

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“BIOCONVERSIÓN DE ISOFLAVONAS DE LA SOJA  
POR MICROBIOTA INTESTINAL MEDIANTE  
INCUBACIONES *EX VIVO*”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**POR**

**MARTA COLINAS RODRÍGUEZ**

**JULIO, 2014**





Máster en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/>



**PROFESOR TUTOR:**

Dra. Dña. **Susana Delgado Palacio**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC).

**CERTIFICA:**

Que D. **Marta Colinas Rodríguez** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Villaviciosa, 30 de Junio de 2014

Dra. Dña. Susana Delgado Palacio

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

## AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, al final de un largo año dedicado al Máster que concluye con la presentación de la memoria de este proyecto, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han hecho posible que se llevara a cabo:

Al Dr. Baltasar Mayo Pérez, por permitirme realizar este proyecto en el grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA y a mi tutora, la Dra. Susana Delgado Palacio, por todo lo que me ha enseñado en estos meses. Agradecer también a Lucía Guadamuro sus consejos, ayuda y ánimos.

A todos los miembros del Instituto de Productos Lácteos de Asturias, por el compañerismo y el buen trato recibido durante mi estancia en el centro. Gracias a la Dra. Begoña Redruello y a Ana María Hernández Barranco por *pincharme* las muestras.

A todos mis compañeros del Máster, y en especial a Lei y David, por ser también mis compañeros de viajes, por los cantos a pleno pulmón no importara la hora que fuera, por esas risas capaces de alegrarle el día a cualquiera y por nuestras escapadas, y a Guillermo, mi compañero de laboratorio, por estar ahí cada día. A Rosana, por ser un gran apoyo para mí.

A toda la gente, familiares y amigos, que me ha apoyado durante la realización de este proyecto. A Nacho, por ayudarme a revisar la memoria, gracias por seguir siendo mi compañero de batallas aún en la distancia.

Y finalmente y de la manera más especial dar las gracias a mi madre, a mi abuela y a mi hermana, por todo lo que me dais a diario, por ser tierra firme, piedras a las que saltar sin miedo a caer en el agua y por enseñarme que la recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMEN</b>	I
<b>ABSTRACT</b>	II
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	III
<b>LISTA DE TABLAS</b>	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1 Antecedentes</b>	2
<b>1.2 Situación actual</b>	3
<b>1.3 Objetivos</b>	5
<b>2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS</b>	7
<b>2.1 Los polifenoles de la dieta</b>	8
<b>2.2 Soja e isoflavonas</b>	12
2.2.1 Las isoflavonas de soja como fitoestrógenos	13
2.2.2 El equol	16
<b>2.3 Propiedades beneficiosas de las isoflavonas de la soja en la mejora de los síntomas asociados a la menopausia</b>	18
<b>2.4 Metabolismo de las isoflavonas de la soja en el organismo</b>	20
2.4.1 La microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) humano	21
2.4.2 Biodisponibilidad, distribución, metabolismo y excreción de isoflavonas en el organismo	24
2.4.3 Microorganismos de la microbiota intestinal con capacidad de activar las isoflavonas	29
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	31
<b>3.1 Cultivos con <i>Slackia</i> spp. y cultivos fecales en un modelo colónico experimental</b>	32

3.1.1 Medios, cepas y condiciones de cultivo	32
3.1.2 Fermentaciones en discontinuo	34
<b>3.2 Análisis de comunidades bacterianas mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)</b>	<b>37</b>
3.2.1 Extracción de ADN bacteriano a partir de cultivos puros de <i>Slackia</i> spp.	38
3.2.2 Extracción de ADN microbiano total	39
3.2.3 Amplificación parcial del gen del ARNr16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
3.2.4 DGGE	42
3.2.5 Secuenciación de bandas de DGGE	43
<b>3.3 Determinación de isoflavonas y metabolitos derivados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC)</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) mediante cromatografía de gases (CG).</b>	<b>45</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
4.1 Ensayos de cultivo de <i>Slackia</i> spp.	47
4.2 Ensayos de las condiciones de fermentación	48
4.2.1 Fermentaciones en agitación o en estático	49
4.2.2 Tiempo de duración de las fermentaciones	50
4.3 Biodisponibilidad de isoflavonas en medio colónico bacteriano (MCB)	53
4.4 Evaluación de la viabilidad celular bacteriana mediante tratamiento con monoazida de etidio (EMA)	54
4.5 Cultivos con <i>Slackia</i> spp. y cultivos fecales en un modelo colónico experimental	55
4.5.1 Cultivos con <i>Slackia</i> spp.	56
4.5.2 Cultivos fecales.	58
4.6 Determinación de SCFAs	64
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>72</b>

## RESUMEN

La menopausia es el momento de la vida de la mujer en el que cesa la actividad reproductiva por la disminución progresiva en los niveles de estrógenos endógenos, lo que suele generar síntomas indeseados como los sofocos. Desde los años 30 se venía utilizando, para tratar de combatir estos síntomas, la terapia hormonal sustitutiva, basada en el uso de estrógenos sintéticos exógenos. Sin embargo, en la década pasada, se publicaron una serie de estudios que correlacionaban este tipo de tratamientos con la aparición de graves efectos adversos. Hoy día se intenta buscar un tratamiento natural que no sea perjudicial para la mujer, y, las isoflavonas de la soja se consideran buenas candidatas por su papel fitoestrogénico. Para que las isoflavonas de la dieta actúen en el organismo debe producirse su bioconversión hacia otros metabolitos derivados, como el equol, que presenta una alta analogía estructural con los estrógenos animales. La bioconversión de las isoflavonas es llevada a cabo por la microbiota intestinal en la porción más distal del tracto gastrointestinal y se sabe que solo un 30 % de la población es capaz de producir equol. En base a esto, se investiga la posibilidad de combinar isoflavonas y microorganismos en alimentos funcionales de los que puedan beneficiarse todas las mujeres. El objetivo de este trabajo fue investigar el papel de la microbiota intestinal en las rutas de bioconversión de isoflavonas. Para ello, se llevó a cabo, en un modelo colónico, la incubación de manera combinada de isoflavonas de soja comerciales con heces de mujeres menopáusicas capaces de excretar equol en orina (tratadas previamente durante seis meses con un preparado comercial de isoflavonas). Estas heces podrían estar enriquecidas en microorganismos que transforman estos compuestos y podrían ser una buena fuente para la identificación y aislamiento de los mismos. De los análisis de los metabolitos derivados de las transformaciones microbianas de isoflavonas de soja mediante UPLC y del análisis de las comunidades microbianas mediante DGGE se concluyó que en el modelo experimental propuesto la bioconversión de isoflavonas hacia equol es posible y que la producción de equol es mayor en presencia de una comunidad microbiana compleja. Este trabajo supuso el desarrollo de un modelo en el que estudiar el metabolismo de las isoflavonas de soja por la microbiota fecal para investigaciones futuras que concluyan con el aislamiento y la identificación de nuevos microorganismos intestinales implicados en la bioconversión de de estos compuestos.

## ABSTRACT

Menopause in women, is the moment of life in which the reproductive activity ceases by the progressive decrease in the levels of endogenous estrogen; this often carries unwanted symptoms such as hot flashes. Since the 30's, hormone replacement therapy, based on the use of exogenous synthetic estrogens, had been used to palliate these symptoms. However, in the past decade, a number of studies that correlate this type of treatment with the occurrence of serious adverse effects were published. Nowadays, a treatment free of adverse effects for women is being searched, considering the soy isoflavones as a good alternative because of the phytoestrogenic activity that has been attributed to them. The bioconversion of dietary isoflavones into other active metabolites, such as equol, which has high structural similarity with animal estrogens, is necessary so that the isoflavones can act in the organism. Isoflavone bioconversion is carried out by the intestinal microbiota in the distal portion of the gastrointestinal tract. In spite of this, it is well known that only 30 % of the population is able to produce equol. On this basis, the ability to combine isoflavones and microorganisms in a functional food that can benefit all women is being investigated. The aim of this work was to research the role of the intestinal microbiota in the routes of bioconversion of isoflavones. This was carried out in a colonic model by incubation of commercial soy isoflavones in combination with faeces of menopausal women treated during six month with the same commercial isoflavones and who had previously been described as producers of equol in urine. These faeces could be enriched in microorganisms transforming these compounds, thus constituting a good source for the isolation and identification thereof. From the analysis of metabolites derived of microbial transformations of soy isoflavonas by UPLC and the analysis of microbial communities by DGGE it was concluded that the bioconversion to equol is possible in the proposed model and that its production is enhanced in the presence of a complex microbial community. This work involved the development of a model in which to study the metabolism of soy isoflavones by fecal microbiota for future research that could conclude with the isolation and identification of novel intestinal microorganisms implicated in the routes of bioconversion of these compounds.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	Pág.
1	Principales representantes de los subgrupos de flavonoides naturales y sus fuentes alimentarias.	10
2	Estructura del esqueleto central de las isoflavonas, sustituyentes y posiciones de sustitución que dan lugar a las isoflavonas en sus formas agliconas, entre ellas las de la soja (genisteína, daidzeína y gliciteína).	11
3	Estructura química de las tres isoflavonas mayoritarias en la soja en sus formas glicosiladas (daidzina, genistina y glicitina) y en sus formas agliconas (daidzeína, genisteína y gliciteína) y sus respectivos pesos moleculares.	12
4	Analogía en la estructura molecular entre el 17- $\beta$ -estradiol y las isoflavonas genisteína y daidzeína de la soja.	15
5	Similitud estructural entre el equol derivado de la isoflavonas el estradiol.	17
6	Aspectos espaciales y temporales de la composición de la microbiota del TGI.	22
7	Esquema representando las reacciones de transformación de los precursores glicosilados de las isoflavonas en sus correspondientes formas activas por medio de las actividades de tipo $\beta$ -glucosidasas mayoritariamente de las bacterias intestinales.	25
8	Rutas de biotransformación de daidzeína y de genisteína por la microbiota intestinal.	27
9	Representación esquemática del destino metabólico de los polifenoles de la dieta.	28
10	Esquema de los cultivos con las cepas del género <i>Slackia</i> , cultivos fecales con las heces de mujeres productoras de equol o cultivos combinando las cepas de <i>Slackia</i> y las heces.	35

<b>11</b>	Esquema del procedimiento para la toma de muestras de las fermentaciones hasta su congelación para su posterior procesamiento.	37
<b>12</b>	Unión selectiva del PMA (monoazida de propidio), un análogo funcional del EMA, al ADN de las células con membranas alteradas formando complejos que impiden la posterior amplificación por PCR.	40
<b>13</b>	Morfología de <i>S. equolifaciens</i> DSM 24851 y de <i>S. isoflavoniconvertens</i> DSM 22006.	48
<b>14</b>	Cultivo fecal con las heces de la mujer 14.3 en MCB <sub>ISO</sub> ensayando condiciones estáticas o agitadas del medio de fermentación.	50
<b>15</b>	Cultivo en medio MCB <sub>ISO</sub> con <i>S. equolifaciens</i> DSM 24851 o con <i>S. isoflavoniconvertens</i> DSM 22006 a las 24 y/o 48 h de la fermentación.	51
<b>16</b>	Cultivos fecales con las heces de las mujeres 1.1 o 14.3 en medio MCB <sub>ISO</sub> a las 24 y 48 h de la fermentación.	52
<b>17</b>	Biodisponibilidad de isoflavonas en el medio MCB <sub>ISO</sub> .	53
<b>18</b>	Comparación de los patrones de bandas de DGGE para el gen del ARNr16S entre las muestras procedentes de los cultivos en MCB o MCB <sub>ISO</sub> con las heces de las mujeres 1.1, 9.3 y 14.3 sometidas o no a tratamiento con EMA con anterioridad a la extracción del ADN de la comunidad microbiana total.	55
<b>19</b>	Cultivos con <i>S. equolifaciens</i> DSM 24851 y/o <i>S. isoflavoniconvertens</i> DSM 22006 en medio MCB y MCB <sub>ISO</sub> .	57
<b>20</b>	Determinación de equol mediante UPLC en medio MCB <sub>ISO</sub> en diferentes muestras procedentes de cultivos con <i>S. equolifaciens</i> DSM 24851, de cultivos con las heces de las mujeres 1.1, 9.3 y 14.3 y de cultivos con las heces de las mujeres 1.1 y/o 9.3 en combinación con <i>S. equolifaciens</i> DSM 24851.	58

- |           |   |    |
|-----------|---|----|
| <b>21</b> | Determinación mediante UPLC de isoflavonas en sus formas glicosiladas, daidzina (Da-G) y genistina (Ge-G) o en sus formas libres, daidzeína (Da) y genisteína (Ge) y el equol que se deriva de ellas en cultivos fecales en MCB <sub>ISO</sub> con las heces de la mujer 1.1 y las heces de la mujer 9.3.   | 61 |
| <b>22</b> | Perfiles de DGGE de diferentes cultivos en MCB <sub>ISO</sub> con <i>Slackia</i> spp. y/o con heces de mujeres productoras de equol e identificación de algunas bandas representativas.   | 63 |
| <b>23</b> | Concentración (en ppm o µg/mL) de los principales SCFAs (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico) y la relación ácido acético/ácido propiónico determinados mediante CG en los cultivos de heces de las mujeres 1.1 y 9.3 en MCB o MCB <sub>ISO</sub> así como en los controles de dichos medios realizados antes de las fermentaciones.. | 65 |

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>Pág.</b>
I	Bacterias cultivables capaces de convertir la isoflavona daidzeína.	29
II	Composición del medio colónico bacteriano suplementado con isoflavonas (MCB <sub>ISO</sub> ) utilizado en las fermentaciones.	33
III	Programa de PCR para amplificar la región V2-V3 del ARNr16S.	42
IV	Soluciones empleadas para la formación de los geles de DGGE.	43

## 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1. INTRODUCCIÓN.

La memoria del trabajo fin de máster “Bioconversión de isoflavonas de soja por microbiota intestinal mediante incubaciones *ex vivo*”, tutelada por la Dra. Susana Delgado Palacio, desarrolla el trabajo experimental llevado a cabo en el grupo de Cultivos Lácteos Funcionales, liderado por el Dr. Baltasar Mayo Pérez, en el Instituto de Productos Lácteos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Este trabajo experimental se enmarca dentro del proyecto del Plan Nacional titulado “Metabolismo de las isoflavonas de la soja por la microbiota intestinal durante la menopausia. Identificación, caracterización y selección de probióticos para la formulación de productos lácteos funcionales de soja” (AGL2011-24300-ALI). En este apartado introductorio se mencionan los antecedentes y la situación actual del tema, y en último lugar los objetivos particulares del presente trabajo.

### 1.1 Antecedentes.

La investigación con las isoflavonas, metabolitos con actividad fitoestrogénica presentes en concentraciones fisiológicamente relevantes para el ser humano solo en la soja (*Glycine max*) y en altas concentraciones en el trébol rojo (*Trifolium pratense*), tuvo su origen en la década de 1940, cuando se detectaron en la zona Occidental de Australia problemas de fertilidad en las ovejas alimentadas a partir del pastoreo de una variedad de trébol rico en isoflavonas (Bennetts *et al.*, 1946). Por ello, no resulta de extrañar que durante esta época las isoflavonas fueran consideradas como antinutrientes. En los años 50, se estudió la posibilidad de utilizar las isoflavonas como suplementos en las dietas para el engorde animal por los efectos estrogénicos promotores del crecimiento que se les atribuyeron en estudios con roedores (Carter *et al.*, 1955). Sin embargo, en los años 90 el descubrimiento por parte de un grupo de investigadores de la Wake Forest University (Anderson *et al.*, 1995) de la afinidad de las isoflavonas por los receptores estrogénicos de tipo alfa (ER $\alpha$ ), y con posterioridad por los beta (ER $\beta$ ) (Kuiper *et al.*, 1996), permitió caracterizar a las isoflavonas como fitoestrógenos y como disruptores endocrinos, pudiendo actuar, no solo como agonistas de los estrógenos, sino también como antagonistas de las funciones de dichas hormonas sexuales. A principios de la década de los 90, el National Cancer Institute (NCI) de los Estados Unidos relacionó a estos metabolitos con la prevención o retraso de

la aparición de ciertas enfermedades. Seguidamente, las isoflavonas y la soja se correlacionaron con una disminución en algunos de los síntomas de la menopausia en Asia y Japón, tales como los sofocos (Adlercreutz *et al.*, 1992) o la descalcificación ósea (Arjmandi *et al.*, 1996). Los estudios realizados por Kenneth D. R. Setchell, un investigador pionero en el campo de las isoflavonas, permitieron analizar el aumento de la excreción de las mismas en respuesta al consumo de soja. Este autor, determinó y publicó una década después (Setchell *et al.*, 2002), que solo cerca del 25 % de la población posee las bacterias intestinales capaces de transformar las isoflavonas inactivas en metabolitos con propiedades fisiológicas saludables. Finalmente, a finales del siglo XX, se comenzó a discutir el posible uso de las isoflavonas, en forma de suplementos, como una alternativa a la terapia hormonal sustitutiva (THS) convencional (estrógenos o estrógenos más progesterona sintéticos).

## **1.2 Situación actual.**

La hipótesis propuesta inicialmente por Setchell *et al.* (2002), basada en que los individuos que poseen en su tracto gastrointestinal bacterias capacitadas para la transformación de la isoflavona inactiva daidzina en el metabolito activo equol pueden ser los mayores beneficiarios del consumo de soja, se considera una temática de gran interés en la actualidad por la comunidad científica internacional. Más concretamente, uno de los aspectos que más preocupa a la comunidad científica en este campo es el envejecimiento saludable de las mujeres que alcanzan la menopausia, ya que aproximadamente dos tercios de ellas desarrollan síntomas relacionados con el climaterio, principalmente sofocos. Los resultados de diversos estudios, entre ellos el de la *Women's Health Initiative* (WHI) publicado en 2002 (Rossouw *et al.*, 2002), en el que se describen los potenciales efectos adversos de la THS, ha llevado a las mujeres a rechazar este tipo de tratamientos y optar por los suplementos dietéticos basados en la tradicional fitoterapia, pues son muchas las plantas a las que se les atribuyen propiedades fitoestrogénicas (Geller y Studee, 2007). En el estudio de la WHI, los investigadores tuvieron que detener el tratamiento hormonal de mujeres post-menopáusicas, al encontrarse un aumento en la incidencia de cáncer de mama, accidentes cardiovasculares, enfermedad cardíaca coronaria y embolismo pulmonar, asociando estas patologías como efectos secundarios de la THS. Como consecuencia del impacto de este informe, se ha desencadenado una tendencia, tanto por parte de la comunidad científica como por las mujeres, hacia los productos que se consideran más naturales para el tratamiento de las sintomatologías de la menopausia. A pesar de esto, tampoco existen evidencias que avalen un uso

continuado, seguro y eficaz, de todo este otro grupo de sustancias, de tal manera que la comunidad científica se afana en investigar este tipo de terapias con capacidad de mejorar la sintomatología derivada del climaterio y que no generen los efectos adversos de la THS. Por las numerosas propiedades saludables que se le atribuyen en la reducción de la incidencia de ciertos tipos de cáncer, osteoporosis y otros trastornos dependientes del sistema endocrino-hormonal, así como por el desconocimiento, hasta la fecha, de cualquier efecto secundario insaludable, hoy día, las isoflavonas, se pueden considerar como los compuestos vegetales con mayor potencial para sustituir a las hormonas exógenas en el tratamiento de la sintomatología derivada del climaterio (Messina *et al.*, 2007).

Mientras que las dietas asiáticas suponen una ingesta diaria de entre 40-80 mg de isoflavonas, en las de los países europeos y americanos esta cantidad se reduce a menos de 3 mg (Messina *et al.*, 2006). Además, en humanos, los niveles séricos de isoflavonas son directamente proporcionales a las cantidades ingeridas de las mismas, ya sea como suplementos o en productos derivados de soja, siendo estos niveles de una media de unos 270 µg/L en los países orientales y de una media de unos 16 µg/L en los occidentales (Valladares *et al.*, 2012). Dicha diferencia en la ingesta de isoflavonas, y por ende, en los niveles séricos, así como otros factores culturales, podrían ser la causa de las diferencias que se observan entre ambas culturas en ciertos aspectos de la salud. En los países de la zona oriental, la incorporación de la soja a las dietas se produce de manera temprana, mientras que en los países occidentales, el consumo de soja es nulo o únicamente a través de suplementos durante el envejecimiento (Messina *et al.*, 2010). Esto podría incidir en el desarrollo y la adaptación de la microbiota intestinal a la activación de isoflavonas, que asegura una mayor efectividad de la soja en las mujeres asiáticas. En España, un 30 % de las mujeres climatéricas utiliza isoflavonas en forma de suplementos, sin embargo, muy pocas son capaces de combatir los síntomas de esta etapa de la vida con este tratamiento. Esto podría estar condicionado por la habilidad de la microbiota intestinal para adquirir progresivamente la capacidad de metabolizar las isoflavonas a compuestos con actividad biológica.

