en cuanto a este aspecto, hay que destacar la importancia del estudio de las matrices de los frutos secos y semillas analizadas para poder comprender mejor su influencia durante el proceso de digestión para futuros trabajos de investigación.

6. 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>
- Alasalvar, C., Chang, S. K., Bolling, B., Oh, W. Y., & Shahidi, F. (2021). Specialty seeds: Nutrients, bioactives, bioavailability, and health benefits: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(3), 2382–2427. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12730>
- Amaretti, A., Gozzoli, C., Simone, M., Raimondi, S., Righini, L., Pérez-Brocal, V., García-López, R., Moya, A., & Rossi, M. (2019). Profiling of protein degraders in cultures of human gut Microbiota. *Frontiers in microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02614>
- Arya, S. S., Salve, A. R., & Chauhan, S. (2016). Peanuts as functional food: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2007-9>
- 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>
- Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2020). Enhancing the nutritional profile and digestibility of lentil flour by solid state fermentation with *Pleurotus ostreatus*. *Food & Function*, 11(9), 7905–7912. <https://doi.org/10.1039/d0fo01527j>
- Asensio-Grau, A., Calvo-Lerma, J., Heredia, A., & Andrés, A. (2021). In vitro digestion of salmon: Influence of processing and intestinal conditions on macronutrients digestibility. *Food Chemistry*, 342, 128387.
- Asensio-Grau, A., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). Effect of cooking methods and intestinal conditions on lipolysis, proteolysis and xanthophylls bioaccessibility of eggs. *Journal of Functional Foods*, 46, 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.025>
- Augustin, L. S. A., Aas, A.-M., Astrup, A., Atkinson, F. S., Baer-Sinnott, S., Barclay, A. W., Brand-Miller, J. C., Brighenti, F., Bullo, M., Buyken, A. E., Ceriello, A., Ellis, P. R., Ha, M.-A., Henry, J. C., Kendall, C. W. C., La Vecchia, C., Liu, S., Livesey, G., Poli, A., ... Jenkins, D. J. A. (2020). Dietary fibre consensus from the international carbohydrate quality consortium (ICQC). *Nutrients*, 12(9), 2553. <https://doi.org/10.3390/nu12092553>
- Baer, D. J., Dalton, M., Blundell, J., Finlayson, G., & Hu, F. B. (2023). Nuts, energy balance and body weight. *Nutrients*, 15(5), 1162. <https://doi.org/10.3390/nu15051162>
- Barrack, K. E., Hampton, T. H., Valls, R. A., Surve, S. V., Gardner, T. B., Sanville, J. L., Madan, J. L., & O'Toole, G. A. (2024). An *in vitro* medium for modeling gut dysbiosis associated with cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology*, 206(1). <https://doi.org/10.1128/jb.00286-23>
- Beam, A., Clinger, E., & Hao, L. (2021). Effect of diet and dietary components on the composition of the gut Microbiota. *Nutrients*, 13(8), 2795. <https://doi.org/10.3390/nu13082795>

- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Chen, A., Hu, S., Zhu, D., Zhao, R., Huang, C., & Gao, Y. (2023). Lipid droplets proteome reveals dynamic changes of lipid droplets protein during embryonic development of *Carya cathayensis* nuts. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 334(111753), 111753. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111753>
- Cirrincione, S., Aiuto, B., Gosso, E., Schiavone, C., Portesi, C., Rossi, A. M., Monti, G., Cavallarín, L., Lamberti, C., & Giuffrida, G. M. (2023). Proteomic study of walnut oleosome and first evidence on oleosin sensitization in allergic patients. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 121(105386), 105386. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105386>
- Coelho, O. G. L., Cândido, F. G., & Alfenas, R. de C. G. (2019). Dietary fat and gut microbiota: mechanisms involved in obesity control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(19), 3045–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1481821>
- Conlon, M., & Bird, A. (2014). The impact of diet and lifestyle on gut Microbiota and human health. *Nutrients*, 7(1), 17–44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>
- De Souza, R., Schincaglia, R., Pimentel, G., & Mota, J. (2017). Nuts and human health outcomes: A systematic review. *Nutrients*, 9(12), 1311. <https://doi.org/10.3390/nu9121311>
- Dickinson, K. M., & Collaco, J. M. (2021). Cystic fibrosis. *Pediatrics in Review*, 42(2), 55–67. <https://doi.org/10.1542/pir.2019-0212>
- Diether, N. E., & Willing, B. P. (2019). Microbial fermentation of dietary protein: An important factor in diet–microbe–host interaction. *Microorganisms*, 7(1), 19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010019>
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., & Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546–1562. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421900>
- Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., Lener, E., Mele, M. C., Gasbarrini, A., Collado, M. C., Cammarota, G., & Ianiro, G. (2023). Short-chain fatty-acid-producing bacteria: Key components of the human gut Microbiota. *Nutrients*, 15(9), 2211. <https://doi.org/10.3390/nu15092211>
- Guo, Q., Ye, A., Bellissimo, N., Singh, H., & Rousseau, D. (2017). Modulating fat digestion through food structure design. *Progress in Lipid Research*, 68, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.10.001>