Las isoflavonas presentes en las semillas de leguminosas como la soja, y en sus derivados, son la genistina, la daidzina y la glicitina, conjugados glicosilados respectivamente de la genisteína, daidzeína y gliciteína, que son los metabolitos derivados a los que se les han atribuido diversas propiedades saludables para el ser humano. Las isoflavonas glicosiladas no se absorben bien en el tracto gastrointestinal, sino que necesitan ser desconjugadas a sus formas agliconas

fundamentalmente por la acción de las enzimas  $\beta$ -glucosidasas que poseen algunas bacterias aisladas a partir del tracto gastrointestinal humano (Atkinson *et al.*, 2004). Si además, en el caso de la daidzeína, continúa su conversión hacia el metabolito equol, la bioactividad esperada es mayor, pues se considera que es el metabolito derivado de las isoflavonas más potente (Setchell y Clereci, 2010). El problema reside en que sólo un 30-50 % de los individuos poseen en su intestino las bacterias con las rutas de biodegradación que conducen a la aparición de equol (Atkinson *et al.*, 2004; Rowland *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la deglicosilación de las isoflavonas puede ser realizada por varias poblaciones bacterianas intestinales humanas entre las que están bacterias del ácido láctico (BAL) y bifidobacterias (Tsangalis *et al.*, 2002; Champagne *et al.*, 2010; Rekha: Vijayalakshmi, 2010 y Setchell *et al.*, 2002). Sin embargo, la producción de equol solo se ha podido observar en un grupo reducido de bacterias (Decroos *et al.*, 2006; Maruo *et al.*, 2008; Yokoyama y Suzuki, 2008; Yu *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2010; Tsuji *et al.*, 2010). Se baraja la posibilidad de que los beneficios de las isoflavonas se puedan extrapolar de manera generalizada en todos los individuos si, además de la ingesta de isoflavonas, se dispone de una microbiota intestinal con las rutas de conversión de las mismas y más concretamente de las que conducen a la formación de equol. En base a esto, en la actualidad se está investigando la posibilidad de usar estas bacterias como probióticos en combinación con las isoflavonas de soja en alimentos funcionales.

### **1.3 Objetivos.**

La hipótesis de la que parte el presente trabajo considera la posibilidad de que las heces de mujeres climatéricas que han sido tratadas con altas dosis de isoflavonas durante largos periodos de tiempo pueden estar enriquecidas en microorganismos capaces de convertir y activar las isoflavonas.

Aunque se conocen ciertos microorganismos que son capaces de transformar isoflavonas en cultivo puro *in vitro* y se sabe que hay individuos que excretan por distintas vías equol, todavía no se ha ensayado un modelo que reproduzca el ambiente intestinal donde se producen las transformaciones microbianas de las isoflavonas de soja ingeridas en la dieta.

Hasta la fecha, el equipo de investigadores del grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA ha conseguido identificar un grupo reducido de mujeres capaces de excretar equol en orina tras la ingesta de isoflavonas de soja por medio de un suplemento alimenticio comercial.

El objetivo principal de este trabajo se centró en ahondar en el conocimiento sobre qué microorganismos juegan un papel clave en la transformación, metabolismo y biodisponibilidad de las isoflavonas y cual es dicho papel, a través de la reproducción del ambiente colónico en el que tienen lugar estos procesos. Para ello se llevaron a cabo incubaciones *ex vivo* de heces de las mujeres del estudio en combinación con isoflavonas de soja en sus formas comerciales, analizando la evolución de las comunidades microbianas y las biotransformaciones de las isoflavonas hacia metabolitos con mayor potencial fitoestrogénico, como el equol.

## **2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS**

---

## **2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.**

En este apartado se exponen una serie de consideraciones que conciernen al ámbito de las isoflavonas de soja. En primer lugar se hace una descripción de la soja y su composición en isoflavonas, mencionando a estos compuestos desde un doble punto de vista debido a que, por su naturaleza, pueden englobarse dentro de los polifenoles, y, por su actividad, dentro de otro gran grupo de moléculas, los fitoestrógenos. A continuación, se mencionan las propiedades beneficiosas de las isoflavonas de la soja, destacando el papel de las mismas en la mejora de los síntomas de la menopausia y el climaterio en la mujer. En el último apartado de este punto de consideraciones teóricas se hace referencia al papel de la microbiota intestinal en la activación de las formas glicosiladas de las isoflavonas presentes en la semilla de las leguminosas hacia las formas agliconas y el resto de metabolitos derivados, como el equol, con actividades fisiológicas relevantes.

### **2.1 Los polifenoles de la dieta.**

Los polifenoles forman el grupo de compuestos fitoquímicos más numeroso y de mayor distribución entre los vegetales, por lo que muchos forman parte de la dieta humana. Las plantas producen millones de polifenoles, esenciales para su fisiología, que están involucrados en diversas funciones como la lignificación (rigidez de la pared celular que ayuda a resistir el ataque de patógenos y depredadores), la pigmentación, la polinización y el crecimiento. Sin embargo, el papel de los polifenoles en el ser humano es clave en la prevención de las enfermedades neurodegenerativas, en ciertos tipos de cáncer o en las enfermedades cardiovasculares, pues son antioxidantes potentes que complementan la acción de las vitaminas y enzimas antioxidantes a la hora de desencadenar una respuesta en defensa al estrés oxidativo generado por la presencia en exceso de radicales libres en el organismo (Tsao, 2010).

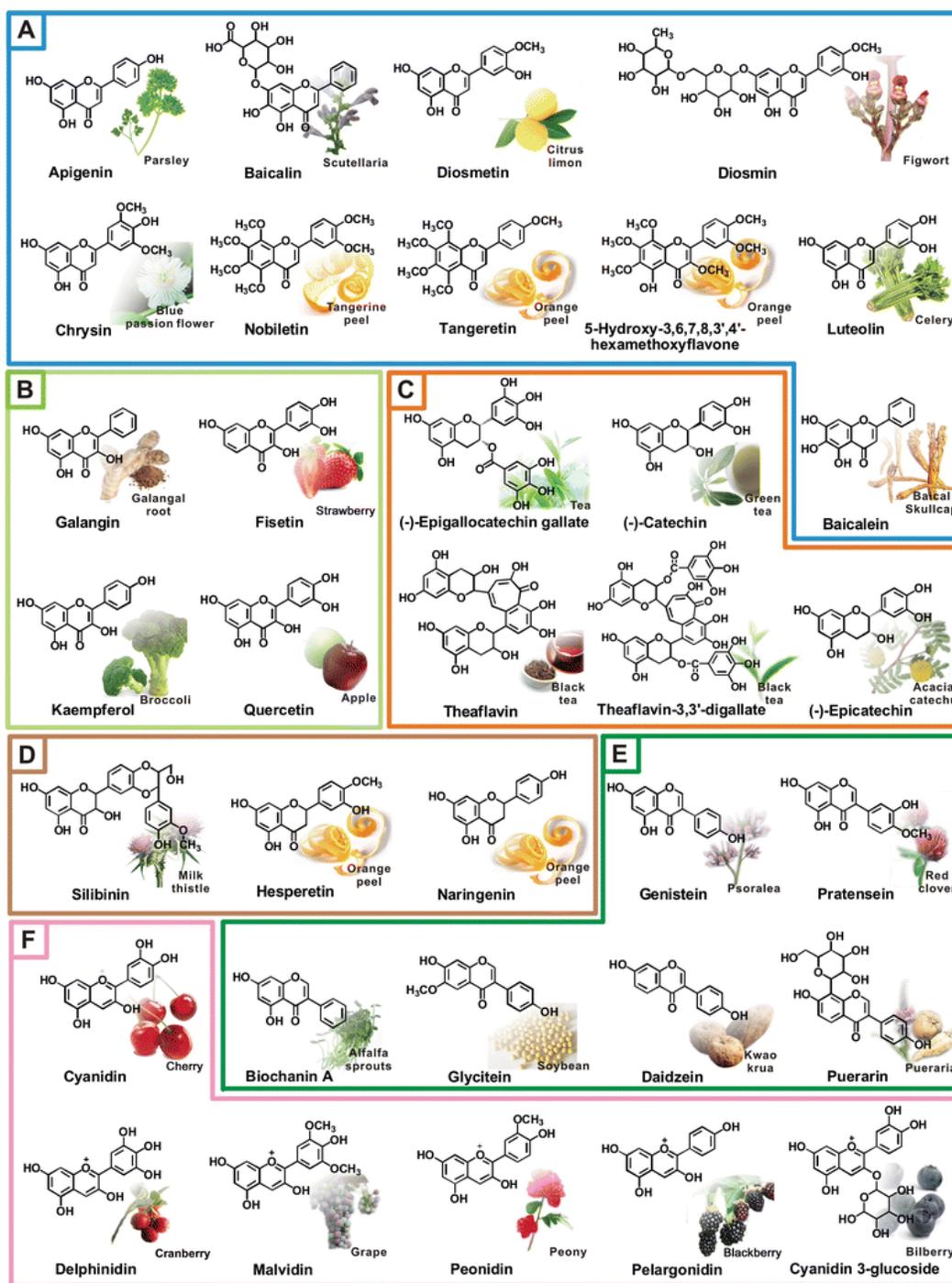
Químicamente, los polifenoles forman un grupo de sustancias de origen natural que en su composición contienen estructuras fenólicas (bencenos con al menos un radical hidroxilo) en repetición. Así mismo, la mayoría de los polifenoles en las plantas se encuentran como glucósidos con diferentes unidades de azúcares y grupos acilados en diferentes posiciones del esqueleto fenólico central. Frutas, verduras, granos enteros y otros tipos de alimentos y bebidas tales como

el té, el chocolate, el vino y los productos derivados de la soja, son fuentes ricas en polifenoles. La diversidad y la amplia distribución de los polifenoles dentro de las plantas ha dado lugar a diferentes formas de clasificar estos compuestos, principalmente en función de su origen, su función biológica y su estructura química, a pesar de que muchas veces existen grandes diferencias entre los compuestos de cada agrupación en cuanto a estabilidad, biodisponibilidad y funciones fisiológicas. En cuanto a su estructura química, los polifenoles pueden clasificarse en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (D'Archivio *et al.*, 2007). Dentro de la gran diversidad que engloba el término de los polifenoles, se conocen más de 4000 flavonoides.

Los flavonoides son moléculas que poseen en común un anillo pirano y uno o varios anillos bencénicos con algunos grupos hidroxilo sustituyendo ciertas posiciones de los mismos. Los flavonoides, a pesar de sus similitudes estructurales, biosintéticas y funcionales, se han ido distribuyendo en diferentes grupos, entre los cuales se engloban, entre otros, las isoflavonas o isoflavonoides, las flavonas, los flavonoles, las flavononas y las antocianidinas (**Figura 1**).

Las isoflavonas son los compuestos más destacados dentro del grupo de los flavonoides y no pueden ser sintetizadas, aunque sí metabolizadas, por el organismo humano, por lo que son considerados fitoquímicos de origen exógeno. Sin embargo, su incorporación en la dieta puede ser clave para el funcionamiento fisiológico del organismo al actuar como productos naturales con acciones terapéuticas, siendo responsables de un conjunto de efectos saludables cuando se ingieren en la dieta de forma habitual.

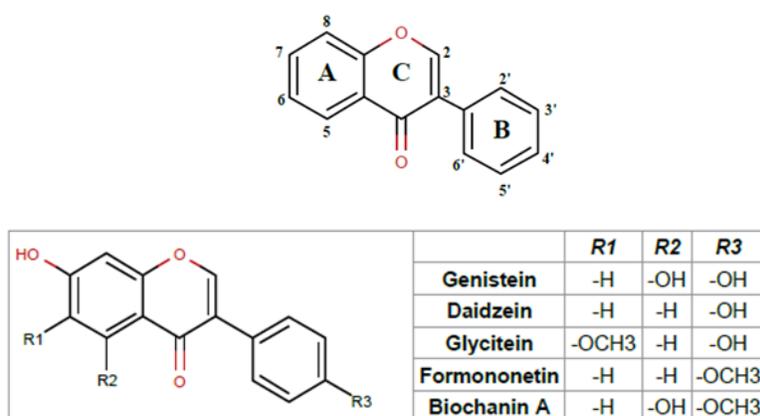
Tomada de Pan *et al.* (2010).



**Figura 1.** Principales representantes de los subgrupos de flavonoides naturales y sus fuentes alimentarias. A) Flavonas. B) y C) Flavonoles. D) Flavononas. E) Isoflavonas. F) Antocianidinas.

Estructuralmente, las isoflavonas son compuestos difenólicos cuyo esqueleto central, común a todas los polifenoles, está constituido por tres anillos de tipo bencénico (A, B y C). Las sustituciones en distintas posiciones con diferentes radicales son las que dan lugar a los distintos tipos de isoflavonas. Así, en el caso de las isoflavonas de la soja, la diferencia entre los principales tipos, la genisteína, la daidzeína y la gliciteína, radica en los sustituyentes que se encuentran en las posiciones 6 (radical 1, R1) y 5 (radical 2, R2) del anillo A y en la posición 4' del anillo B (radical 3, R3) (**Figura 2**).

Tomada de Chandrasekharan y Aglin, (2013).

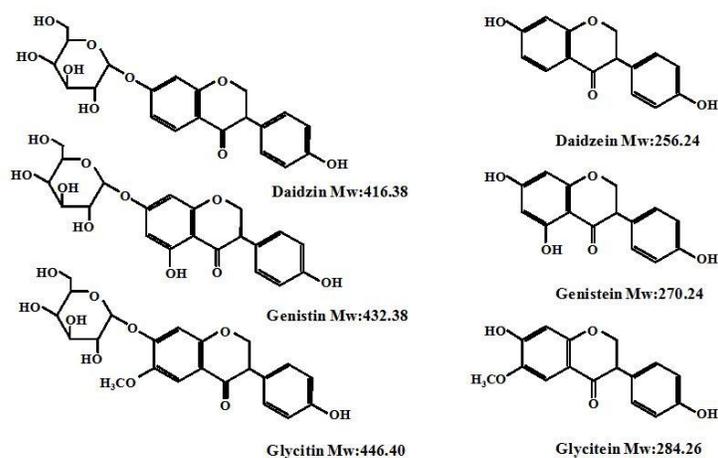


**Figura 2.** Estructura del esqueleto central de las isoflavonas y sustituyentes, posiciones de sustitución que dan lugar a isoflavonas en sus formas agliconas, entre ellas las de la soja (genisteína, daidzeína y gliciteína).

Las formas conjugadas de las isoflavonas son la forma más características en la que se encuentran las mismas en los vegetales. La conjugación más típica de las isoflavonas consiste en una  $\beta$ -glucosilación a partir del grupo hidroxilo de la posición 7 del anillo A, constituyendo los precursores glucosilados de las formas agliconas activas de las isoflavonas (**Figura 3**). Además también es muy frecuente que las isoflavonas se encuentren en las semillas de las leguminosas en forma de acetil, malonil o succinil glucósidos. Así, las formas agliconas daidzeína (4',7-dihidroxisoiflavona), genisteína (4',5,7-trihidroxisoiflavona) y gliciteína (4',7-dihidroxi-6-etoxisoiflavona) se pueden conjugar dando lugar a los glucósidos daidzina (daidezína 7-glucósido), genistina (genisteína 7-glucósido) y glicitina (gliciteína 7-glucósido) y a los correspondientes acetilglucósidos, malonilglucósidos y succinilglucósidos, los 6''-O-acetil-7-O- $\beta$ -D-glucósidos (acetil daidzina, acetil genistina y acetil glicitina), los 6''-O-malonil-7-O- $\beta$ -D-glucósidos

(malonil daidzina, malonil genistina y malonil glicitina) y los 6''-O-succinil-7-O-β-D-glucósidos (succinil daidzina, succinil genistina y succinil glicitina) (Peñalvo *et al.*, 2004). Se ha podido demostrar (Barnes *et al.*, 2011) que las formas agliconas de las isoflavonas se absorben más rápidamente y en mayor cantidad a través de los enterocitos del intestino que sus respectivas formas conjugadas, como consecuencia de que las formas conjugadas poseen mayores pesos moleculares y mayor hidrofobicidad (Izumi *et al.*, 2000).

Tomada de Masakazu y Masanao (2013).



**Figura 3.** Estructura química de las tres isoflavonas mayoritarias en la soja en sus formas glicosiladas (daidzina, genistina y glicitina) y en sus formas agliconas (daidzeína, genisteína y gliciteína) y sus respectivos pesos moleculares.

## 2.2 Soja e isoflavonas.

La soja, o *Glycine max*, al igual que el resto de leguminosas, tiene un alto interés nutritivo, ya que es un alimento rico en proteína. Sin embargo, el interés reciente en los países occidentales por la soja no viene determinado por su función en la alimentación, sino por el papel en la salud que se les atribuye a ciertos metabolitos, como las isoflavonas, que forman parte, aunque minoritaria, de la composición de estas leguminosas. Es durante el siglo XX cuando la población occidental en general, incluida la comunidad científica, comienza a ser consciente de los posibles beneficios que pudieran adquirirse al consumir un producto, que ya es considerado de tradición milenaria en los países orientales. Esto puede estar condicionado tanto por los numerosos estudios epidemiológicos que indican una menor prevalencia de ciertas enfermedades en las

zonas asiáticas, como por el incremento en el número de evidencias que destacan sus propiedades saludables.

Conforme a lo publicado por Pastor y Perote (2007), la semilla de la soja está constituida por un porcentaje elevado de proteínas de hasta el 35 %, un 20 % de triglicéridos de ácidos grasos poliinsaturados, un 10 % de agua, un 5 % de minerales (destacando el fósforo y potasio), un 3 % de fosfolípidos como la lecitina, pequeñas cantidades de esteroides como el estigmasterol y sitosterol y vitaminas sobre todo del grupo B (ácido pantoténico, niacina y tiamina), tocoferoles (vitamina E) y carotenoides (vitamina A). El resto de la composición de la semilla de soja lo forman un numeroso y variado grupo de compuestos, entre los que se encuentran los derivados polifenólicos en forma de flavonoides (principalmente isoflavonas) y antocianos, que aunque estén presentes en menor concentración, el papel que desempeñan para el ser humano es clave tanto en su alimentación como en su salud. La cantidad de isoflavonas en la soja, así como del resto de componentes, puede variar en función de las características del suelo en el que se cultiva, el clima, la madurez de la planta en el momento de la recolección de la semilla o el nivel de procesamiento de los productos que de ella se derivan.

Los principales productos que se obtienen a partir de la soja, tales como el tempeh, el tofu, la harina de soja, la bebida de soja o el miso, mantienen en su composición las isoflavonas, aunque su concentración puede verse reducida por los distintos tratamientos a los que se somete la semilla para elaborarlos. Así, por ejemplo, en la semilla seca la cantidad de isoflavonas ronda los 300 mg por cada 100 g de soja, sin embargo, este contenido se reduce a los 150-200 mg por cada 100 g de harina de soja. Por lo tanto, aunque en los productos derivados de la soja la cantidad de isoflavonas se reduce desde un 6 a un 20 % del total de la cantidad de isoflavonas, en los productos de soja no procesados, siguen encontrándose estos compuestos en concentraciones relevantes.

### *2.2.1 Las isoflavonas de soja como fitoestrógenos.*

Los fitoestrógenos, o estrógenos de origen vegetal, forman un grupo heterogéneo de sustancias herbáceas con estructura similar al 17- $\beta$ -estradiol, que también son denominados estrógenos no esteroideos, puesto que aunque se parecen estructuralmente a esta hormona, son compuestos difenólicos con distinto origen. El grupo de los fitoestrógenos incluye más de 100 moléculas que se clasifican según su estructura en isoflavonas (genisteína, daidzeína, biochanina A

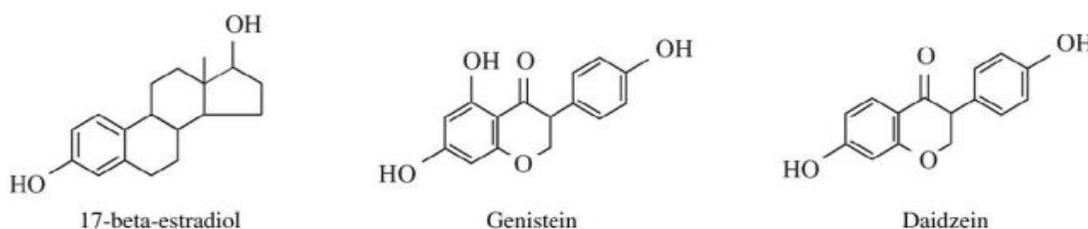
y formonnetina), lignanos (matairesinol y secoisolariciresinol-diglucósido), coumestanos (coumestrol y 4-metoxicoumestrol) y estilbenos (resveratrol) (Pilsakova *et al.*, 2010). El 17- $\beta$  estradiol es una hormona de origen animal perteneciente al grupo de las hormonas sexuales esteroideas femeninas, que se produce en el ovario y que se encarga, por un lado, de regular el desarrollo, el mantenimiento y el funcionamiento de los órganos reproductores femeninos, los ciclos de actividad sexual y los caracteres sexuales secundarios femeninos, y por otro, de la regulación del metabolismo de proteínas, lípidos y minerales, del crecimiento óseo y del mantenimiento de la masa ósea tras la menopausia, regulando su formación y resorción (Pastor y Perote, 2007).