- He, C., Wu, Q., Hayashi, N., Nakano, F., Nakatsukasa, E., & Tsuduki, T. (2020). Carbohydrate-restricted diet alters the gut microbiota, promotes senescence and shortens the life span in senescence-accelerated prone mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 78(108326), 108326. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108326>
- Hills, R., Pontefract, B., Mishcon, H., Black, C., Sutton, S., & Theberge, C. (2019). Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. *Nutrients*, 11(7), 1613. <https://doi.org/10.3390/nu11071613>
- Hou, J.-J., Wang, X., Li, Y., Su, S., Wang, Y.-M., & Wang, B.-M. (2021). The relationship between gut microbiota and proteolytic activity in irritable bowel syndrome. *Microbial Pathogenesis*, 157(104995), 104995. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104995>
- Jian, F., Zhang, Z., Li, D., Luo, F., Wu, Q., Lu, F., Dai, Z., Nie, M., Xu, Y., Feng, L., & Gu, Q. (2023). Evaluation of the digestibility and antioxidant activity of protein and lipid after mixing nuts based on in vitro and in vivo models. *Food Chemistry*, 414(135706), 135706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135706>
- Kaminski, B. A., Goldsweig, B. K., Sidhaye, A., Blackman, S. M., Schindler, T., & Moran, A. (2019). Cystic fibrosis related diabetes: Nutrition and growth considerations. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 18, S32–S37. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.08.011>
- Ketnawa, S., Wickramathilaka, M., & Liceaga, A. M. (2018). Changes on antioxidant activity of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. *Food Chemistry*, 254, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.133>
- Kim, M. J., Park, S., Park, J. W., Choi, J., Kim, H. J., Lim, H.-K., Ryoo, S.-B., Park, K. J., Ji, Y., & Jeong, S.-Y. (2023). Gut microbiome associated with low anterior resection syndrome after rectal cancer surgery. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34557-2>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- Kutney, K. A., Sandouk, Z., Desimone, M., & Moheet, A. (2021). Obesity in cystic fibrosis. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 26(100276), 100276. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2021.100276>
- Lamothe, S., Azimy, N., Bazinet, L., Couillard, C., & Britten, M. (2014). Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & Function*, 5(10), 2621–2631. <https://doi.org/10.1039/c4fo00203b>
- Li, C., Yu, W., Wu, P., & Chen, X. D. (2020). Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 114–126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>
- Li, L., & Somerset, S. (2014). Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: Challenges for nutrition therapy. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 46(10), 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.06.011>