La principal acción de las isoflavonas en el organismo, además de antioxidante, antiinflamatoria, antitrombótica o anticancerígena, es fitoestrógena, lo cual quiere decir que son capaces de ejercer efectos similares a los de los estrógenos de origen animal aunque con menor intensidad. Esta acción fitoestrogénica se basa en la interacción con los receptores estrogénicos (ERs) de las hormonas esteroideas endógenas, pero, a mayores, las isoflavonas también son capaces de ejercer acciones en el organismo al interactuar con el metabolismo de las hormonas esteroideas endógenas (Pilsakova *et al.*, 2010). A continuación se comentan brevemente ambos mecanismos de acción.

La primera vía de actuación de las isoflavonas en el organismo se explica por la semejanza estructural que mantienen con el 17- $\beta$ -estradiol (**Figura 4**) lo que hace que puedan interactuar con los receptores que en un principio están preparados para unirse a los estrógenos animales. Los ERs se encuentran en dos formas en el organismo, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , y cada uno de ellos se expresa en diferentes tejidos. Los ERs pertenecen a la superfamilia de los receptores intracelulares de tipo esteroideo/tiroideo localizados tanto en la membrana del núcleo como en el interior de las células en las que se expresan. La interacción de los estrógenos con los ERs desencadena una cascada de señalización que concierne a elementos de respuesta a estrógenos localizados en el citoplasma celular o asociados a la membrana y que termina por afectar al proceso de transcripción. La cascada intracelular de señalización afecta a la actividad de las proteínas-G, de la enzima adenilato ciclasa, de las fosfolipasas y de las proteínas quinasas, lo cual repercute en el metabolismo celular, en la concentración intracelular de iones o en la producción de óxido nítrico, entre otros (Pilsakova *et al.*, 2010). La afinidad de la genisteína por el ER $\beta$  es del orden de 20 a 30 veces superior que por los ER $\alpha$  y es comparable a la afinidad que posee el 17- $\beta$ -estradiol por dichos

receptores (Kuiper *et al.*, 1996). Sin embargo la afinidad del resto de isoflavonas por los ERs es del orden de 100 a 500 veces inferior que la de la genisteína y la del 17- $\beta$ -estradiol. Las diferencias de afinidad por los diferentes subtipos de receptores ERs explican que en los tejidos donde se expresan los receptores ER $\alpha$  (tejido mamario y endometrio) los efectos de las isoflavonas sean menores o inapreciables con respecto a los que se inducen en los tejidos donde predominan células expresando los ER $\beta$  (hueso, pared vascular, tracto urogenital y sistema nervioso central).

Tomada de Pilsakova *et al.* (2010).



**Figura 4.** Analogía en la estructura molecular entre el 17- $\beta$ -estradiol y las isoflavonas genisteína y daidzeína de la soja.

Las isoflavonas actúan como antagonistas o agonistas de los ERs, es decir, tienen una acción estrogénica o no estrogénica en función del número de receptores que se estén expresando y que estén disponibles para unirse al sustrato, lo cual depende de la concentración de isoflavonas en relación con la de hormonas endógenas. Una vez que las isoflavonas se unen al receptor, el complejo que se forma y las rutas de señalización intracelular desencadenada son similares a la que se induce en presencia de 17- $\beta$ -estradiol, aunque de menor magnitud. Esto es así porque las isoflavonas compiten con las hormonas circulantes por la unión a los ERs. Cuando los niveles endógenos de hormonas se encuentran elevados (por ejemplo durante la fase folicular del ciclo menstrual de la mujer), las isoflavonas son incapaces de unirse a los ERs. En cambio, cuando los niveles endógenos de 17- $\beta$ -estradiol se encuentran bajos (por ejemplo durante la menopausia o después de una ovariectomía), la acción de las isoflavonas comienza a hacerse patente. En este contexto, las isoflavonas están siendo utilizadas como un sustitutivo de la THS convencional basada en la ingesta de hormonas sintéticas exógenas con efectos adversos para el tratamiento a largo plazo de los síntomas asociados con el climaterio. A diferencia de la THS, fitoquímicos como las isoflavonas de soja poseen una amplia gama de efectos beneficiosos, manteniendo un efecto similar, aunque con menor intensidad, al del estradiol sobre el funcionamiento de la mama, los

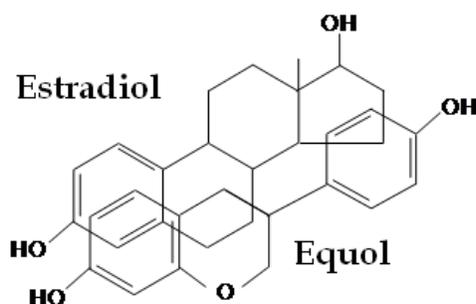
ovarios, el endometrio, el tejido vascular y el tejido óseo y sin conducir a las consecuencias indeseables de las terapias convencionales. A pesar de esto, el American *College of Obstetricians and Gynecologist (ACOG)* establece que la soja y sus isoflavonas pueden ser útiles para el tratamiento de los síntomas vasomotores de la menopausia, pero solo a corto plazo, en un tiempo inferior a los dos años. Dado que estos metabolitos pueden interactuar con los estrógenos, se considera que no deberían ser considerados como compuestos libres de peligro, sobre todo el relacionado con el desarrollo de cánceres dependientes del nivel estrogénico.

La segunda vía de actuación de las isoflavonas, consiste en la interacción con el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas de múltiples formas y en función de numerosos factores como la especie, el sexo, la edad o el estado hormonal del individuo. Las isoflavonas pueden inhibir la actividad de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (que cataliza la conversión de la testosterona en 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona), activar cuando se encuentran en alta concentración a la aromatasa P450 (que cataliza la conversión de testosterona a estradiol) o inhibirla cuando se encuentran en baja concentración (Almstrup *et al.*, 2002). Así mismo, se ha encontrado (Adlercreutz *et al.*, 1987) que las isoflavonas pueden unirse a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) y estimular su síntesis, afectando a la concentración de hormonas esteroideas circulantes.

### 2.2.2 El equol.

El equol se considera, por su semejanza estructural con el 17- $\beta$ -estradiol, el metabolito derivado de la bioconversión de isoflavonas por la microbiota intestinal con mayor potencial fitoestrogénico (**Figura 5**). Las actividades fisiológicas desencadenadas por el equol son aún mayores que las que generan las formas agliconas de las isoflavonas. El equol se aisló por primera vez de la orina de caballos en 1932, de ahí el nombre que se le dio, y no fue descubierto en la orina de humanos hasta más de 50 años después (Setchell y Clerici, 2010<sup>a</sup>). Este compuesto se puede determinar principalmente en la orina de algunos humanos, pero no de todos, lo que lleva a dividir a los individuos en productores y no productores de equol, de tal manera que se considera que los individuos productores son los que más pueden beneficiarse de las propiedades beneficiosas que se le atribuyen a la soja por su contenido en isoflavonas. A través de numerosos estudios se ha podido establecer que solo entre el 25-30 % de la población adulta de los países occidentales produce equol cuando ingiere como parte de su dieta isoflavonas de soja (Atkinson *et al.*, 2004;

Rowland *et al.*, 2000), mientras que este porcentaje se eleva al 50-60 % en la población de Japón, Korea o China. Las razones de estas diferencias todavía no están esclarecidas, pero sería importante establecer las posibles causas para poder probar si es cierta la hipótesis de que la capacidad para producir equol está condicionada por la adaptación progresiva de la microbiota intestinal a la degradación de las isoflavonas hasta la producción de este metabolito con alta acción fisiológica.



**Figura 5.** Similitud estructural entre el equol derivado de las isoflavonas y el estradiol.

El equol, una vez producido por los microorganismos del colon, se absorbe rápidamente y aparece en plasma conjugado mayoritariamente con ácido glucurónico a las 2-3 h de la ingesta de las isoflavonas, siendo la orina la principal vía de excreción de este metabolito. El hecho de que el equol en humanos y animales provenga de las actividades catalíticas de las bacterias intestinales se ha podido demostrar a través de varias premisas. Por un lado, se ha comprobado que animales libres de gérmenes alimentados con una dieta a base de soja son incapaces de excretar equol en orina (Axelson y Setchell, 1984). Además, el equol no se encuentra en la orina o en el plasma de recién nacidos que carecen aún de una microbiota desarrollada (Rotimi y Duerden, 1981). También se ha podido correlacionar el uso de algunos antibióticos con la disminución en la producción de equol (Blair *et al.*, 2003; Atkinson *et al.*, 2004; Halm *et al.*, 2008). Por último, se sabe que la incubación de diversos microorganismos *in vitro* en combinación con soja o isoflavonas de soja conduce a la aparición de equol (Setchell *et al.*, 1984; Setchell *et al.*, 2005).

La presencia de un centro quiral, un carbono asimétrico, en la molécula del equol hace posible que existan dos formas enantioméricas de la misma, el S-(-)equol y el R-(+)equol, de tal forma que las bacterias intestinales son enantioespecíficas sintetizando solo el S-(-)equol (Setchell

*et al.*, 2005). Ambos enantiómeros son de interés desde el punto de vista clínico y farmacológico, sobre todo por su acción estrogénica, lo que hace que estén siendo investigados para tratar ciertos trastornos relacionados con el nivel de estrógenos, como los desordenes hormonales generados durante la menopausia (Setchell y Clerici, 2010<sup>b</sup>). La unión del equol con los ERs es más fuerte que la que tienen las formas agliconas de las isoflavonas, lo cual permite desencadenar una cascada más potente que la inducida por las isoflavonas y más similar a la que originan las hormonas endógenas.

### **2.3 Propiedades beneficiosas de las isoflavonas de la soja en la mejora de los síntomas asociados con la menopausia.**

La Asociación Española para el Estudio de la Menopausia (AEEM) y la *International Menopause Society* (IMS) definen la menopausia como el momento de la vida de la mujer en el que se produce el cese de la menstruación y se inicia el climaterio o periodo de envejecimiento reproductivo en el que concluye el periodo fértil femenino. Por lo tanto, el climaterio, que inicia en el entorno de la menopausia o última menstruación, supone la pérdida progresiva de la función folicular ovárica disminuyendo la producción de hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona). A pesar de que no se considera una enfermedad, en esta etapa de transición de la vida de una mujer y como consecuencia de la alteración de los niveles hormonales endógenos se pueden producir ciertas repercusiones en su bienestar. Entre los síntomas de la menopausia más habituales se encuentran los vasomotores, principalmente sofocos, palpitaciones, sudoraciones y vértigos, pero también se pueden producir alteraciones psicológicas, cutáneas, cardiovasculares y óseas (Al-Safi y Santoro, 2014).

Hasta mitad del siglo XX, no se empezó a estudiar cómo tratar la sintomatología derivada de esta etapa de envejecimiento de la mujer. Esto coincidió con el aumento de la esperanza de vida media del ser humano, de tal manera que actualmente el climaterio puede abarcar un tercio de la vida total de la mujer, y con el descubrimiento de la síntesis de sustancias de acción estrogénica como el dietilestilbestrol, los estrógenos conjugados equinos o el valerianato de estradiol (Pastor y Perote, 2007). Así pues, el primer tratamiento propuesto para aliviar la sintomatología derivada del climaterio se basaba en la posibilidad de suplir el déficit endógeno de estrógenos con análogos sintéticos a dichas hormonas sexuales (estrógenos y/o gestágenos), en lo que se conoce como la Terapia Hormonal Sustitutiva (THS). Durante los años posteriores al

descubrimiento de la aplicación práctica de este tipo de compuestos sintéticos, fueron muchas las mujeres de todo el mundo (se calcula que entre el 20 y el 40 % de la mujeres occidentales) las que se animaron a incorporarlos en su estilo de vida para tratar de paliar las sintomatologías derivadas de la menopausia. Numerosos estudios basados en ensayos clínicos, entre ellos los de la HERS (*The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*) publicados en el año 1998 (Grady *et al.*, 1998) y en el año 2002 (Grady *et al.*, 2002) y sobre todo el de la WHI publicado en el año 2002 (Rossouw *et al.*, 2002), empezaron a cuestionar la opinión generalizada existente hasta el momento de que la THS era un tratamiento seguro. En los estudios llevados a cabo por estos investigadores se encontró un aumento de la incidencia de cáncer de mama, accidentes cardiovasculares, enfermedad cardíaca coronaria y embolismo pulmonar en las mujeres tratadas con este tipo de terapia, asociando estas patologías como efectos secundarios de la THS. Estos estudios motivaron una respuesta por parte de las Autoridades Sanitarias Europeas que ponía en duda el balance positivo del beneficio/riesgo de la THS. Por ello, la visión que se tiene en la actualidad sobre la THS ha hecho que cada vez sean más las mujeres que rechacen el uso de este tipo de tratamiento, que se venían utilizando incluso en pacientes asintomáticas.

El recelo hacia este tipo de tratamientos farmacológicos ha hecho que cada vez sean más las mujeres que busquen una alternativa a la THS para aliviar los síntomas menopáusicos, como los alimentos funcionales, los suplementos dietéticos o la tradicional fitoterapia (Beer, 2014). Una terapia ideal para reducir las consecuencias adversas de la menopausia debería tener en cuenta una serie de aspectos; por un lado debería ser eficaz a la hora de eliminar los efectos vasomotores, principalmente los sofocos, además no debería generar efectos secundarios, y, por último, debería ser bien aceptada por el colectivo médico en cuanto a su manejo, seguridad y tolerancia así como por la mujer a la que va a ir destinada (Pastor y Perote, 2007). El tratamiento ideal no existe, pero las isoflavonas de soja tienen muchas ventajas que las hacen ser consideradas como un tratamiento sencillo, eficaz y sin efectos o contraindicaciones conocidas, de tal manera que puede ejercer un papel clave en el mantenimiento de la salud de la mujer para paliar el déficit estrogénico durante la menopausia.

A pesar de que la soja tiene efectos beneficiosos para la salud de la mujer sobre el aparato genitourinario, sobre el hueso, sobre el sistema cardiovascular, sobre el perfil lipídico, sobre la función endotelial, sobre la función cognitiva y sobre la obesidad y la diabetes, en este apartado se van a referenciar solo los efectos directamente relacionados sobre los síntomas del

síndrome climatérico, principalmente los sofocos, descritos en la revisión llevada a cabo por Pastor y Perote (2007). En Europa entre un 70-80 % de las mujeres desarrollan sofocos como consecuencia de la llegada de la menopausia. En Malasia este porcentaje se reduce al 50 % y en China y Singapur el porcentaje ronda el 10 %. La incidencia de sofocos se ha relacionado con distintos aspectos culturales y geográficos, de tal manera que parece existir una correlación inversamente proporcional entre la dosis de isoflavonas que se ingieren desde edades tempranas y las tasas de sofocos. Son muchos los estudios clínicos que se han realizado tratando de vincular el consumo de isoflavonas con un descenso en los sofocos derivados de la llegada de la menopausia, y aunque en algunos de ellos no se ha encontrado un efecto superior de las isoflavonas frente al placebo (Kronenberg *et al.*, 2013), predominan los trabajos en los que se demuestran efectos positivos de los fitoestrógenos en la sintomatología del climaterio. Para explicar los efectos beneficiosos de las isoflavonas a la hora de disminuir los sofocos del síndrome climatérico se ha propuesto la teoría de que estos compuestos fitoestrogénicos son capaces de unirse a los receptores ER $\beta$  que se localizan en la superficie de las células que controlan el centro termorregulador del hipotálamo (Pastor y Perote, 2007).

#### **2.4 Metabolismo de las isoflavonas de soja en el organismo.**

Cuando las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal reúnen en conjunto las actividades enzimáticas apropiadas, se produce la activación biológica de estos compuestos. Para que esto ocurra es necesario, en primer lugar, que a nivel intestinal exista la combinación adecuada de bacterias que posean las rutas completas de transformación de isoflavonas, en segundo lugar, que estas bacterias se encuentren en concentración suficiente para producir estos compuestos en cantidades relevantes, en tercer lugar, que las bacterias tengan incorporado en su genoma de manera estable las actividades biocatalíticas, y, por último, que se den las señales adecuadas para que se induzca la expresión de los genes que codifican para dichas actividades. Todo esto se encuentra todavía en fase de investigación y, aunque el papel de la microbiota intestinal en la biodisponibilidad de las isoflavonas de la dieta parece clave, aún se tiene muy poco conocimiento de todas las transformaciones que tienen lugar, su regulación y los microorganismos que las llevan a cabo. Lo que sí se sabe es que existe una gran variabilidad individual en cuanto a la respuesta fisiológica al consumo y tratamiento de isoflavonas en mujeres menopáusicas occidentales. Estas diferencias bien podrían deberse a la presencia de comunidades microbianas intestinales diferentes entre individuos. Las mujeres asiáticas, grandes consumidoras de

isoflavonas de soja, ya desde edades tempranas, se ha visto que presentan una menopausia más tardía y una menor sintomatología derivada de la misma. Es posible que en estas poblaciones orientales la incorporación habitual a la dieta de isoflavonas favorezca el establecimiento y desarrollo de una microbiota adaptada a la bioconversión de estos compuestos.

Con esta base, y teniendo en cuenta que en la zona occidental las mujeres no consumen soja de manera habitual, y si la consumen es solo una vez que empiezan a aparecer los efectos de la menopausia, la incorporación en la dieta de las isoflavonas transformadas o una combinación de isoflavonas y microorganismos que las transforman podría extender el beneficio a todas las mujeres. En la actualidad, todavía se necesitan más investigaciones, como de la que forma parte este trabajo, para averiguar la evolución de las poblaciones intestinales de la mujer durante las dietas suplementadas con isoflavonas.

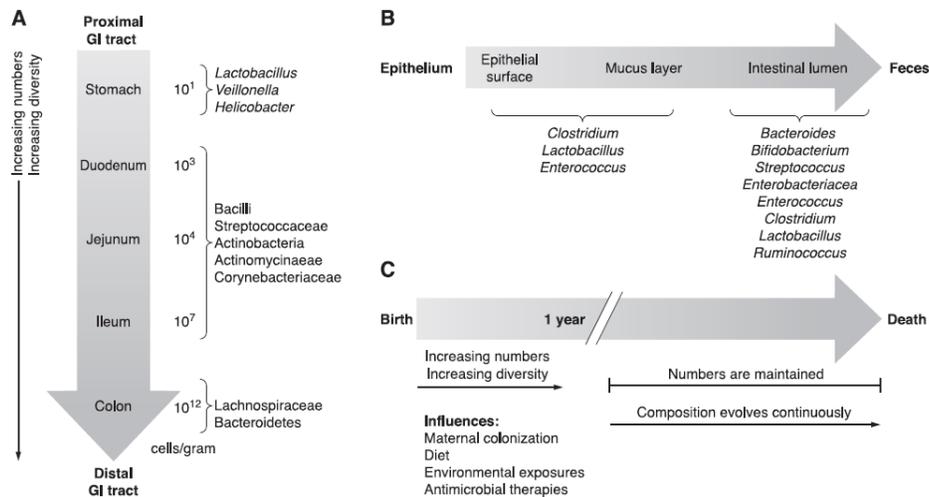
A continuación se hace referencia a la microbiota intestinal humana y cómo su evolución puede modificarse al verse condicionada por diversos factores, entre los cuales se encuentra la dieta. Así mismo, se detalla la biodisponibilidad, el transporte y las rutas de transformación de las isoflavonas en el organismo. Por último se relacionan los microorganismos que han sido aislados e identificados hasta la fecha con un papel activo en la transformación intestinal de isoflavonas.

#### 2.4.1 La microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) humano.

La microbiota del TGI humano, o microbiota autóctona, se puede reagrupar dentro de 1000 especies, de las cuales unas 40 constituyen más del 99% del total de los microorganismos y, aunque también hay arqueas y virus, pertenecen mayoritariamente a los procariotas. A nivel de filo, la microbiota intestinal está dominada por más de un 80 % de *Firmicutes* y *Bacteroides*, si bien también se pueden encontrar representantes de los filos *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia* (Qin *et al.*, 2010). Estos microorganismos se desarrollan junto con el ser humano, de tal manera que van modificando sus asociaciones y su expresión génica en función de los cambios que se producen en el microambiente que los rodea (Ley *et al.*, 2008). Algunas de las variaciones espaciales y temporales de estas bacterias del TGI se reflejan en la **Figura 6**. Según Sekirov *et al.* (2010), la cantidad de microorganismos va aumentando en diversidad y número a medida que se avanza en el TGI. Así, la cantidad de microorganismos aumenta desde  $10^1$  ufc/g en la parte proximal del TGI (estómago) hasta  $10^{12}$  ufc/g en la parte más

distal (colon). El bajo pH del estómago y las elevadas concentraciones de sales biliares en la zona proximal del intestino delgado parecen ser factores claves en el establecimiento de este gradiente longitudinal. Así mismo, la composición microbiana también se va modificando en función de la proximidad al epitelio de las células intestinales, existiendo diferencias entre los microorganismos de la superficie celular y la barrera mucosa con respecto a los del lumen. Los microorganismos que residen en las proximidades del epitelio intestinal tienden a ser más tolerantes al oxígeno que los del lumen por la cercanía a la red de capilares intestinales que rodean los enterocitos.