- Lin, L., & Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0187-3>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- Mandalari, G., Gervasi, T., Rosenberg, D. W., Lapsley, K. G., & Baer, D. J. (2023). Effect of nuts on gastrointestinal health. *Nutrients*, *15*(7), 1733. <https://doi.org/10.3390/nu15071733>
- Mandalari, G., Parker, M., Grundy, M., Grassby, T., Smeriglio, A., Bisignano, C., Raciti, R., Trombetta, D., Baer, D., & Wilde, P. (2018). Understanding the effect of particle size and processing on almond lipid bioaccessibility through microstructural analysis: From mastication to faecal collection. *Nutrients*, *10*(2), 213. <https://doi.org/10.3390/nu10020213>
- Mariotti Zani, E., Grandinetti, R., Cunico, D., Torelli, L., Fainardi, V., Pisi, G., & Esposito, S. (2023). Nutritional care in children with cystic fibrosis. *Nutrients*, *15*(3), 479. <https://doi.org/10.3390/nu15030479>
- McDonald, C. M., Reid, E. K., Pohl, J. F., Yuzyuk, T. K., Padula, L. M., Vavrina, K., & Altman, K. (2024). Cystic fibrosis and fat malabsorption: Pathophysiology of the cystic fibrosis gastrointestinal tract and the impact of highly effective CFTR modulator therapy. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, *39*(S1). <https://doi.org/10.1002/ncp.11122>
- Méndez-Salazar, E. O., Ortiz-López, M. G., Granados-Silvestre, M. de L. Á., Palacios-González, B., & Menjivar, M. (2018). Altered gut Microbiota and compositional changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican undernourished and obese children. *Frontiers in microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02494>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised staticin vitrodigestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2015). Usefulness of ¹H NMR in assessing the extent of lipid digestion. *Food Chemistry*, *179*, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.104>
- Omer, E., & Chiodi, C. (2024). Fat digestion and absorption: Normal physiology and pathophysiology of malabsorption, including diagnostic testing. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, *39*(S1). <https://doi.org/10.1002/ncp.11130>
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The genus *Alistipes*: Gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Frontiers in immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00906>

- Pérez-Burillo, S., Mehta, T., Esteban-Muñoz, A., Pastoriza, S., Paliy, O., & Ángel Rufián-Henares, J. (2019). Effect of in vitro digestion-fermentation on green and roasted coffee bioactivity: The role of the gut microbiota. *Food Chemistry*, 279, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.137>
- 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. *Nature Protocols*, 16(7), 3186–3209. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00537-x>
- Polgreen, P. M., & Comellas, A. P. (2022). Clinical phenotypes of cystic fibrosis carriers. *Annual Review of Medicine*, 73(1), 563–574. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042120-020148>
- Portincasa, P., Bonfrate, L., Vacca, M., De Angelis, M., Farella, I., Lanza, E., Khalil, M., Wang, D. Q.-H., Sperandio, M., & Di Ciaula, A. (2022). Gut Microbiota and short chain fatty acids: Implications in glucose homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1105. <https://doi.org/10.3390/ijms23031105>
- Precup, G., & Vodnar, D.-C. (2019). Gut *Prevotella* as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *The British Journal of Nutrition*, 122(2), 131–140. <https://doi.org/10.1017/s0007114519000680>
- Rafeeq, M. M., & Murad, H. A. S. (2017). Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1193-9>
- Ratjen, F., & Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet*, 361(9358), 681–689. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)12567-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)12567-6)
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut Microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rinninella, E., Tohumcu, E., Raoul, P., Fiorani, M., Cintoni, M., Mele, M. C., Cammarota, G., Gasbarrini, A., & Ianiro, G. (2023). The role of diet in shaping human gut microbiota. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 62–63(101828), 101828. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2023.101828>
- Ritivoiu, M.-E., Drăgoi, C. M., Matei, D., Stan, I. V., Nicolae, A. C., Craiu, M., Dumitrescu, I.-B., & Ciolpan, A. A. (2023). Current and future therapeutic approaches of exocrine pancreatic insufficiency in children with cystic fibrosis in the era of personalized medicine. *Pharmaceutics*, 15(1), 162. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010162>
- Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: A common factor in human diseases. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
- Rocchetti, G., Chioldelli, G., Giuberti, G., & Lucini, L. (2018). Bioaccessibility of phenolic compounds following in vitro large intestine fermentation of nuts for human consumption. *Food Chemistry*, 245, 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.146>

- Rodríguez-Romero, J. de J., Durán-Castañeda, A. C., Cárdenas-Castro, A. P., Sánchez-Burgos, J. A., Zamora-Gasga, V. M., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2022). What we know about protein gut metabolites: Implications and insights for human health and diseases. *Food Chemistry: X*, *13*(100195), 100195. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100195>
- Ros, E., Singh, A., & O’Keefe, J. H. (2021). Nuts: Natural pleiotropic nutraceuticals. *Nutrients*, *13*(9), 3269. <https://doi.org/10.3390/nu13093269>
- Salas-Salvadó, J., & Pascual-Compte, M. (2023). Nuts and seeds. En *Encyclopedia of Human Nutrition* (pp. 513–522). Elsevier.
- Schoeler, M., & Caesar, R. (2019). Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *20*(4), 461–472. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>
- Singh, V., Lee, G., Son, H., Koh, H., Kim, E. S., Unno, T., & Shin, J.-H. (2023). Butyrate producers, “The Sentinel of Gut”: Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1103836>
- Somaratne, G., Ferrua, M. J., Ye, A., Nau, F., Flourey, J., Dupont, D., & Singh, J. (2020). Food material properties as determining factors in nutrient release during human gastric digestion: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(22), 3753–3769. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1707770>
- Strandvik, B. (2022). Nutrition in cystic fibrosis—some notes on the fat recommendations. *Nutrients*, *14*(4), 853. <https://doi.org/10.3390/nu14040853>
- 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 progression. *Microorganisms*, *11*(1), 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010009>
- 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>
- Timm, M., Offringa, L. C., Van Klinken, B. J.-W., & Slavin, J. (2023). Beyond insoluble dietary fiber: Bioactive compounds in plant foods. *Nutrients*, *15*(19), 4138. <https://doi.org/10.3390/nu15194138>
- Tojo, R. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *20*(41), 15163. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i41.15163>
- 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>
- Wang, M., Zhou, J., Calvo-Lerma, J., Liu, Y., Collado, M. C., & Barba, F. J. (2022). Effects of Marine Bioactive Compounds on Gut Ecology Based on In Vitro Digestion and Colonic Fermentation Models. *Nutrients*, *14*(16), 3307. <https://doi.org/10.3390/nu14163307>

- Wang, S. P., Rubio, L. A., Duncan, S. H., Donachie, G. E., Holtrop, G., Lo, G., Farquharson, F. M., Wagner, J., Parkhill, J., Louis, P., Walker, A. W., & Flint, H. J. (2020). Pivotal roles for pH, lactate, and lactate-utilizing bacteria in the stability of a human colonic microbial ecosystem. *mSystems*, 5(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00645-20>
- Woestenenk, J. W., Schulkes, D. A., Schipper, H. S., van der Ent, C. K., & Houwen, R. H. J. (2017). Dietary intake and lipid profile in children and adolescents with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 16(3), 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.02.010>
- Wouthuyzen-Bakker, M., Bodewes, F. A. J. A., & Verkade, H. J. (2011). Persistent fat malabsorption in cystic fibrosis; lessons from patients and mice. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 10(3), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.03.008>
- Wu, S., Bhat, Z. F., Gounder, R. S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Ding, Y., & Bekhit, A. E.-D. A. (2022). Effect of dietary protein and processing on gut Microbiota—A systematic review. *Nutrients*, 14(3), 453. <https://doi.org/10.3390/nu14030453>
- Zhao, F., Liu, C., Bordoni, L., Petracci, I., Wu, D., Fang, L., Wang, J., Wang, X., Gabbianelli, R., & Min, W. (2022). Advances on the antioxidant peptides from nuts: A narrow review. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(10), 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox11102020>
- Zhou, H., Tan, Y., & McClements, D. J. (2023). Applications of the INFOGEST in vitro digestion model to foods: A review. *Annual Review of Food Science and Technology*, 14(1), 135–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>

7. ANEXOS

7.1 ANEXO I. Relación del trabajo con los objetivos de desarrollo sostenible de la agenda 2030.

A. Indicar el grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	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

B. Describir brevemente la alineación del TFG/TFM con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

Este trabajo se alinea, en un alto grado, con el ODS número 3: Salud y Bienestar. Este ODS tiene como meta garantizar una vida saludable y promover el bienestar de todas las personas y edades. Este trabajo contribuye a la mejora de la salud y bienestar de un grupo vulnerable, como son los individuos con fibrosis quística. Asimismo, apoya varias metas específicas de este ODS. En primer lugar, se relaciona con la reducción de la mortalidad y la mejora de la calidad de vida al identificar fuentes alimenticias para la mejora de la digestión, así como la promoción de la salud al tratarse del estudio de alimentos ricos en grasas saludables y fibra los cuales pueden ayudar a desarrollar recomendaciones dietéticas que promuevan el bienestar de las personas con fibrosis quística. Finalmente, contribuye a promover el bienestar, así como el desarrollo de nuevas soluciones para problemas de salud existentes.