Tomada de Sekirov *et al.* (2010).



**Figura 6.** Aspectos espaciales y temporales de la composición de la microbiota del TGI. **A.:** Variaciones en el número y la composición de la microbiota a lo largo del TGI. **B.:** Variaciones en la composición de microorganismos a lo largo del TGI. **C.:** Factores que influyen la microbiota intestinal y su mantenimiento en el tiempo.

La microbiota intestinal de un adulto sano es relativamente estable, aunque debe considerarse dinámica por las diferentes interacciones con factores endógenos del propio hospedador y factores exógenos como la dieta (Walsh *et al.*, 2014). Durante los primeros meses de vida se producen las etapas críticas para el desarrollo de la microbiota futura, de tal manera que los microorganismos semilla que servirán para la implantación del resto comienzan a colonizar el TGI desde el nacimiento hasta los dos primeros años de vida (Palmer *et al.*, 2007). Tras el nacimiento, el intestino humano se coloniza con microorganismos del ambiente aerobios o anaerobios facultativos que sirven para el establecimiento posterior de especies estrictamente

anaerobias, que son las predominantes en el intestino de un adulto. En general estos primeros colonizadores, que vienen determinados mayoritariamente por el tipo de alimentación del recién nacido, son enterococos y enterobacterias, que posteriormente que se verán sustituidos por microorganismos estrictamente anaerobios como bacteroides, las bifidobacterias y los clostridios, una vez que el oxígeno inicial ha desaparecido por completo (Fanaro *et al.*, 2003). En la infancia, y hasta los dos años de edad, la microbiota aun es inestable y fluctúa en función de numerosos parámetros. De acuerdo con la revisión realizada por Clavel y Mapesa (2013), algunos de los factores que podrían afectar la colonización de la microbiota intestinal son el tipo de parto (por cesárea o natural) y la forma de alimentación temprana (leche materna o fórmulas). En los primeros años de vida, el niño se ve sometido a agentes infecciosos y a antibióticos con frecuencia, lo que afecta a la microbiota intestinal que está constantemente en renovación. Esta microbiota intestinal trata de ir desarrollándose hacia un estado de equilibrio, de tal forma que los acontecimientos que tienen lugar durante los primeros estadios del desarrollo parece ser que marcan cómo será la composición y la diversidad de la misma en el futuro.

Dentro de las bacterias de la microbiota del TGI de un adulto, la mayoría necesitan ausencia total de oxígeno para su desarrollo, es decir, son anaerobias estrictas, superando su número en dos o tres órdenes de magnitud a las anaerobias facultativas y a las aerobias (Clemente *et al.*, 2012), lo cual parece ser un claro reflejo de las condiciones ambientales que se dan en esta región del organismo humano. De acuerdo con lo publicado por la recopilación de investigaciones llevada a cabo por Turnbaugh y Gordon (2009), se puede afirmar que las especies microbianas residentes en el TGI son, en su conjunto, muy diferentes interindividualmente y muy variables en los diferentes estadios de desarrollo, existiendo, no obstante, un conjunto de microorganismos, designados como el núcleo microbiano intestinal, que codifican para funciones compartidas entre las diferentes personas y necesarias en las diferentes etapas de la vida.

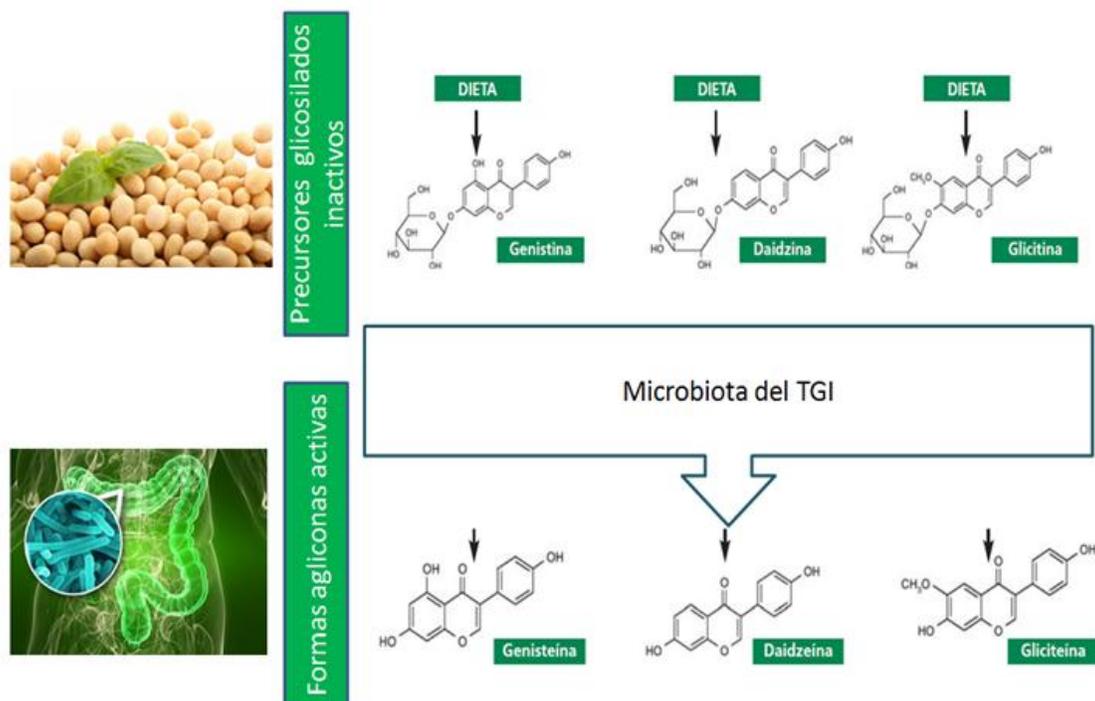
La relación existente entre la microbiota intestinal y el ser humano es claramente beneficiosa para ambas partes. Mientras que el TGI humano aporta un ambiente protector y rico en nutrientes para los microorganismos, éstos son esenciales para el funcionamiento correcto del intestino, actuando como barrera de defensa a la entrada a nivel sistémico de patógenos, facilitando la digestión de polisacáridos y otros componentes de la dieta de difícil digestión, produciendo vitaminas esenciales, estimulando la angiogénesis, regulando el almacenamiento de las grasas y modulando la respuesta inmune local (Serikov *et al.*, 2010). Una de las cuestiones más

interesantes en referencia a la comunidad microbiana intestinal reside en que el genoma total de estos microorganismos, lo que se conoce como microbioma, es capaz de codificar cien veces más genes que el genoma humano, de tal manera que muchas de estas actividades pueden resultar esenciales para el individuo que aloja esta comunidad (O’Hara y Shanahan, 2006).

#### *2.4.2 Biodisponibilidad, distribución, metabolismo y excreción de isoflavonas de soja en el organismo.*

De acuerdo con lo publicado por Barnes *et al.* (2011) y van Duynhoven *et al.* (2011) las isoflavonas de la dieta, en sus formas agliconas, poliméricas o glucosídicas, se distribuyen ampliamente por todo el cuerpo. Sin embargo, la mayor concentración de las mismas, una vez ingeridas, se localiza en el lumen del tracto gastrointestinal. Las formas poliméricas y los glucósidos no se absorben bien a través del epitelio intestinal, lo que impide su paso a través de los enterocitos hacia los capilares que los rodean y, por ende, hacia la circulación sistémica. Cuando las formas conjugadas de las isoflavonas (genistina, daidzina y glicitina) son ingeridas por el ser humano como parte de su dieta, se empiezan ya a transformar por medio de las enzimas  $\beta$ -glucosidasas libres del epitelio oral hacia las formas agliconas activas de las isoflavonas, la genisteína, la daidzeína y la gliciteína (Pastor y Perote, 2007). Este primer paso de transformación es una reacción de deglucosilación por ruptura del enlace  $\beta$ -glucosídico que une la parte glucídica y la no glucídica de la molécula. En la parte proximal del intestino delgado, la conversión hacia las formas agliconas continúa por medio de  $\beta$ -glucosidasas de microorganismos y enterocitos. En ausencia de este tipo de actividades enzimáticas, o cuando ésta se encuentra en niveles reducidos, las isoflavonas alcanzan el intestino grueso, y más concretamente el colon, donde son deglucosidadas por las actividades  $\beta$ -glucosidasas que exhiben ciertos microorganismos de la microbiota autóctona (**Figura 7**).

Modificado de Pastor y Perote (2007).



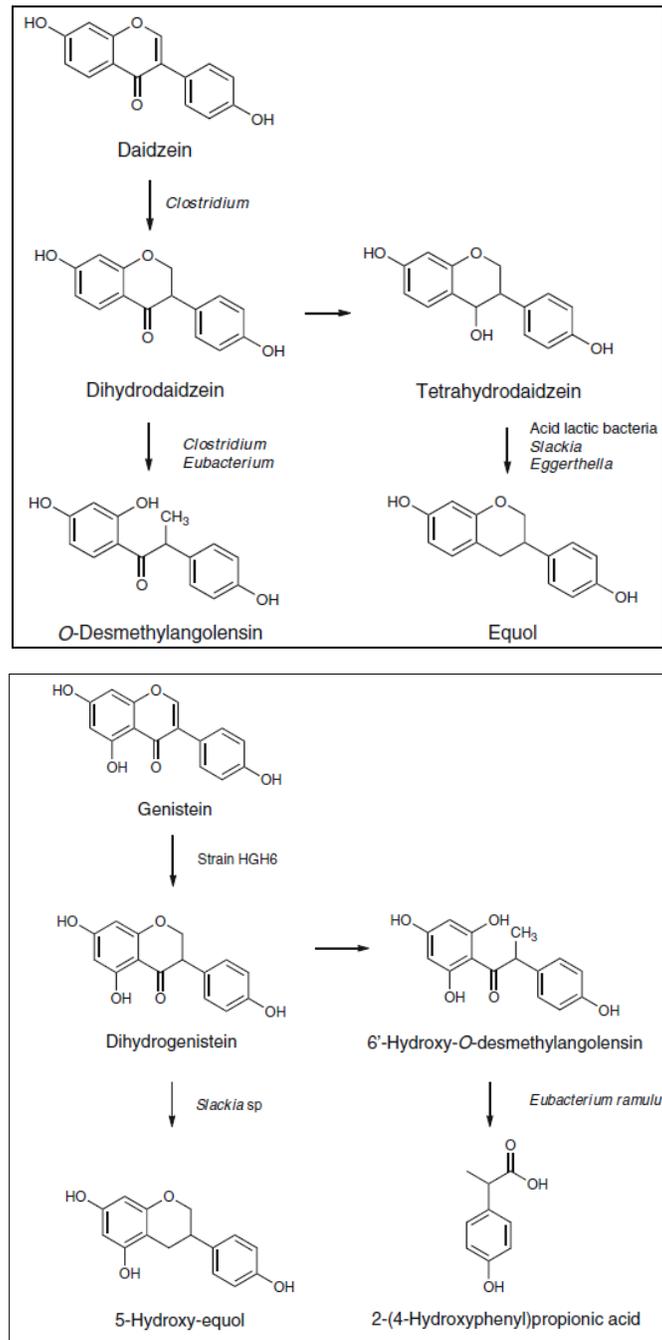
**Figura 7.** Esquema representando las reacciones de transformación de los precursores glicosilados de las isoflavonas en sus correspondientes formas activas por medio de las actividades de tipo  $\beta$ -glucosidasas mayoritariamente de las bacterias intestinales.

Las formas agliconas de las isoflavonas pueden continuar su metabolismo en el colon del TGI. En la **Figura 8** se representan las transformaciones que tienen lugar partiendo de la daidzeína y de la genisteína para liberar equol y 5-hidroxi-equol, así como los microorganismos que las llevan a cabo (Sánchez-Calvo *et al.*, 2013). No se sabe si todas estas rutas de transformación microbiana pueden ser llevadas a cabo por la maquinaria enzimática de un único microorganismo, pero si se han podido identificar diferentes bacterias capacitadas para realizar las diferentes etapas de la ruta. Además, los microorganismos que desencadenan las rutas completas no tienen por qué estar presentes en todos los individuos. En el caso de la daidzeína, se ha visto que puede ser hidrogenada hacia la dihidrodaidzeína que puede a su vez seguir dos caminos: Por un lado puede sufrir una ruptura del heterociclo en condiciones reductoras liberando *O*-desmetilangolensina (*O*-DMA), o, por el otro, puede sufrir un doble paso de desoxigenación hacia tetrahidrodaidzeína primero, liberando finalmente equol. Por su parte, a partir de la genisteína se produce una

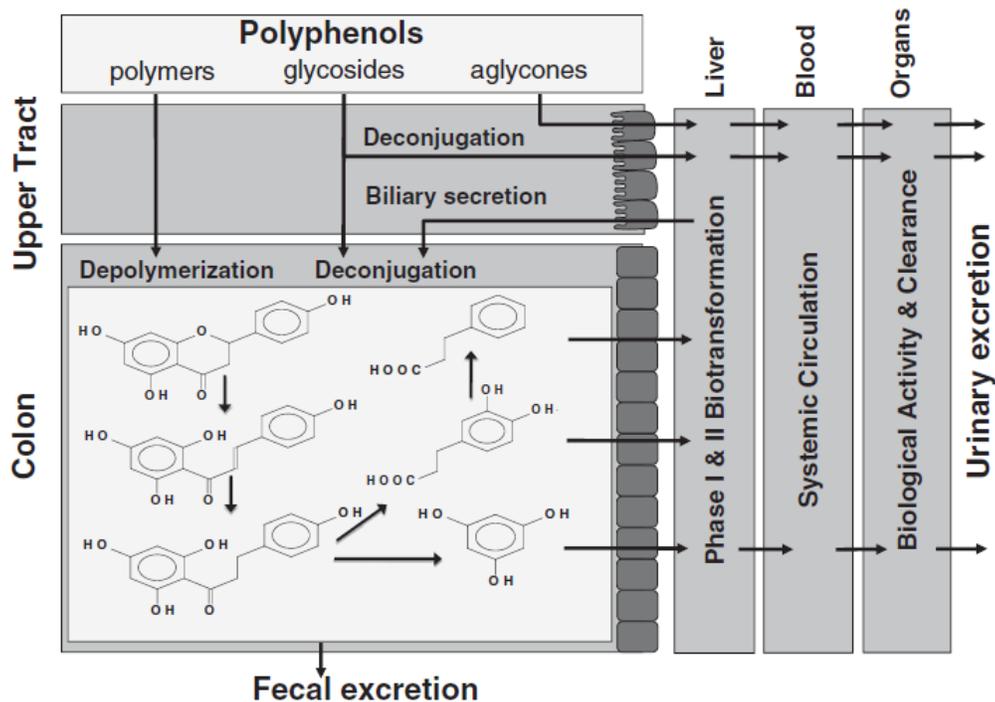
reducción del doble enlace que une el carbono 2 y el carbono 3 del anillo C hacia un enlace sencillo, liberándose dihidrogenisteína. Otras bacterias son capaces de biotransformar posteriormente la dihidrogenisteína hacia 5-hidroxi-equol o en otra ruta de liberar primero 6'-hidroxy-*O*-DMA y, por último, ácido 2-(4-hidroxifenil)propiónico. Se ha comprobado que el equol y, en menor medida, el 5-hidroxi-equol, son los metabolitos derivados de las isoflavonas con mayor efecto fitoestrogénico. En ambos casos la dihidrodaidzeína y la dihidrogenisteína pueden seguir dos caminos, de tal manera que si se sigue la ruta que conduce a la aparición de equol o 5-hidroxi-equol el efecto fitoestrogénico desencadenado del consumo de las isoflavonas es mayor que si no se produjeran las transformaciones de las formas agliconas de las mismas, mientras que sería menor si continúa hacia la ruta que desencadena la aparición de *O*-DMA o 6'-hidroxi-*O*-DMA, pues estos metabolitos carecen de efecto fitoestrogénico.

Las formas agliconas y el equol se pueden excretar en las heces o pueden absorberse a través de los enterocitos del epitelio intestinal, entrando en la circulación sanguínea. Una vez que llegan al hígado entran en un ciclo de circulación enteropática. Esto implica, que por medio de las isoformas hepáticas de las enzimas glucuronosiltransferasas UDP (UGT) y sulfotransferasas (SULT), se producen reacciones de transformación de fase I y II que forman glucurónico o sulfato conjugados que se excretan con el resto del contenido biliar hacia el lumen intestinal, donde pueden ser desconjugados nuevamente por la microbiota intestinal y volver a excretarse en las heces o reabsorberse en el epitelio intestinal (Chandrasekharan y Aglin, 2013). Por su parte, los metabolitos que entran en la circulación sistémica pueden persistir cierto tiempo en ella hasta que ejercen su acción metabólica en los tejidos diana para ser finalmente excretados, principalmente en orina. El esquema que representa este ciclo de circulación de los metabolitos derivados de los polifenoles de la dieta una vez ingeridos, se representa en la **Figura 9**.

Tomada de Sanchez-Calvo *et al.* (2013).



**Figura 8.** Rutas de biotransformación de la daidzeína y de la genisteína por la microbiota intestinal.



**Figura 9.** Representación esquemática del destino metabólico de los polifenoles de la dieta.

Las vías de excreción de isoflavonas se encuentran recopiladas en la revisión llevada a cabo por Chandrasekharan y Aglin (2013). Aproximadamente entre el 10 y el 60 % de las isoflavonas de la dieta se excretan en orina, que constituye la principal vía de eliminación de las isoflavonas del organismo. Así mismo, la excreción de daidzeína en orina es mayor que la de genisteína y gliciteína. Por otro lado, los conjugados de tipo glucurónico representan la mayoría (70-90 %) del contenido de isoflavonas en la orina, seguido por conjugados con sulfato (10-25 %) y por último por las formas agliconas (1-10 %). El pico de eliminación de isoflavonas en orina se encuentra entre las 7 y las 8 h después de una comida rica en isoflavonas, produciéndose el 100 % de la eliminación dentro de las 24 h posteriores a la ingesta de las mismas. La eliminación fecal de isoflavonas es una ruta de menor importancia, que representa tan solo entre un 1 y un 4% del total excretado, estando las heces enriquecidas en las formas agliconas (más de un 80 % del contenido total de isoflavonas). Por último, las isoflavonas de la dieta pueden aparecer en menor cantidad en la leche materna, en el fluido amniótico y en el fluido prostático.

La biodisponibilidad de los metabolitos activos derivados de los polifenoles ingeridos en la dieta depende de numerosos factores, al poseer un metabolismo endógeno complejo. De esta forma, la desconjugación por la microbiota intestinal, la disolución, la difusión y la absorción a través de los epitelios, la distribución hacia los tejidos diana y la excreción de los productos de desecho se pueden considerar las etapas claves.

#### 2.4.3 Microorganismos de la microbiota intestinal con capacidad para activar las isoflavonas.

Hasta la fecha se han podido aislar a partir de heces humanas, e identificar, aunque no clasificar taxonómica de forma completa, un total de 16 cepas capaces de transformar la isoflavona en sus formas agliconas hacia otros metabolitos (**Tabla I**) (Clavel y Mapesa, 2013).

Tomada de Clavel y Mapesa (2013).

Cepa bacteriana	Metabolito final	Origen	Cepa bacteriana	Metabolito final	Origen
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i> FJC-B9 <sup>T</sup>	Equol	Heces humanas	<i>Slackia</i> sp. NATTS	Equol	Heces humanas
<i>Asaccharobacter celatus</i> do03 <sup>T</sup>	Equol	Ciego de rata	Strain D1 and D2	Equol	Heces de cerdo
<i>Eggerthella</i> sp. YY7918	Equol	Heces humanas	Strain HGH6	Dihidrodaidzeína	Heces humanas
<i>Enterorhabdus mucosicola</i> Mt1-B8 <sup>T a</sup>	Equol	Mucosa ileal de ratón	Strain HGH136	O-desmetilangolensina	Heces humanas
<i>Eubacterium ramulus</i> wK1	O-desmetilangolensina	Heces humanas	Strain Julong 732	Equol	Heces humanas
<i>Lactococcus</i> sp. 20-92	Dihidrodaidzeína	Heces humanas	Strain Niu-O16	Dihidrodaidzeína	Heces humanas
<i>Slackia equolifaciens</i> DZE <sup>T a</sup>	Equol	Heces humanas	Strain SY8519	O-desmetilangolensina	Heces humanas
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> HE8 <sup>T a</sup>	Equol	Heces humanas	Strain TM-40	Dihidrodaidzeína	Heces humanas

**Tabla I.** Bacterias cultivables capaces de convertir la isoflavona daidzeína. <sup>a</sup> Cepas productoras de equol a partir de la isoflavona daidzeína.

Todas estas bacterias se han ido aislando desde la década de 1950, momento en el que se

iniciaron las investigaciones con polifenoles como las isoflavonas, coincidiendo con la puesta a punto de las técnicas para trabajar en condiciones de anaerobiosis, precisamente las que necesitan estas bacterias intestinales. La mayoría de estas bacterias son miembros de la familia *Coriobacteriaceae* sin embargo, muchas todavía no han sido clasificadas totalmente a nivel taxonómico. La primera cepa bacteriana productora de equol, la cepa Julong 732, se identificó en 1995 (Xu *et al.*, 1995), y no se pudo clasificar a nivel de filo hasta una década después (Wang *et al.*, 2005), de hecho, en la actualidad, todavía no ha podido ser clasificada dentro de ningún género bacteriano.

Entre todas estas bacterias, el presente trabajo utiliza en la parte experimental cepas de *Slackia equolifaciens* y *Slackia isoflavoniconvertens*. *S. equolifaciens*, aislada e identificada a partir de heces humanas por Jin *et al.* (2008) y *S. isoflavoniconvertens* identificada y aislada, también a partir de heces humanas, por Matthies *et al.* (2009), son dos cepas de dos especies distintas pertenecientes al género *Slackia*, englobado dentro de la familia *Coriobacteriaceae* en el filo *Actinobacteria*. Ambas bacterias poseen una similitud del 92 % cuando se comparan sus secuencias del gen del ARNr16S. Como miembros del género *Slackia*, descrito por primera vez por Wade *et al.* (1999), estas bacterias se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, carentes de motilidad, anaerobias estrictas, no productoras de endosporas y con morfologías de cocos, cocobacilos o bacilos cortos, libres o agrupados en parejas o en cadenas cortas. Sin embargo, lo que hace especiales a estas dos bacterias con respecto a otros representantes del género *Slackia* reside en su capacidad para producir equol, principalmente a partir de la isoflavona daidzeína. El pH de crecimiento óptimo de estas bacterias está en el entorno de la neutralidad (6.5-7), y, además, son microorganismos mesófilos con una temperatura óptima de crecimiento cercana a los 37 °C, característica del interior del cuerpo humano de donde fueron aisladas originariamente.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describe la metodología empleada para llevar a cabo la parte experimental del presente trabajo. Para ello se comenta cómo se llevó a cabo el cultivo de *Slackia* spp. y el cultivo de heces con isoflavonas mediante fermentaciones en discontinuo y la metodología para la toma de muestras para el análisis de las comunidades microbianas mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), para el análisis de isoflavonas y metabolitos derivados de las transformaciones microbianas de la mismas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) y, por último, para el análisis de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) mediante cromatografía de gases (CG).

#### 3.1 Cultivos con *Slackia* spp. y cultivos fecales en un modelo colónico experimental.

La parte experimental del trabajo consistió en la realización, por medio de fermentaciones en discontinuo, de incubaciones *ex vivo* de heces de mujeres menopáusicas tratadas previamente durante seis meses con un preparado comercial a base de isoflavonas de soja en combinación con estos mismos compuestos. En este apartado se reflejan los medios y las cepas de cultivo para la realización de las fermentaciones y las condiciones en que estas se llevaron a cabo.

##### 3.1.1 Medios, cepas y condiciones de cultivo.

Para las fermentaciones en discontinuo se empleó como medio de cultivo caldo MCB (medio colónico bacteriano) descrito por Falony *et al.* (2006), y caldo MCB<sub>ISO</sub> (MCB suplementado con 160 mg/L de isoflavonas FISIOGEN). El caldo MCB<sub>ISO</sub> se utilizó para la realización de los ensayos de bioconversión de isoflavonas y el caldo MCB como control negativo de los mismos. Este medio de cultivo complejo, permite el crecimiento de bacterias que proceden del colon humano, y por lo tanto, emula el entorno en el que algunos de estos microorganismos son capaces de exhibir ciertas actividades que transforman las isoflavonas hacia sus formas activas. La composición del MCB se refleja en la **Tabla II**, que en este caso se preparó con un 0.2 % de glucosa, en lugar del 1.5 % descrito inicialmente por Falony *et al.* (2006) para obligar a los microorganismos a utilizar como fuente de carbono, al menos en parte, las isoflavonas del medio en sus formas glicosiladas. El pH del medio MCB o MCB<sub>ISO</sub> se ajustó antes del autoclavado a 6.5, en el entorno de la

neutralidad existente en el colon. Tras el autoclavado a 120°C durante 15 min se añadieron, en concentración de 0.2 µg/mL, dos componentes del medio que son termosensibles, la hemina, un derivado de la hemoglobina, y la menadiona o vitamina K3 del grupo de las liposolubles.

Tomada de Falony *et al.* (2006).

Componente	Volumen final 1L
Sales 12.5x en agua Milli-Q® : 25 g/L KCl, 2.5 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 6.25 g/L MgSO <sub>4</sub> , 2.5 g/L MnSO <sub>4</sub> , 0.06 g/L FeSO <sub>4</sub> , 0.06 g/L ZnSO <sub>4</sub> , 56 g/L NaCl, 5.62 g/L CaCl <sub>2</sub> y 6.25 g/L de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .	80 mL
D(+)-Glucosa monohidrato (Merck)	2 g
Extracto de levadura (Scharlau)	3 g
L-Cisteina-HCl monohidrato (VWR)	0.4 g
Caseína tripsica peptona (triptona) (Scharlau)	2.5 g
Peptona de carne por digestión pancreática granulada (Merck)	6.5 g
Peptona de Soja (Scharlau)	5 g
Tween®80 (Merck)	2 mL
Agua destilada (Elix <sup>®</sup> )	Hasta 1L
Tras autoclavar	
Hemina (10 mg/mL) stock	500 µL
Menadiona (10 mg/mL) stock	500 µL
Isoflavonas FISOGEN (Zambon) (80 mg isoflavonas/comprimido)	160 mg

**Tabla II.** Composición del medio colónico bacteriano suplementado con isoflavonas (MCB<sub>ISO</sub>) utilizado en las fermentaciones.

Los comprimidos se trituraron en condiciones de esterilidad y se añadieron al medio una vez que se trituraron y se disgregaron con ayuda de un homogeneizador de paletas (Stomacher Lab-Blender 400).

Se utilizaron en las fermentaciones dos cepas de microorganismos productores de equol del género *Slackia* procedentes de la Colección de Cultivos Tipo Alemana (*DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*): *Slackia equolifaciens* DSM 24851 y *Slackia isoflavoniconvertens* DSM 22006. Se evaluó inicialmente el crecimiento de estos microorganismos en diferentes medios de cultivo recomendados por la DSMZ hasta estandarizar las condiciones de

cultivo óptimas. Se ensayó, el medio GAM Broth (*Gifu Anaerobic Medium*) (Nissui) suplementado con un 0.5% de arginina (Merck), el medio *Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth* (Oxoid) suplementado con 0.3 g/L de L-cisteína-HCL y con 1 mg/L de resarzurina, el medio Columbia Blood Medium (Merck), y el medio BHI (*Brain Heart Infusion*) (Difco). Los microorganismos se cultivaron en estrictas condiciones de anaerobiosis en cabina (Whitley DG500) con una atmósfera reductora controlada compuesta por un 80 % de N<sub>2</sub>, un 10 % de CO<sub>2</sub> y un 10 % de H<sub>2</sub>, con una humedad relativa del 80 % y a una temperatura de 37°C.

Como resultado de los ensayos iniciales de crecimiento, durante la duración de la parte experimental del trabajo, ambas cepas del género *Slackia*, se propagaron finalmente en medio GAM sólido o líquido, suplementado con un 0.5 % de arginina, dándoles pases sucesivos a medio fresco cada 48 h. Para guardar *stocks* de los microorganismos, los cultivos líquidos se centrifugaron a 13.200 rpm durante 10 min y el pellet bacteriano obtenido se resuspendió en medio fresco con un 30 % de glicerol (Merck) como agente crioprotector, guardando las cepas congeladas en cámaras a -80 °C para posteriores usos.

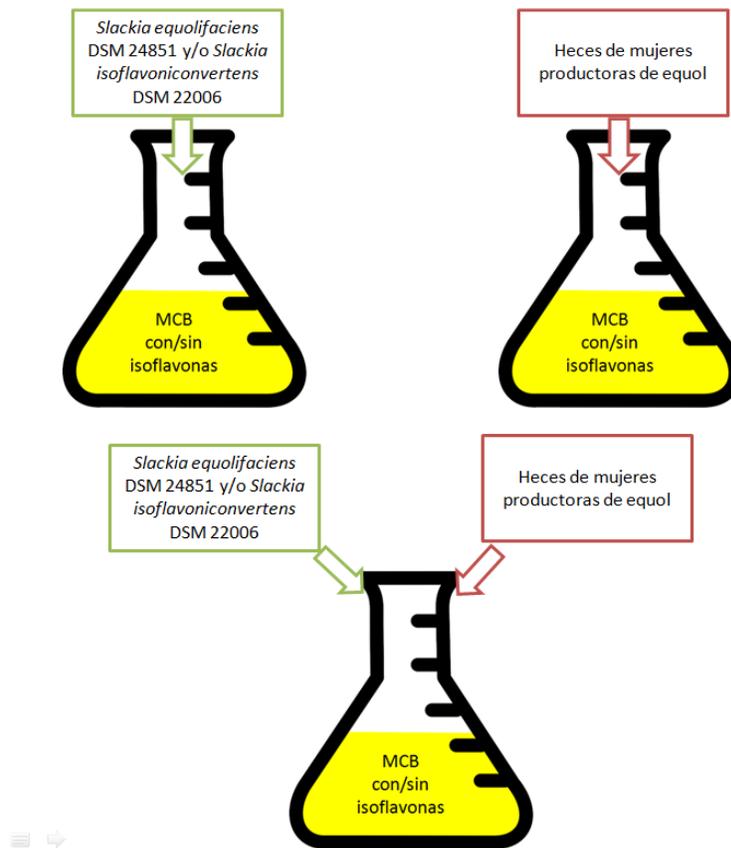
### 3.1.2 Fermentaciones en discontinuo.

Se ensayaron distintas condiciones de fermentación para optimizar el procedimiento. Todas las fermentaciones, con duración de 24 o 48 h, se llevaron a cabo en el interior de la cabina de anaerobiosis (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> y 10 % H<sub>2</sub>) con una humedad relativa del 80 % y a una temperatura de 37 °C para emular las condiciones del interior del colon humano. Además se probaron condiciones estáticas y agitadas del medio de fermentación, para asegurar el mantenimiento en suspensión de las isoflavonas del medio y optimizar la biodisponibilidad microbiana de nutrientes. Para la agitación se utilizó un agitador MS2 Minishaker (IKA®) operando a baja velocidad (400-600 rpm).

Los cultivos mediante fermentación discontinua que se llevaron a cabo en la parte práctica del presente trabajo se pueden agrupar en varios tipos experimentales (**Figura 10**) que se explican a continuación.

Por un lado se llevaron a cabo fermentaciones con una o dos cepas de microorganismos que se han descrito como transformadoras de isoflavonas, *S. equolifaciens* DSM 24851 y/o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006. Por otro lado se realizaron fermentaciones mediante cultivo de

heces de mujeres menopáusicas tratadas previamente con un preparado comercial a base de isoflavonas de soja y clasificadas por el grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA como productoras de equol en base a la excreción de dicho metabolito en orina. Por último se ensayaron fermentaciones combinando las dos metodologías anteriores, es decir, mezclando las heces de mujeres productoras de equol con una o ambas cepas microbianas capacitadas para transformar las isoflavonas (*S. equolifaciens* DSM 24851 y/o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006).



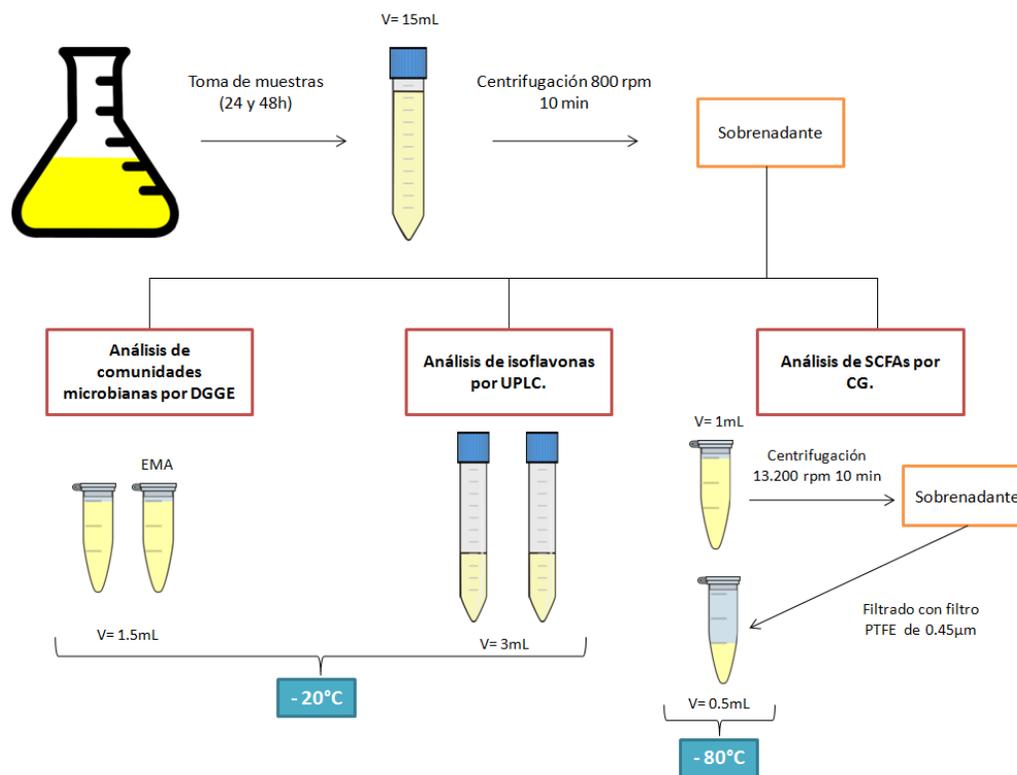
**Figura 10.** Esquema de los cultivos con las cepas del género *Slackia*, cultivos fecales con las heces de mujeres productoras de equol o cultivos combinando las cepas de *Slackia* y las heces.

Para las fermentaciones con microorganismos productores de equol se utilizaron inóculos de ambas cepas del género *Slackia* crecidas durante 24 h en medio GAM líquido suplementado con un 0.5 % de arginina. Los microorganismos, con anterioridad a su inoculación, se sometieron a

sucesivos lavados con PBS (tampón fosfato salino) reducido con la siguiente composición: 8.5 g/L de NaCl, 0.3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.25 g/L de L-Cisteína-HCl, 0.1 g/L de bactopectona y 0.001 g/L de resarzurina. Para estimar los niveles de los inóculos, se realizaron recuentos en placas de GAM suplementado con un 0.5 % de arginina a las 48 h de sembrar diluciones seriadas en base diez hechas en MRD (*maximun recovery diluent*) (Scharlau) suplementado con un 0.25 % de L-cisteína-HCl de los cultivos líquidos de 24 h de los microorganismos.

Para la preparación de los cultivos fecales se utilizaron homogenizados de heces de mujeres productoras de equol tratadas durante 6 meses con un preparado comercial a base de isoflavonas de soja. Para la homogenización de las heces congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  en alícuotas de 1 g, éstas se diluyeron con 9 mL de PBS reducido y de ahí se realizaron los inóculos correspondientes con un 10 % (v/v) del volumen de fermentación (30 mL). Se utilizaron heces de la mujer asignada con el número 1 en el primer mes de tratamiento con el preparado comercial de isoflavonas (1.1), de la mujer 9 en el tercer mes de tratamiento (9.3) y de la mujer 14 en el tercer mes del tratamiento (14.3).

La toma de muestras (**Figura 11**) se realizó a las 24 y 48 h de incubación para las fermentaciones con duración de 48 h y a las 24 h para las que duraron 24 h. Se tomaron 15 mL de muestra y se centrifugaron a baja velocidad (800 rpm, 10 min) con la finalidad de eliminar el material insoluble. El sobrenadante de la centrifugación se repartió para el análisis de las comunidades microbianas mediante DGGE, para el análisis de isoflavonas y metabolitos derivados mediante UPLC y para el análisis de SCFAs mediante CG. Para el análisis de comunidades microbianas, para cada una de las muestras, se reservaron a  $-20^\circ\text{C}$  dos eppendorf con 1.5 mL de sobrenadante cada uno, uno para realizar las extracciones de ADN de comunidad microbiana total con tratamiento con EMA (monoazida de etidio) y otro para tratamiento sin EMA, como más adelante se explica. Para el análisis de isoflavonas por UPLC, para cada una de las muestras, se guardaron 3 mL, por duplicado, de sobrenadante a  $-20^\circ\text{C}$ . Para el análisis de SCFAs se tomó, para cada una de las muestras, 1 mL de sobrenadante y se centrifugó a 13.200 rpm durante 10 min, para descartar las bacterias, y el nuevo sobrenadante se filtró con filtros PTFE (politetrafluoroetileno) (VWR) de  $0.45\ \mu\text{m}$  y se reservaron, congelados a  $-80^\circ\text{C}$ , 0.5 mL de filtrado para su posterior análisis por CG. Así mismo se tomaron muestras de los medios MCB y  $\text{MCB}_{\text{ISO}}$  con el objetivo de utilizarlos como controles de las fermentaciones para UPLC y CG.



**Figura 11.** Esquema del procedimiento para la toma de muestras de las fermentaciones para su congelación hasta su posterior procesamiento.

### 3.2 Análisis de comunidades bacterianas mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).

Para el análisis de las comunidades bacterianas presentes en las fermentaciones, así como su evolución durante las mismas, se utilizó una técnica microbiológica de cultivo independiente, la DGGE. Las técnicas independientes de cultivo suelen utilizar como marcador de diversidad genética el gen que codifica para el ARNr16S. Este gen se suele utilizar como marcador genético al estar presente en todas las células y por su equilibrio entre conservación y variabilidad evolutiva, características que hacen que sea ideal para identificar y discriminar taxonómicamente entre especies bacterianas (Sekirov *et al.*, 2010).

La DGGE es una técnica de electroforesis vertical en la que las muestras, formadas por tantos fragmentos del gen del ARNr16S como especies bacterianas estén presentes en la comunidad, se someten a un gradiente desnaturizante. Al aplicarse la corriente, las muestras van migrando progresivamente hacia una mayor concentración de agente desnaturizante en un gel de poliacrilamida. La estructura de los diferentes fragmentos de ADN presentes en la muestra se va desnaturizando hasta que las dos hebras se separan por completo, momento en el que se paraliza su migración a través del gel por impedimento físico. La migración en el gel es función del contenido G+C (didesoxinucleótidos guanina y citosina) de las secuencias de ADN que forman parte de la muestra, de tal forma que cuando mayor sea el contenido G+C, las uniones entre las dos hebras del ADN serán más fuertes y, por lo tanto, migrarán más en el gel hasta que exista una concentración mayor de agente desnaturizante que sea capaz de separar por completo las dos cadenas de la molécula. La separación de los fragmentos de igual tamaño se produce, por lo tanto, en base a las diferencias en la secuencia de nucleótidos del ADN. La DGGE permite generar un perfil o huella genética (*fingerprinting*) del ADN bacteriano característico de la comunidad microbiana presente en la muestra, de tal forma que cuanto mayor sea el número de bandas de la muestra mayor será la diversidad bacteriana de la misma.

Para llevar a cabo el análisis de las comunidades microbianas mediante DGGE, se extrajo el ADN total de la comunidad microbiana presente en las muestras de las fermentaciones, a continuación, se amplificó selectivamente un fragmento comprendido entre las regiones variables V2 y V3 del gen bacteriano del ARNr16S, y los productos de la amplificación se sometieron a DGGE, como se explica a continuación.

### 3.2.1 Extracción de ADN bacteriano a partir de cultivos puros de *Slackia* spp.

El protocolo de extracción basado en el Kit Bacterial Genomic DNA (GenElute™), con algunas modificaciones, se utilizó para extraer el ADN de *S. equolifaciens* DSM 24851 y *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 a partir de cultivos puros de las mismas con la finalidad de utilizarlo, una vez amplificado, como marcador para la DGGE.

Para la extracción de ADN a partir de cultivos puros de ambas cepas del género *Slackia* se partió de *pellets* congelados a -20 °C, que se obtuvieron tras tomar en cabina de anaerobiosis 1.5 mL de cultivos líquidos bacterianos de cada una de las dos microorganismos, centrifugarlos a 13.200 rpm durante 10 min y someterlos a dos lavados consecutivos con 1 y 0.5 mL de PBS

reducido. Para la lisis celular se trató el pellet con una solución de lisis con 20 mg/mL de lisozima (Merck) y 5U/ $\mu$ L mutanolisina (Sigma), incubando las muestras a 37 °C durante 1 h. A continuación se realizó un tratamiento con RNasa A seguido de un tratamiento con proteinasa K (QIAGEN) de concentración 20 mg/mL a 55 °C durante 10 min. Para la elución del ADN purificado mediante el uso de las columnas del Kit, se utilizaron 100  $\mu$ L de agua estéril de grado molecular (Sigma). El ADN extraído se congeló a -20 °C para su posterior uso.