7.2 ANEXO II. Hoja de información para los padres/representantes legales de los donantes.

HOJA DE INFORMACIÓN PARA LOS PADRES/REPRESENTANTES LEGALES DE LOS DONANTES

Versión: 1	Fecha de la versión: 20/09/2023
Investigador Principal: Andrea Asensio Grau, Investigadora Principal de proyecto	
CENTRO ENCARGADO: Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos - UPV	
Título del proyecto de investigación: Estudio de las interacciones fibra-microbiota orientado al desarrollo de simbióticos moduladores de la disbiosis en fibrosis quística	

1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se invita a su hijo/a a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Politécnica de Valencia. El estudio está enmarcado en la convocatoria Primeros Proyectos de Investigación de la UPV (PAID PAID-06-22) financiada por el Vicerrectorado de Investigación (Universitat Politècnica de València).

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no que su hijo/a participe en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que la participación de su hijo/a en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

La microbiota colónica es el conjunto de poblaciones de microorganismos, como bacterias, que habitan en el colon, y que una pequeña proporción se excreta con las heces. Estos microorganismos desempeñan funciones muy importantes para el organismo y están relacionadas con el mantenimiento del estado nutricional. Sin embargo, se ha evidenciado que la microbiota en personas con fibrosis quística se encuentra alterada. Existen algunos mecanismos para modificar la microbiota, favoreciendo el aumento de bacterias beneficiosas y disminuyendo las perjudiciales. Esto se puede conseguir con suplementos de compuestos prebióticos, la mayoría de ellos fibras dietéticas procedentes de frutas y otros alimentos de origen vegetal, así como con cepas probióticas.

El estudio que planteamos consiste en simular la digestión de niños/as con fibrosis quística en el laboratorio y estudiar el efecto de la combinación de prebióticos y cepas probióticas sobre el cambio en la microbiota colónica. Para ello se requiere utilizar las bacterias presentes en las heces de donantes, y así poder reproducir con exactitud el entorno digestivo. Así pues, la participación de su hijo/a en el estudio consiste en la donación de una muestra de heces. La muestra de heces corresponderá a una deposición entera, y deberá realizarse el día previsto de entrega o como mucho, 24 horas antes. La conservación de la muestra en el bote que les entregamos deberá ser en nevera.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Debe saber que su participación en este estudio no aportará beneficios directos a su hijo/a. Por otro lado, no supone ningún tipo de riesgo para el donante puesto que no incluye ningún tipo de medicamento ni pauta de tratamiento fuera de lo habitual o de lo que indican las guías clínicas.

El mayor beneficio para ustedes y su hijo/a se espera conseguir en una fase más avanzada de la investigación. De los resultados de este proyecto se podrá establecer si alguno de los compuestos prebióticos evaluados tiene un efecto beneficioso en mejorar la microbiota colónica.

5. CONFIDENCIALIDAD:

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos y garantía de los derechos digitales y en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD) . De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición, cancelación de datos, limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos y solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio o al/a la Delegado/a de Protección de

Datos de la Institución, con quién podrá comunicarse a través del teléfono y/o dirección de correo electrónico: dpd@gva.es.

Le recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio, para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de los datos de su hijo/a y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificar a su hijo/a, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con su hijo/a y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica.

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, la información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de la salud de su hijo/a y por el promotor para otros fines de investigación científica si se hubiera otorgado consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Sólo se cederán datos recogidos para el estudio, a terceros u a otros países, que en ningún caso contendrán información que pueda identificar directamente a su hijo/a, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Si realizáramos transferencia de los datos codificados de su hijo/a fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar con el Delegado de Protección de Datos del promotor (dpd@gva.es).

6. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que la participación de su hijo/a en éste no le supondrá ningún gasto. Asimismo, no obtendrá ningún tipo de compensación económica.

7. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:

Cualquier nueva información que se descubra durante la participación de su hijo/a y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para que su hijo/a participe en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que su hijo/a puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad o porque consideren que su hijo/a no está cumpliendo con los procedimientos establecidos.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

8. OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten.

En concreto se recogerán muestras de heces para analizar distintos indicadores que puedan explicar los resultados de malabsorción de grasa en las mismas: concentración de metabolitos, valor de pH, indicadores de consistencia y perfil de microbiota.

CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Título del estudio: **Estudio de las interacciones fibra-microbiota orientado al desarrollo de simbióticos moduladores de la disbiosis en fibrosis quística**

Yo, _____ (*nombre y apellidos*)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____ (*nombre del Investigador*)

Comprendo que la participación de _____ (*nombre del participante*) es voluntaria.

Comprendo que _____ (*nombre del participante*) puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a _____ (*nombre del participante*), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Y presto mi conformidad con que _____ (*nombre del participante*) participe en el estudio.

Firma del Representante

Firma del Investigador

Nombre:

Fecha: ____/____/____

Nombre:

Fecha: ____/____/____

7.3 ANEXO III. Turnitin.



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Aida Escudero Urrea
Título del ejercicio: Curso 24_25 GENERAR INFORME TURNITIN TFGTFM ETSEAMN
Título de la entrega: 43465740:TFGturnitin.pdf
Nombre del archivo: Assignments_3a6fdd74-251c-4b9a-a8d7-f4d46fc18360_TFGt...
Tamaño del archivo: 961.37K
Total páginas: 45
Total de palabras: 19,556
Total de caracteres: 107,985
Fecha de entrega: 07-jul.-2024 10:15a. m. (UTC+0200)
Identificador de la entrega: 2413315807

DIGESTIBILIDAD Y CAPACIDAD PROBIÓTICA DE FUENTES VEGETALES RICAS EN GRASA Y FIBRA EN INDIVIDUOS CON FIBROSIS QUISTICA

RESUMEN

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de herencia autosómica recesiva que afecta principalmente a los pulmones, pero también al páncreas, hígado e intestino, originando secreciones espesas y opacas de las glándulas exocrinas. A nivel digestivo, estas secreciones limitan la llegada del jugo pancreático y biliar al duodeno, dando lugar a una malabsorción y malnutrición de origen y consecuencias, y en especial de los grasos. Asimismo, los individuos de FQ presentan a menudo una microbiota colónica disbiótica consecuencia, entre otros factores, de una dieta rica en grasos y de una ingesta reducida de fibra. Así, el objetivo general de este estudio es analizar los posibles beneficios derivados del consumo de alimentos vegetales ricos en grasos y fibra (abreñosa, avellana, cacahute, maíz, semilla de girasol, semilla de calabaza y semilla de sésamo). Para ello, se realizaron ensayos *in vitro* de digestibilidad y de fermentación colónica simulando las condiciones gastrointestinales propias de la FQ. Concretamente, se determinó tras la etapa de digestión gástricointestinal el índice de digestibilidad de la materia, la digestibilidad de proteínas y lípidos, mientras que tras la etapa de fermentación colónica se valoró su influencia en los cambios en el perfil de la microbiota mediante secuenciación del gen *16S* así como la producción de acetato, butiro y ácidos grasos de cadena corta como consecuencia de la fermentación colónica. Los resultados evidenciaron la influencia directa de las condiciones gastrointestinales FQ que afectaban la digestibilidad de lípidos y proteínas, y afectando en gran medida a la bioaccesibilidad de macronutrientes. En este sentido, las semillas de girasol fue la muestra que mejor digestibilidad de materia, mejor digestibilidad de lípidos y proteínas presentó al ser digerida en condiciones FQ. Asimismo, se vio también la capacidad moduladora de estas abreñosas, maíz en fibra y grasos, sobre la composición y abundancia de la microbiota colónica, observándose el impacto negativo que tiene la presencia de grasos sobre la microbiota. Concretamente, se observó una reducción de algunos géneros antiinflamatorios como *Blautia* y *Lactobacillus* y un aumento de algunos géneros proinflamatorios como *Acetivibrio* y *Prevotella*.

PALABRAS CLAVE: Fibrosis quística, digestibilidad, capacidad probiótica, microbiota, disbiosis, fibra y grasos.