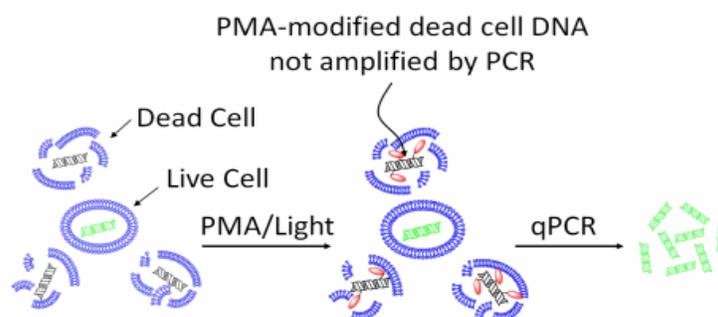
### 3.2.2 Extracción de ADN microbiano total.

Para la extracción de ADN a partir de las muestras de las fermentaciones, se combinaron métodos de lisis enzimática y mecánica siguiendo el protocolo de extracción de ADN basado en el Kit Qiagen Stool Human DNA (QIAamp®) en combinación con el protocolo publicado por Zoetendal *et al.* (2006) para el aislamiento de ADN de muestras del tracto gastrointestinal humano. Además se combinaron los métodos de extracción de ADN tradicionales con la posibilidad que aportan ciertas sustancias fotoactivas como el EMA de diferenciar selectivamente y con alta sensibilidad entre las bacterias viables y las que tienen membranas dañadas o están muertas (Nocker *et al.*, 2006).

Los métodos tradicionales de PCR son incapaces de distinguir entre células vivas y muertas, de tal manera que en la reacción la ADN polimerasa amplifica cualquier fragmento de ADN que se encuentre en la mezcla. El tratamiento de las muestras con EMA con anterioridad a una PCR permite detectar selectivamente solo las células viables, pues este tipo de agentes químicos se unen covalentemente al ADN con una altísima afinidad tras la exposición a luz visible intensa. Esta exposición permite que se formen complejos entre el compuesto y el material genético, al intercalarse entre la doble cadena del ADN, imposibilitándose la acción de las ADN polimerasas que rigen el proceso de amplificación. Como el EMA está diseñado de tal forma que es incapaz de atravesar las membranas intactas, es decir las de las células vivas, solo las células con membranas dañadas son permeables al compuesto (**Figura 12**). A continuación se explican los pasos seguidos para la extracción de ADN utilizando el tratamiento convencional y un tratamiento en el que se incorpora EMA para discriminar entre células bacterianas vivas y muertas.

Las muestras de 1.5 mL de las fermentaciones, centrifugadas a 800 rpm durante 10 min para eliminar el material no soluble y guardadas por duplicado a -20 °C, una para tratar con EMA y otra sin EMA, se descongelaron en hielo y se centrifugaron a 4 °C a 13.200 rpm durante 5 min,

descartando el sobrenadante y lavando el *pellet* de células microbianas con PBS frío 100 mM pH 7.4. A continuación se concentraron los *pellets* que no fueron sometidos a tratamiento con EMA en 500  $\mu$ L del mismo tampón y los que fueron tratados con EMA en 500  $\mu$ L del mismo tampón suplementado con un 6.7 % de sacarosa como agente crioprotector para minimizar los daños celulares durante el tratamiento con EMA. Para el tratamiento con este compuesto se utilizó EMA (Sigma) a concentración de 60  $\mu$ M en las muestras y dejándolo actuar durante 20 min. Posteriormente, el contenido de las suspensiones microbianas tratadas se expuso a una fuente de luz halógena de 650 W durante 5 min, situando las muestras a una distancia de 20 cm de tal manera que la incidencia de la luz se produjese por igual en toda la muestra.



**Figura 12.** Unión selectiva del PMA (monoazida de propidio), un análogo funcional del EMA, al ADN de las células con membranas alteradas formando complejos que impiden la posterior amplificación por PCR.

Seguidamente, todas las muestras tratadas o no con EMA, se lavaron con el mismo PBS para eliminar restos del compuesto y se sometieron a un tratamiento de lisis enzimática con 20 mg/mL de lisozima y 5U/ $\mu$ L de mutanolisina. Para la lisis se incubaron las suspensiones bacterianas a 37 °C durante 40 min. A continuación, se transfirieron las muestras a tubos de rosca conteniendo una perla de vidrio (ServiQuimía), 0.3 g de arena (BioSpec) de 0.1 mm y 0.1 g de arena (BioSpec) de 0.5 mm y se sometieron a tres tratamientos consecutivos de ruptura mecánica en un equipo FastPrep™ FP120 Bio 101 Thermo Savant (MP Biomedicals) de 30 s de duración cada uno y a una velocidad de 5.5, dejando las muestras en hielo 5 min entre cada tratamiento. Tras la ruptura mecánica las muestras se sometieron a dos choques térmicos en baño termostaticado, el primero mediante incubación a 95 °C durante 10 min y el segundo mediante incubación con proteinasa K de 20 mg/mL a 70 °C durante 10 min. El resto de la extracción se realizó utilizando las columnas y

los reactivos del Kit Qiagen Stool Human DNA. La elución final de las muestras se realizó con 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril de grado molecular.

Se realizaron mediciones en un equipo Epoch (Bio-Tek) de la concentración del material genético extraído así como de su grado de purificación mediante la relación Absorbancia 260 nm/280 nm. En las muestras en las que se obtuvieron cantidades inferiores a 10 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN se realizaron concentraciones en un Concentrador 5301 (Eppendorf) a 45 °C durante 1.5 h, y en las que se obtuvieron grandes cantidades de ADN se realizaron diluciones en agua estéril de grado molecular hasta dejar todas las muestras en una concentración final en torno a los 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 3.2.3 Amplificación parcial del gen del ARNr16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Partiendo del ADN extraído de las muestras de los cultivos puros de *Slackia* spp. o de cultivos fecales, se realizaron reacciones de amplificación de un fragmento de 193 pares de bases (pb) comprendido entre las regiones variables V2 y V3 del gen que codifica para el ARNr16S bacteriano mediante PCR en un termociclador MyCycler (Bio-Rad), con el programa que se refleja en la **Tabla III**.

Para la amplificación se emplearon los cebadores *forward* F357-GC y *reverse* R518 descritos por Muyzer *et al.* (1993). El cebador F357 lleva acoplada una pinza rica en G+C para impedir la apertura por completo de las dos hebras de ADN en el gradiente desnaturante de la DGGE. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  (20.6  $\mu\text{L}$  de agua estéril de grado molecular, 1.2  $\mu\text{L}$  de F357-GC 10  $\mu\text{M}$ , 1.2  $\mu\text{L}$  de R518 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Pol 2.0x Master Mix Red  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM (Ampliqon) y 2  $\mu\text{L}$  de ADN molde). Para la comprobación de las amplificaciones se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x a 75 V durante 40 min utilizando el marcador GRS Ladder 100 pb Grisp Research Solutions. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta GBox (Syngene).

	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 min
Desnaturalización	95	30 s
35 ciclos Anillamiento	56	30 s
Extensión	72	40 s
Extensión final	72	10 min

**Tabla III.** Programa de PCR para amplificar la región V2-V3 del ARNr16S.

---

### 3.2.4 DGGE.

Los productos de amplificación se sometieron a DGGE utilizando como marcador la combinación de los dos productos de amplificación de *S. equolifaciens* DSM 24851 y *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 purificados mediante el Kit PCR Clean-Up (GenElute™), así como otro marcador constituido por distintas especies microbianas aisladas del tracto gastrointestinal humano (*Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Flavonifractor plautii* y *Ruminococcus flavefaciens*) y elaborado previamente por el grupo de Cultivos Lácteos Funcionales del IPLA.

La DGGE se llevó a cabo en un equipo DCode™ Universal Mutation System (Bio-Rad) en geles verticales utilizando un gradiente del 45 % (*low*) al 60 % (*high*) de una combinación de bis-acrilamida (37.5:1) (Bio-Rad), formamida (Sigma) y urea (PlusOne) como agentes desnaturizantes. Como agente polimerizante se utilizó persulfato amónico (APS) (Bio-Rad) al 10 % y como agente entrecruzante *N,N,N',N'*-tetrametiletilenediamina (TEMED) (Bio-Rad). En los geles, además del gradiente *low-high* se incorporó un *plug* (gel de sellado) en la base, para evitar fugas en la polimerización, y un *stacking* (gel de empaquetado) en la parte superior, para conseguir que todas las muestras entrasen a la vez en el gel con el gradiente. La preparación de las soluciones *low*, *high*, *plug* y *stacking* se muestra en la **Tabla IV**. El gradiente se realizó combinando soluciones de los agentes desnaturizantes 0 % y 100 % mediante un gradientador Hoefer™ 5630 Gradient Maker (ServiQuimia) funcionando mediante vasos comunicantes.

---

Solución	0 % (mL)*	100 % (mL)*	TEMED (μL)	APS 10 % (μL)
<i>Low</i>	7.15	5.85	13	50
<i>High</i>	5.2	7.15	13	50
<i>Plug</i>	1.5	-	4.5	15
<i>Stacking</i>	9	-	13	50

\*0 %: 50 mL de bis-acrilamida y 2.5 mL de TAE 50X en 250 mL de agua Milli-Q.

\*100 %: 105.4 g urea, 50 mL de bis-acrilamida, 100 mL de formamida y 2.5 mL de TAE 50x en 250 mL de agua Milli-Q.

**Tabla IV.** Soluciones empleadas para la formación de los geles de DGGE.

---

En cada pocillo del gel se cargaron 10 μL de muestra (5 μL del producto de amplificación, 2 μL de tampón de carga y 3 μL de agua estéril de grado molecular) y las electroforesis se realizaron en tampón TAE 1x a 200 V a una temperatura de 60 °C hasta que el frente generado por el tampón de carga atravesaba el *stacking*, bajando en ese momento el voltaje para dejarlo a 75 V durante 16 h. Tras la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 μg/mL) durante 15 min, eliminando el exceso de tinción dejando el gel en agua destilada durante otros 10 min. Los geles se visualizaron en el transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.2.5 Secuenciación de bandas de DGGE.

Para establecer la identidad de algunas de las bandas observadas en los patrones de DGGE, estas se cortaron de los geles y se procedió a su posterior amplificación y purificación para enviarlas a secuenciar. Para ello, cada banda se disolvió en 20 μL de agua Sigma y tras dejar el ADN difundir a 4 °C durante una noche se realizó una PCR, en las mismas condiciones que se describieron anteriormente utilizando en este caso los mismos cebadores sin la pinza rica en G+C (F357 y R518). Los amplicones obtenidos se sometieron a continuación a una purificación mediante el Kit PCR Clean-Up. Los productos purificados de PCR se enviaron a secuenciar a la compañía MacroGen. Las secuencias devueltas una vez depuradas y procesadas con el programa Chromas 2.4, se compararon para encontrar homologías con las secuencias depositadas en dos bases de datos, el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y el RDP (*Ribosomal Database Project*) ([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)).

### **3.3 Determinación de isoflavonas y metabolitos derivados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC).**

Para la determinación de isoflavonas y metabolitos derivados a partir de las muestras procedentes de las fermentaciones, se utilizaron 3 mL de cada una de las muestras guardadas a 20 °C. Para concentrar y purificar los analitos a detectar se realizó una extracción en fase sólida y reversa mediante un equipo MANIFOLD preparado con cartuchos (Agilent Technologies) rellenos con 200 mg de absorbente hidrofóbico de silica (Bond Elut-C18) y con capacidad de 3 mL. Las columnas se activaron con metanol de grado cromatográfico (VWR Chemicalia) y se lavaron con tampón acetato de sodio 0.1 M a pH 4.5. Antes de pasar las muestras por las columnas se mezclaron con otros 3 mL del mismo tampón y con 213 µL de estándar interno (SI) 4-hidroxibenzofenona (4-HBPH) de un *stock* a 45 µM. La elución de los analitos se llevó a cabo seguidamente con 1 mL de etilacetato de grado cromatográfico (Merck). El eluido se filtró mediante filtros de PTFE de 0.2 µm y se dejó evaporar hasta obtener el residuo seco, que se concentró y resuspendió en 100 µL de metanol. Las muestras se preservaron en viales opacos a 4 °C hasta su análisis por UPLC.

Para la determinación de las isoflavonas en sus formas conjugadas (daidzina y genistina) y en sus formas agliconas (daidzeína y genisteína) así como uno de los metabolitos derivado de la bioconversión de las mismas (equol) se utilizó un equipo UPLC-H Class (Waters) con un volumen de preinyección de 317 µL preparado con una columna BEH C18 de espesor de 1.7 µm y de dimensiones 2.1 × 100 mm (Waters) a 40 °C. Se inyectaron 0.1, 0.2, 1 y/o 3 µL de muestra a una velocidad de flujo de 0.450 mL/min en una cámara de muestreo a 16°C, utilizando en el gradiente de elución como solvente A, agua suplementada con un 0.05 % de ácido fosfórico, y como solvente B, metanol al 100 %. Para la determinación de daidzeína, genisteína, daidzina y genistina se utilizó un detector de absorbancia photodiode array (PDA) con datos de espectro 3D entre 190 y 450 nm y canales 2D a 260 y 280 nm. Para la determinación de equol se utilizó un detector de fluorescencia (módulo FLR) con excitación a 260 nm y emisión a 310 nm. Como patrones de calibración se utilizaron mezclas de diluciones 100, 50 y 10 µM (realizadas en metanol para las formas agliconas y para el equol, y, en metanol agua para las formas conjugadas) a las que se les añadió el SI.

### **3.4 Determinación de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) mediante cromatografía de gases (CG).**

Para la determinación de SCFAs a partir de las muestras procedentes de las fermentaciones, se descongeló 1 mL de cada una de las muestras guardadas a -80 °C y se les añadió una proporción de estándar interno (2-etil-butanoico) 1:10.

Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo 6890N (Agilent Technologies) con inyector automático HP 7683B (Agilent Technologies) split/splitless a una temperatura de 220 °C utilizando una relación de split 1:20 y con columna capilar HP-FFAP de 30 metros con un diámetro de 0.25 mm y un espesor de 0.25 µm. Se inyectó 1µL de cada una de las muestras, utilizando como gas portador se utilizó Helio con una presión constante de cabeza de 28 psi. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura inicial de 110 °C, primera rampa de 5 °C/min hasta 150°C, segunda rampa de 20 °C/min hasta 220 °C y temperatura final de limpieza de la columna de 220 °C durante 5 min. Se empleó un detector por ionización en llama (FID). La cuantificación se realizó mediante el programa ChemStation (Agilent Technologies) calibrando el equipo con un mínimo de cinco concentraciones diferentes de soluciones acuosas de los analitos: ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido capropico y estándar interno.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

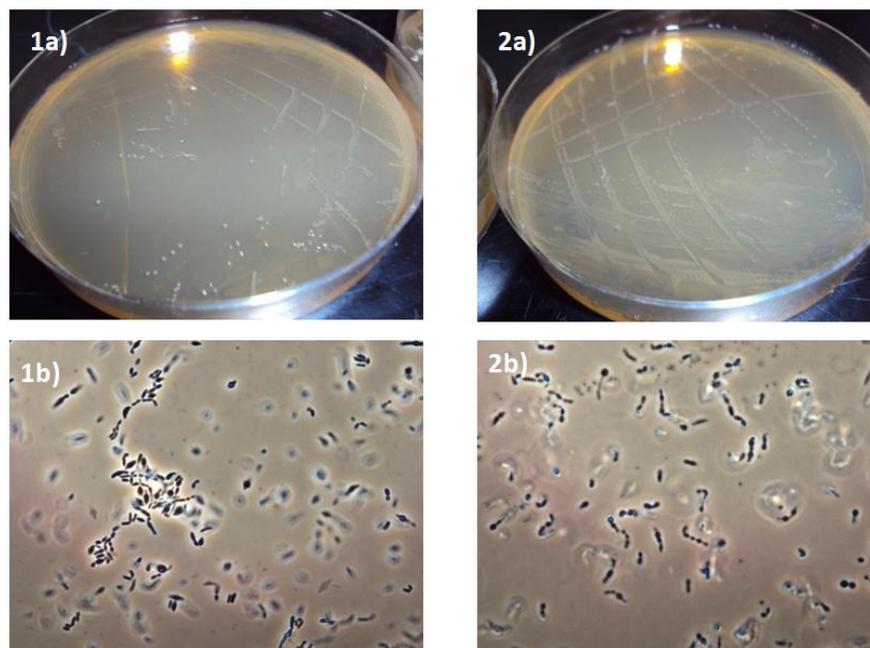
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este apartado se describen los resultados obtenidos de los ensayos realizados para optimizar las condiciones de cultivo y crecimiento de las dos cepas de microorganismos del género *Slackia* utilizadas en el presente trabajo. Así mismo, se comenta la optimización de las condiciones experimentales de las fermentaciones en discontinuo que se llevaron a cabo. Por otro lado, se indica la biodisponibilidad de isoflavonas en el medio MCB en el que se realizaron las fermentaciones. Por último, se exponen los resultados que se obtuvieron de los cultivos con *Slackia* spp., de los cultivos con heces de mujeres menopáusicas y de cultivos fecales combinando *Slackia* spp. y heces.

### 4.1 Ensayos de cultivo de *Slackia* spp.

Tras ensayar distintos medios de cultivo, descritos en el apartado de material y métodos, se eligió finalmente, para la propagación de *S. equolifaciens* DSM 24851 y *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 de forma rutinaria, el medio GAM suplementado con un 0.5 % de arginina. Ambos microorganismos son estrictamente anaerobios y poseen un crecimiento lento, necesitando 24 h para crecer en medio líquido y 48 h para crecer en medio sólido.

El crecimiento de ambas cepas del género *Slackia* en este medio, así como su aspecto morfológico al ser observados mediante microscopía óptica se refleja en la **Figura 13**. Las colonias de ambos microorganismos mostraron un aspecto translúcido o ligeramente blanquecino, en ambos casos de pequeño tamaño. *S. equolifaciens* DSM 24851 presentó colonias más pequeñas y un crecimiento más lento que *S. isoflavoniconcertens* DSM 22006. Al microscopio, ambas cepas mostraron un tamaño similar y morfología en forma de coco-bacilos, libres o agrupados en parejas o en cadenas cortas. Si bien, en la literatura se ha descrito que *S. isoflavoniconvertens* (Matthies *et al.*, 2009) tiene un tamaño de  $0.5 \times 0.8$ - $1.0 \mu\text{m}$  y *S. equolifaciens* de  $0.4 \times 2.4 \mu\text{m}$  (Jin *et al.*, 2010).



**Figura 13.** Morfología de *S. equolifaciens* DSM 24851 y de *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006. **1)** *S. equolifaciens* DSM 24851 y **2)** *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006. **a)** Crecimiento de ambas cepas bacterianas en placas de GAM + 0.5% de arginina sembradas por estrías. **b)** Visualización de ambas cepas bacterianas con microscopio óptico H600L (Nikon) con objetivo de 100 aumentos.

---

Por otro lado, a través de los recuentos realizados a partir de diluciones seriadas de cultivos líquidos de 24 h de ambas cepas del género *Slackia*, se determinó que estas crecían hasta una densidad celular entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc/mL.

#### **4.2 Ensayos de las condiciones de fermentación.**

En esta parte se muestran los resultados de la estandarización de las condiciones de fermentación para la realización de los cultivos de *Slackia* spp. o cultivos fecales con heces de mujeres menopáusicas productoras de equol. Para optimizar dichas condiciones se ensayó el tiempo de duración de las fermentaciones y condiciones estáticas o agitadas del medio.

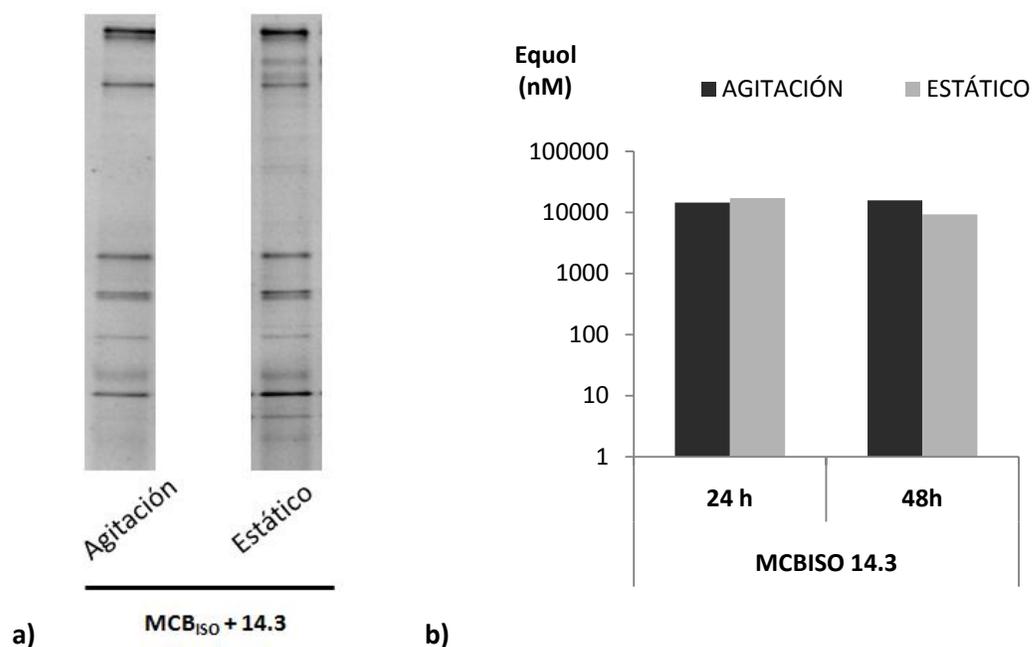
#### 4.2.1 Fermentaciones en agitación o en estático.

El primero de los parámetros de fermentación que se optimizó fueron las condiciones para la mezcla y el mantenimiento en suspensión de los componentes del medio, principalmente de las isoflavonas. Con esta finalidad se realizaron cultivos fecales con las heces de la mujer 14.3 en medio MCB<sub>ISO</sub> en condiciones de ligera agitación o en estático.

Los patrones de DGGE de las comunidades microbianas desarrolladas en ambas condiciones no mostraron diferencias claras entre sí (**Figura 14 a**). Esto indicaba que el desarrollo de los microorganismos mayoritarios presentes en las heces de las mujeres del estudio en el medio suplementado con las isoflavonas podría ser independiente de la agitación o no del medio.

En estos experimentos se evaluó también la bioconversión de las isoflavonas del medio hacia el metabolito con mayor bioactividad que se deriva de ellas, el equol. Los resultados obtenidos mediante UPLC de la producción de equol durante estas fermentaciones se muestran en la **Figura 14 b**. Al igual que lo que ocurría con los patrones de comunidades microbianas, no se apreciaron cambios significativos entre las fermentaciones que tuvieron lugar en agitación o en estático, pues la producción de equol se mantenía en concentraciones de 15.000 nM. Si bien a las 24 h de la fermentación la producción de equol fue ligeramente mayor en estático, a las 48 h este resultado se invertía. Además se observó que, en agitación, la producción de equol sufría menores variaciones entre las 24 y 48 h de la fermentación que en estático. En condiciones de reposo, se apreció una ligera disminución en la producción de equol a las 48 h, lo cual se podría explicar si se tiene en cuenta que parte de las isoflavonas del medio tenderían a ir depositándose a lo largo del tiempo de fermentación.

A partir de estos resultados se decidió continuar realizando las fermentaciones en condiciones de agitación para garantizar la máxima eficiencia en el reparto de los componentes del medio.



**Figura 14.** Cultivo fecal con las heces de la mujer 14.3 en MCB<sub>ISO</sub> ensayando condiciones estáticas o agitadas del medio de fermentación. **a)** DGGE de los productos de amplificación del gen del ARNr16S obtenidos por PCR de los extractos de ADN. **b)** Producción de equol en el medio de fermentación a las 24 y 48 h determinada mediante UPLC.

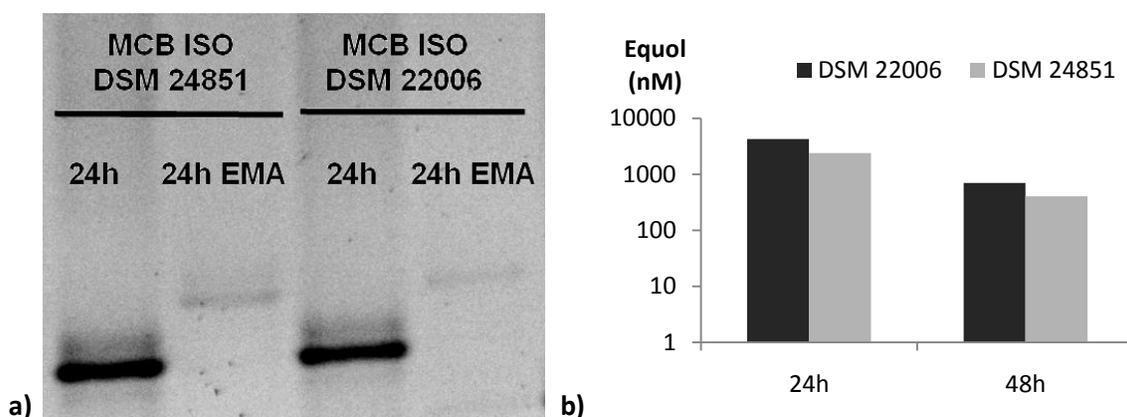
#### 4.2.2 Tiempo de duración de las fermentaciones.

Se ensayaron, en medio MCB<sub>ISO</sub>, cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851 o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 y cultivos con heces de mujeres menopáusicas productoras de equol (1.1 y 14.3), en ambos casos con duración de 24 y 48 horas.

La visualización de los productos de amplificación, en un gel de DGGE, de las extracciones (realizadas con y sin tratamiento previo con EMA) a las 24 h del cultivo de *S. equolifaciens* DSM 24851 o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 en MCB<sub>ISO</sub> se muestra en la **Figura 15 a**. Como se puede apreciar en el gel, al tratar con este tipo de agentes se observó la desaparición de las bandas de amplificación correspondientes con ambas cepas de microorganismos. Estos resultados indicaban que tras 24 h de incubación, los microorganismos podrían estar ya una fase estacionaria de crecimiento, y empezaban a perder viabilidad, de tal manera que la membrana de los mismos

podría estar dañada y permitir la difusión del EMA hacia el interior celular. Una vez en el interior celular, este compuesto se une al material genético y hace que este quede inaccesible para la actuación de la ADN polimerasa (Nocker *et al.*, 2006), de ahí que en el gel de DGGE no se observase banda de amplificación correspondiente a ambas cepas de microorganismos.

Por su parte, el análisis mediante UPLC de los metabolitos derivados de la biotransformación de las isoflavonas del medio MCB<sub>ISO</sub>, determinó la presencia de equol en las muestras de los cultivos de cada una de las cepas del género *Slackia*, en concentraciones de 3.000 nM a las 24 h de la fermentación, y en concentraciones de 500 nM a las 48 h (**Figura 15 b**). Esto podría indicar que, aunque los microorganismos se empezaran a lisar a las 24 h, la bioconversión de isoflavonas en el medio continuaba, aunque en niveles más reducidos, como se observa en los datos de las 48 h. Los procesos de ruptura de las membranas celulares supondrían la liberación hacia el medio, junto con el resto del lisado celular, de las enzimas encargadas de la bioconversión de las isoflavonas.

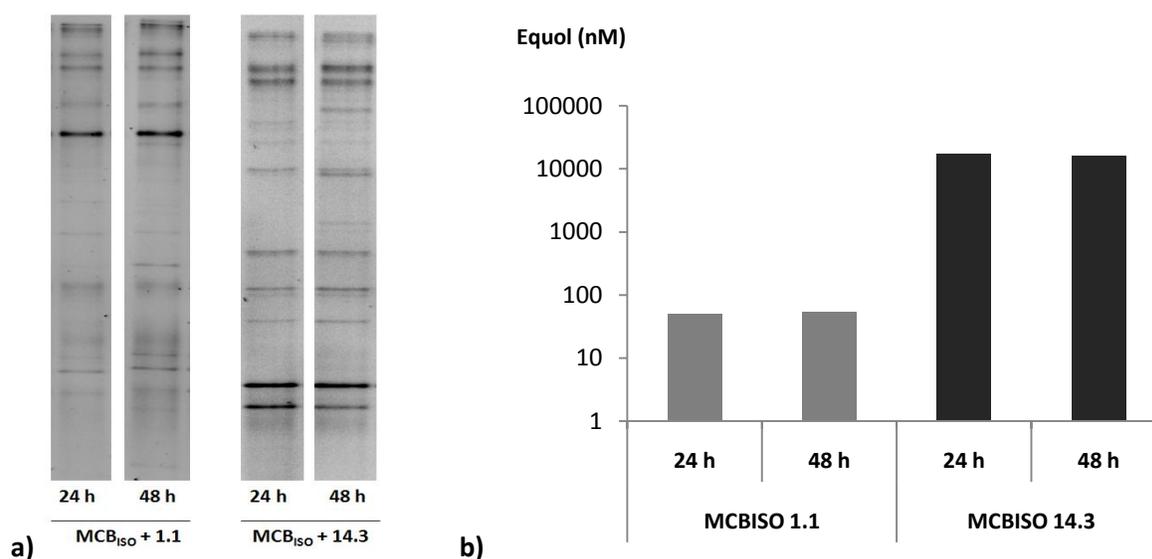


**Figura 15.** Cultivo en medio MCB<sub>ISO</sub> con *S. equolifaciens* DSM 24851 o con *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 a las 24 y/o 48 h de la fermentación. **a)** DGGE de los productos de amplificación obtenidos por PCR de los extractos de ADN realizados con y sin tratamiento con EMA a las 24 h. **b)** Producción de equol en el medio de fermentación a las 24 y 48 h determinada mediante UPLC.

Por otro lado, cuando se analizó la evolución de las comunidades microbianas con el tiempo, no se pudieron observar cambios entre las 24 y las 48 h de la fermentación en los perfiles de DGGE de los cultivos fecales con las heces de la mujer 1.1 y 14.3 realizados en MCB<sub>ISO</sub>

(Figura 16 a). Las poblaciones mayoritarias de las heces de las mujeres del estudio que se desarrollaban en el medio de fermentación diseñado para este trabajo, parecían haber alcanzado una estabilidad a las 24 h de la fermentación que se mantenía con el tiempo. De ahí que no apareciesen cambios significativos en los perfiles de DGGE entre las 24 y 48 h de la fermentación, al menos en las poblaciones microbianas mayoritarias, que son las que permiten analizar este tipo de técnicas independientes de cultivo.

A mayores, tampoco se observaron diferencias en los niveles producción de equol a partir de las isoflavonas del medio entre las muestras tomadas a las 24 y 48 h de los cultivos con las heces de las mujeres 1.1 o 14.3 (Figura 16 b). Las muestras de los cultivos fecales de la mujer 1.1 se mantuvieron produciendo equol entre las 24 y 48 h de la fermentación en un rango de concentración de 50-100 nM y los de la mujer 14.3 se mantuvieron en una concentración de 15.000 nM en ese mismo intervalo de tiempo.

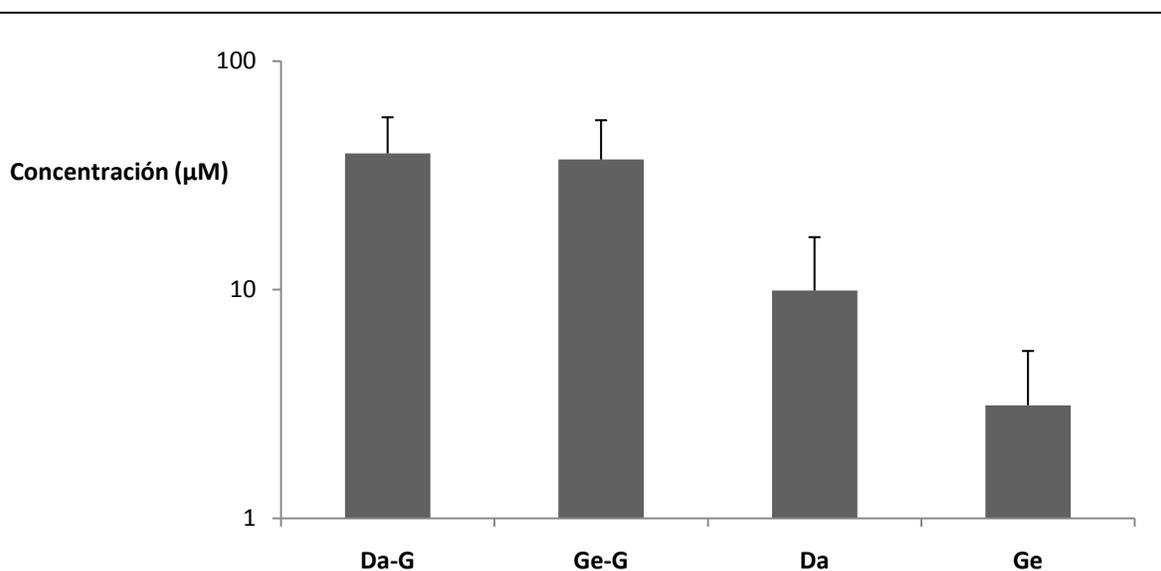


**Figura 16.** Cultivos fecales con las heces de las mujeres 1.1 o 14.3 en medio MCB<sub>ISO</sub> a las 24 y 48 h de la fermentación. **a)** Patrón del ARNr16S de la comunidad microbiana obtenido mediante DGGE. **b)** Producción de equol en el medio de fermentación determinada mediante UPLC

A partir de estos datos extraídos del análisis de las comunidades microbianas y de la biotransformación de isoflavonas hacia equol en los cultivos con *Slackia* spp. y en los cultivos con heces de mujeres productoras de equol se decidió reducir el tiempo de fermentación a 24 h.

### 4.3 Biodisponibilidad de isoflavonas en medio colónico bacteriano (MCB).

La determinación mediante UPLC de las isoflavonas en sus formas glicosiladas (daidzina: Da-G y genistina: Ge-G) o en sus formas agliconas (daidzeína: Da y genisteína: Ge) presentes en las muestras de MCB<sub>ISO</sub>, empleadas como control de la biotransformación de isoflavonas, permitió el análisis de la biodisponibilidad de las mismas para la acción microbiana en las fermentaciones (Figura 17). La biodisponibilidad de las isoflavonas en el medio está condicionada por la composición inicial de los comprimidos con los que se suplementó el medio MCB<sub>ISO</sub>, por la solubilidad de las isoflavonas y por las condiciones de agitación en las que se realizaron los experimentos.



**Figura 17.** Biodisponibilidad de isoflavonas en el medio MCB. Isoflavonas detectadas mediante UPLC en sus formas glicosiladas, daidzina (Da-G) y genistina (Ge-G) o en sus formas agliconas, daidzeína (Da) y genisteína (Ge).

De los datos obtenidos mediante UPLC de las isoflavonas presentes en el medio MCB<sub>ISO</sub>, se observó que, las isoflavonas mayoritarias disponibles para las transformaciones microbianas en los experimentos de fermentación, eran las que se encontraban en sus formas glicosiladas, en concentraciones de hasta 50 µM. Sin embargo, las formas agliconas, las más activas biológicamente, se encontraban cerca de 10 µM para la daidzina y de 5 µM para la genisteína. La principal explicación a esto se encuentra en la composición de los comprimidos utilizados como suplementos de isoflavonas del medio MCB. Los comprimidos a base de isoflavonas se elaboran a

partir de semillas de soja. Se sabe que en las semillas de leguminosas como la soja, las isoflavonas mayoritarias se encuentran en sus formas glicosiladas (Pastor y Perote, 2007). Otra explicación al hecho de que las formas glicosiladas sean las mayoritarias, una vez que se disuelven los comprimidos en el medio MCB, reside en su solubilidad en solventes polares. Todas las isoflavonas de soja son solubles en disolventes polares (Stancanelli *et al.*, 2007), pero el hecho de llevar unidas moléculas de glucosa, altamente polar, puede favorecer su disolución en un medio hidrofílico como el MCB.

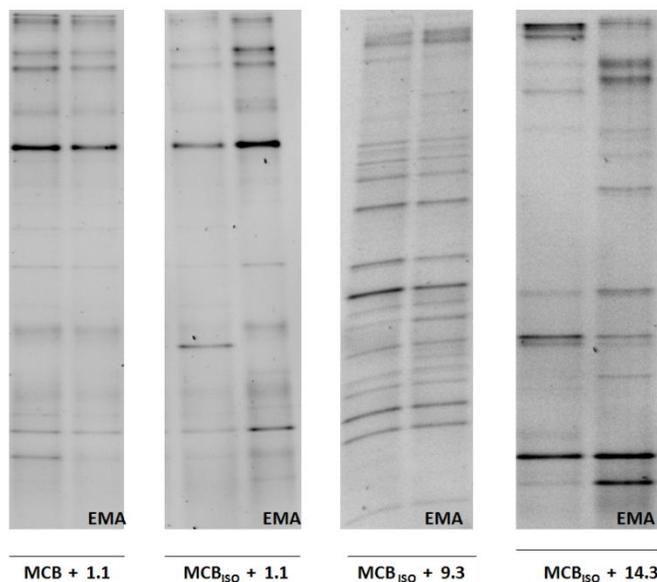
#### **4.4 Evaluación de la viabilidad celular bacteriana mediante tratamiento con monoazida de etidio (EMA).**

Como ya se comentó anteriormente, mediante la utilización del EMA se pudo discernir la alteración de las membrana, y posiblemente la muerte celular, de *S. equolifaciens* y *S. isoflavoniconvertens* en los cultivos de más de 24 h. A mayores, este compuesto también se utilizó en los cultivos fecales con comunidades microbianas complejas.

Los resultados obtenidos de la comparación de los patrones de microorganismos mayoritarios, generados mediante DGGE de las mismas muestras procedentes de los cultivos fecales, y sometidas o no a tratamiento con EMA con anterioridad a la extracción y amplificación del ADN microbiano, se muestran en la **Figura 18**. En algunas de las muestras, tras el tratamiento con EMA desaparecieron algunas bandas o perdieron parte de su intensidad, lo cual podría indicar que las bacterias con las que se correspondían esas bandas estaban entrando en la fase lítica de su ciclo de vida. Sin embargo, en otras ocasiones, también aparecieron nuevas bandas tenues o algunas de las bandas incrementaron su intensidad. En este caso, se planteó la hipótesis de que, cuando el EMA secuestra el ADN de las células con las membranas alteradas, los componentes de la reacción de PCR quedan más disponibles para la amplificación de otros grupos de microorganismos de menor representación en muestras complejas.

En el tratamiento con EMA, éste se utilizó a una concentración de 60  $\mu\text{M}$ . Esta concentración de EMA, aunque fue efectiva en los cultivos con las cepas del género *Slackia*, puede no ser suficiente para acomplejar todo el ADN de las células bacterianas muertas de una comunidad bacteriana compleja. Por eso, en los casos en los que se quiera discernir la viabilidad

celular por medio de utilización del EMA en cultivos fecales, debería reajustarse la concentración de tratamiento con este compuesto.



**Figura 18.** Comparación de los patrones de bandas de DGGE para el gen del ARNr16S entre las muestras procedentes de los cultivos en MCB o MCB<sub>ISO</sub> con las heces de las mujeres 1.1, 9.3 y 14.3 sometidas o no a tratamiento con EMA con anterioridad a la extracción del ADN de la comunidad microbiana total.

A consecuencia de estos primeros resultados que se obtuvieron del tratamiento con EMA se descartó su utilización en el resto del trabajo experimental, posponiendo para posteriores estudios reajustes en el protocolo acordes con la cantidad de ADN esperable conforme a la diversidad de las muestras.

#### 4.5 Cultivos con *Slackia* spp. y cultivos fecales en un modelo colónico experimental.

En este apartado se reflejan los resultados de los cultivos que se realizaron mediante fermentación discontinua de *S. equolifaciens* 24851 y/o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006, de heces de mujeres menopáusicas o de estos microorganismos y heces.

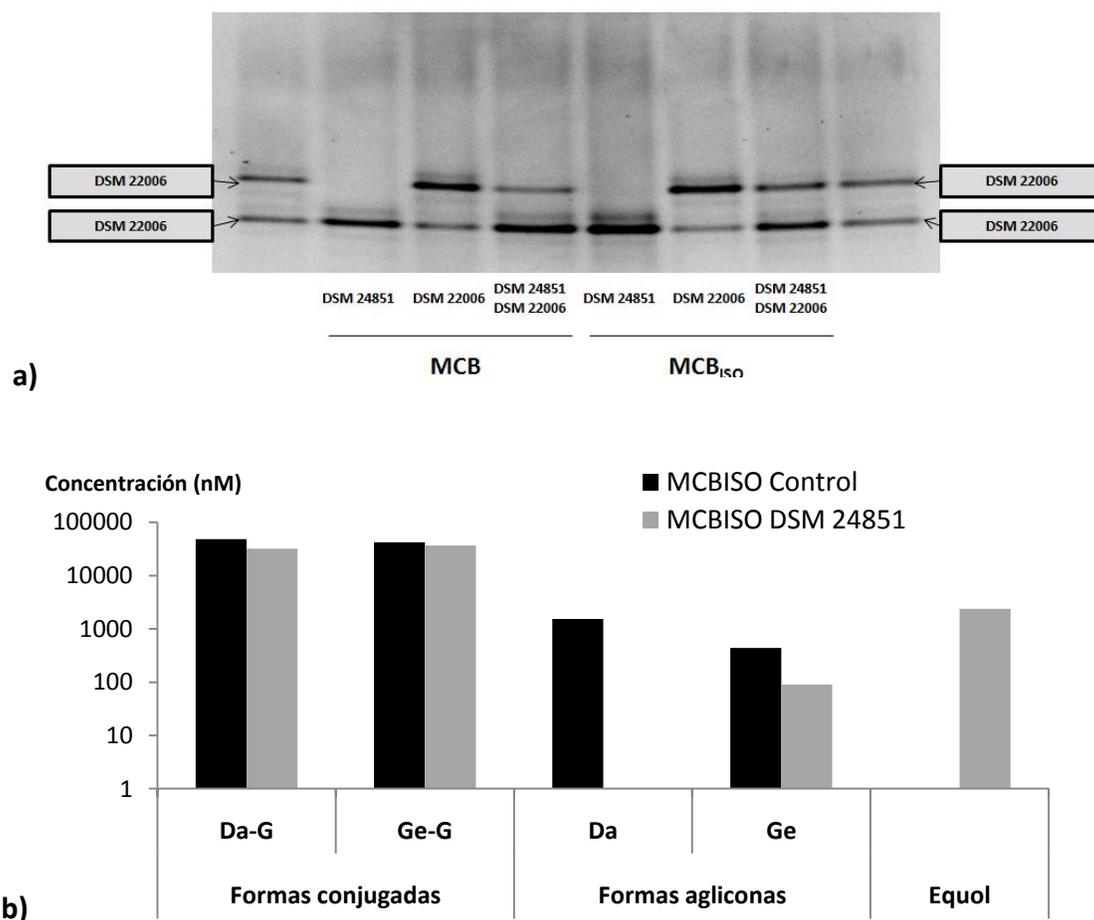
#### 4.5.1 Cultivos con *Slackia* spp.

Se sabe que existen ciertos microorganismos del género *Slackia*, aislados a partir de heces de mujeres, que son capaces de llevar a cabo transformaciones de las isoflavonas de soja para producir ciertos metabolitos de interés como el equol (Jin *et al.*, 2010; Matthies *et al.*, 2009). Sin embargo, no se había ensayado, por el momento, la biotransformación de isoflavonas en las formas en las que son ingeridas por las mujeres para el tratamiento de los síntomas de la menopausia en un modelo colónico capaz de simular las condiciones intestinales donde se producen dichas transformaciones en el organismo. Se desconoce también cuales son las condiciones en las que estos microorganismos son capaces de activar sus mecanismos enzimáticos para la transformación de isoflavonas. Por todo esto, se ensayaron cultivos de *S. equolifaciens* DSM 24851 y/o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 (inoculadas en el medio de fermentación en el orden de  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL) para probar si las cepas descritas en la bibliografía como productoras de equol eran capaces de crecer en el modelo colónico experimental diseñado para este trabajo y producir *in vitro* este metabolito.

Se analizaron los geles de DGGE del cultivo de cada cepa por separado y del cultivo mixto de ambas cepas en MCB o MCB<sub>ISO</sub> (**Figura 19 a**). Aparecieron bandas correspondientes a ambas cepas en las muestras del medio MCB y en las del mismo medio suplementado con isoflavonas (MCB<sub>ISO</sub>), tanto cuando se encontraban en cultivo puro como cuando se encontraban en cultivo mixto, indicando que ambos microorganismos eran capaces de crecer en el modelo experimental planteado en este trabajo.

Para evaluar la biotransformación de isoflavonas en los cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851, se analizaron mediante UPLC las principales isoflavonas de las muestras, en sus formas glicosiladas (Da-G y Ge-G) y en sus formas agliconas (Ge y Ge-G), y el metabolito con mayor bioactividad que se deriva de ellas, el equol (**Figura 19 b**). Comparando estos resultados con los datos de isoflavonas presentes en el medio antes de realizar los cultivos (MCB<sub>ISO</sub> Control), se determinó que *S. equolifaciens* DSM 24851 era capaz de transformar las isoflavonas, mayoritariamente en sus formas agliconas (Da y Ge), llegando incluso a agotar la Da, y consumiendo solo una pequeña proporción de las formas glicosiladas (Da-G y Ge-G). El hecho de que *S. equolifaciens* consuma mayoritariamente la daidzeína del medio y apenas muestre capacidad para deglicosilar las formas conjugadas de las isoflavonas concuerda con lo que hay

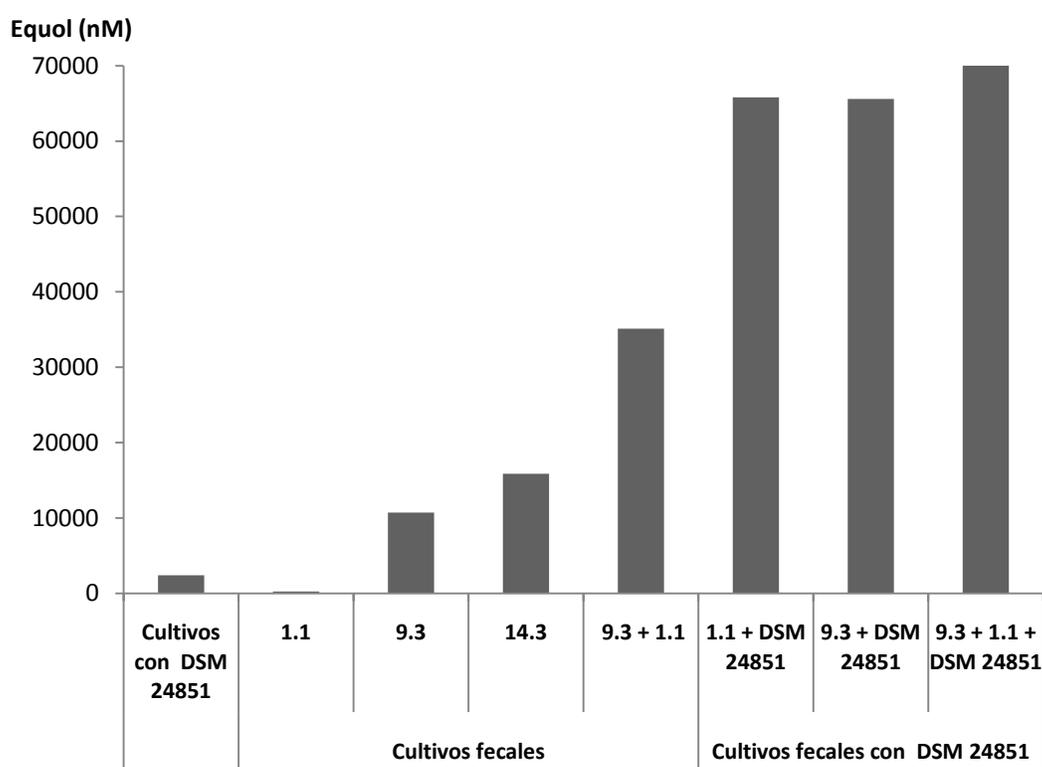
publicado hasta la fecha sobre el metabolismo que lleva a cabo esta cepa microbiana (Jin *et al.*, 2008). Así mismo, la producción de equol en el cultivo con esta cepa del género *Slackia* se produjo en concentraciones cercanas a 3.000 nM.



**Figura 19.** Cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851 y/o *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 en medio MCB y MCB<sub>ISO</sub>. **a)** Perfiles de gen del ARNr16S obtenidos mediante DGGE para cultivos puros o mixtos de ambas cepas de microorganismos. Marcadores de DGGE: *S. equolifaciens* DSM 24851 y *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006. **b)** Determinación mediante UPLC de isoflavonas, en sus formas glicosiladas, daidzina (Da-G) y genistina (Ge-G) o en sus formas agliconas daidzeína (Da) y genisteína (Ge), y el equol que se deriva de ellas en cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851 en MCB<sub>ISO</sub>.

#### 4.5.2 Cultivos fecales.

En esta parte se reflejan los resultados de los cultivos realizados con heces de mujeres menopáusicas y de los cultivos combinando heces y *S. equolifaciens* DSM 24851. El análisis mediante UPLC del equol formado en el medio MCB<sub>ISO</sub> de los cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851, de los cultivos con las heces de las mujeres 1.1, 9.3 y 14.3 y de los cultivos con la combinación de las heces de las mujeres 1.1 y 9.3 con *S. equolifaciens* DSM 24851 se refleja en la **Figura 20**.



**Figura 20.** Determinación de equol mediante UPLC en medio MCB<sub>ISO</sub> en diferentes muestras procedentes de cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851, de cultivos con las heces de las mujeres 1.1, 9.3 y 14.3 y de cultivos con las heces de las mujeres 1.1 y/o 9.3 en combinación con *S. equolifaciens* DSM 24851.

Los cultivos fecales mostraron una gran variabilidad en la producción de equol en función de la mujer de procedencia de las heces con las que se llevaron a cabo. Los cultivos fecales de la mujer 1.1 produjeron equol en concentraciones inferiores a los 100 nM, mientras que los cultivos

fecales de la mujer 9.3 y de la mujer 14.3 produjeron equol en niveles superiores, de 10.000 nM y 15.000 nM, respectivamente. Estos datos abalan la hipótesis de la enorme variabilidad interindividual existente en la microbiota intestinal que responde produciendo equol tras un tratamiento continuado con isoflavonas de soja (Clavel y Mapesa, 2013).

A la vista de estos resultados se decidieron combinar en el mismo cultivo fecal las heces de las mujeres 1.1 (baja productora de equol) y 9.3 (alta productora de equol) para tratar de ver cambios en la biotransformación de isoflavonas y en la producción de equol por la combinación de la microbiota intestinal desarrollada en MCB<sub>ISO</sub> a partir de las heces de dos mujeres diferentes. En estos co-cultivos, la producción de equol se triplicó con respecto a los niveles del cultivo fecal de la mujer 9.3 llegando hasta una concentración de 35.000 nM. Esto implicaba que la microbiota intestinal desarrollada a partir de la combinación de las heces de dos mujeres era capaz de llevar a cabo de manera más eficiente la bioconversión de isoflavonas, hacia la producción de equol, y que dicha transformación de isoflavonas aumentaba en presencia de diferentes microorganismos que, en su conjunto, aportaran distintas actividades catalíticas de las rutas.

A mayores, se ensayaron cultivos con las heces de la mujer 1.1 o de la mujer 9.3 en combinación con *S. equolifaciens* DSM 24851. En ambos casos la producción de equol se incrementó exponencialmente con respecto a lo producido por los cultivos de *S. equolifaciens* DSM 24851 o por los cultivos con las heces de las mujeres 1.1 y 9.3 (por separado o en conjunto), llegando a concentraciones de 65.000 nM. En este caso, los cultivos combinados de heces de la mujer 1.1 (baja productora de equol) con *S. equolifaciens* obtuvieron unos niveles elevados de producción de equol, lo que implicaba que en las heces de la mujer 1.1 hay microorganismos capaces de llevar a cabo las transformaciones de las isoflavonas, pero se necesitan microorganismos como estas cepas del género *Slackia*, para que se desencadenen eficientemente los últimos pasos de las rutas que conducen a la liberación de equol. Todo esto hacía pensar que, cuando la microbiota presente en las heces complementaba su acción degradativa con microorganismos como *S. equolifaciens*, aumentaba la eficiencia en la biotransformación de isoflavonas hacia metabolitos con propiedades fitoestrogénicas, como el equol.

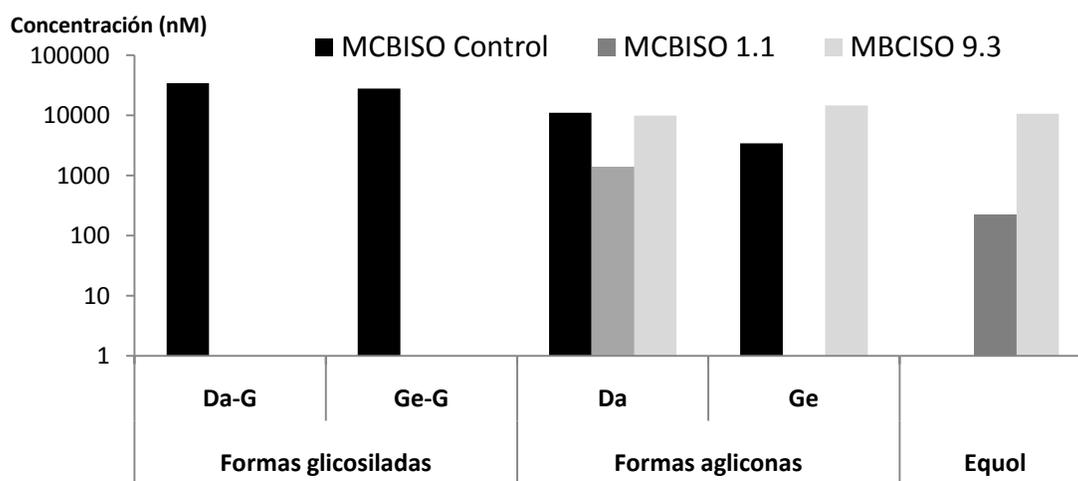
Por último, cuando se combinaron en un único cultivo las heces de la mujer 1.1, las heces de la mujer 9.3 y *S. equolifaciens* DSM 24851 el equol producido se disparó hasta los 70.000 nM,

constatándose la idea del efecto sinérgico producido por la combinación de un grupo diverso de microorganismos intestinales con diferente origen.

Estos resultados podrían explicar por qué la mayor parte de la población occidental, y en especial las mujeres que tratan los síntomas de la menopausia con isoflavonas, no pueden beneficiarse del consumo de las mismas (Clavel y Mapesa, 2013). Aunque en el intestino de estas mujeres estén presentes algunos de los microorganismos que llevan a cabo las transformaciones iniciales de las isoflavonas, sería necesario que continuase la transformación de las mismas, hacia la producción de equol, y que este se produjera en concentraciones relevantes a nivel fisiológico. Esto vendría condicionado por la existencia de una microbiota intestinal diversa con todas las actividades catalíticas de las rutas de biotransformación de isoflavonas que conducen a la aparición de equol (Sánchez-Calvo *et al.*, 2013). Si bien los microorganismos capaces de llevar a cabo los primeros pasos de la ruta de biodegradación de isoflavonas, los que suponen la liberación de las formas agliconas, son más comunes en el TGI, se estima que solo entre el 30 y el 50 % de la población posee los microorganismos capaces de liberar equol, preferentemente a partir de la isoflavona daidzeína (Stetchell *et al.*, 2002; Atkinson *et al.*, 2005).

El análisis mediante UPLC de las isoflavonas, en sus formas glicosiladas o agliconas, y del metabolito equol en los cultivos fecales con las heces de las mujeres 1.1 y 9.3 en medio MCB<sub>ISO</sub> se muestra en la **Figura 21**. En ambos cultivos fecales, y a diferencia de lo observado con los cultivos con las cepas del género *Slackia*, se produjo un consumo completo de las formas glicosiladas de las isoflavonas (Da-G y Ge-G), implicando que se desarrollaban microorganismos capaces de desconjugar los glucósidos de las isoflavonas. Con respecto a las formas agliconas de las isoflavonas, los cultivos fecales de la mujer 1.1 consumían por completo la genisteína (Ge) y parte de la daidzeína (Da). En el caso de la mujer 9.3, las formas agliconas (Ge y Da) aparecieron en cantidades similares a las presentes en el control del medio de fermentación (MCB<sub>ISO</sub> Control). Dado que la producción de equol fue mayor en los cultivos con las heces de la mujer 9.3 (10.000 nM) en comparación con los de la mujer 1.1 (100 nM), se trató de buscar una explicación al consumo diferencial de las formas agliconas del medio. En los cultivos de la mujer 1.1, las formas agliconas (que son las que estaban presentes en el medio antes de la fermentación más las liberadas a partir de las actividades  $\beta$ -glucosidasas de los microorganismos de la microbiota intestinal) se consumían por completo y probablemente se derivaban en su mayoría hacia la vía de producción de O-DMA, un metabolito derivado de las isoflavonas sin potencial fitoestrogénico

(Sánchez-Calvo *et al.*, 2013), que no fue objeto de determinación mediante UPLC en este trabajo, pero que podría detectarse en posteriores estudios para constatar esta hipótesis. En el caso de los cultivos con las heces de la mujer 9.3 se producía mayoritariamente equol, el metabolito biológicamente activo, a partir de las formas agliconas de las isoflavonas. En este caso, las formas agliconas que se acumularon durante el transcurso de la fermentación no se consumieron por completo, de ahí que sus niveles fuesen equiparables a los del control del medio (MCB<sub>ISO</sub> Control). De esta forma, en los cultivos con las heces de la mujer 1.1 el consumo de las isoflavonas se explicó por su biotransformación mayoritaria hacia *O*-DMA y en menor medida hacia equol, y en los cultivos de la mujer 9.3 hacia la producción de equol.



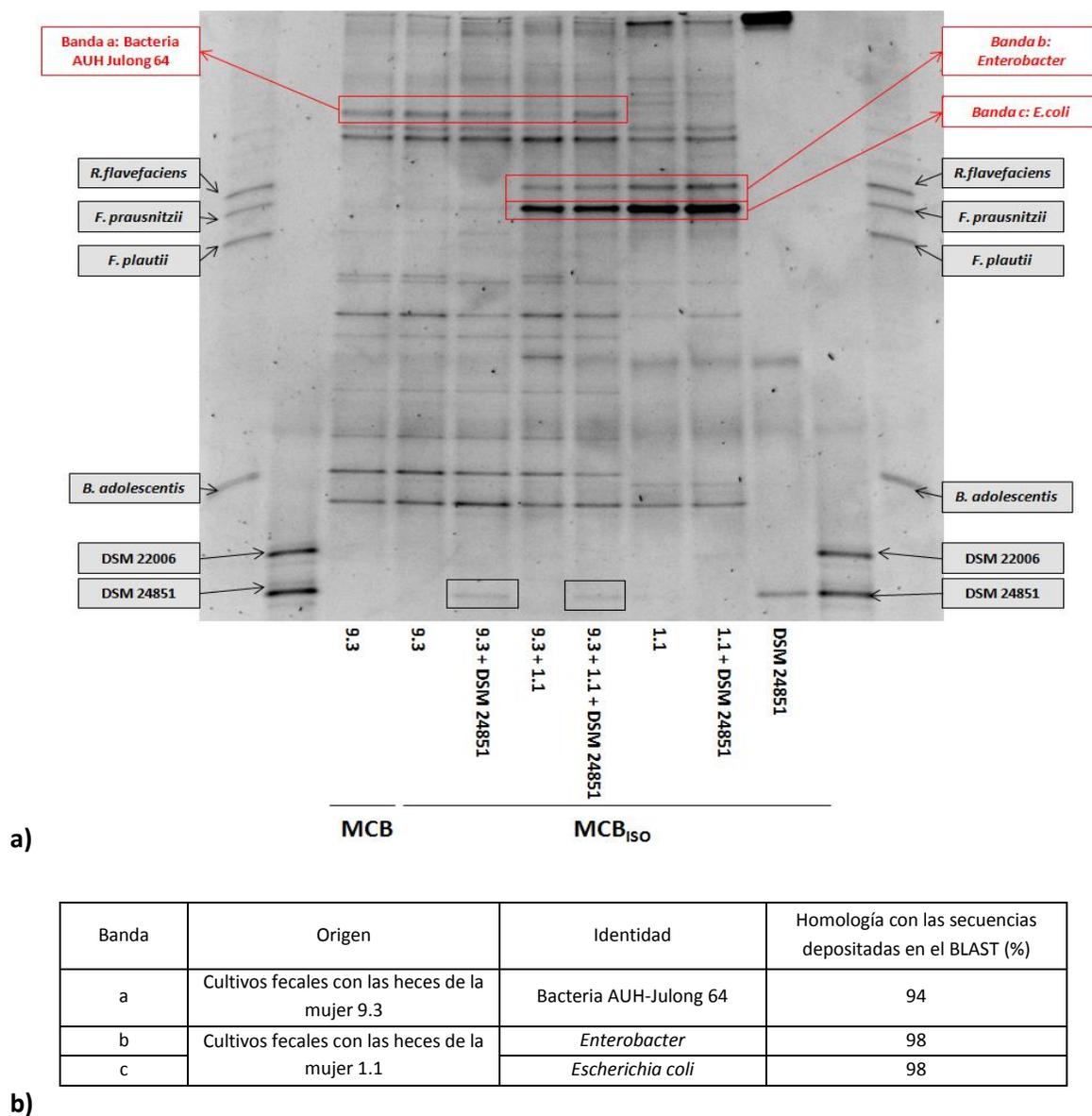
**Figura 21.** Determinación mediante UPLC de isoflavonas en sus formas glicosiladas, daidzina (Da-G) y genistina (Ge-G) o en sus formas libres, daidzeína (Da) y genisteína (Ge), y el equol que se deriva de ellas en cultivos fecales en MCB<sub>ISO</sub> con las heces de la mujer 1.1 y las heces de la mujer 9.3.

Los datos de consumo de isoflavonas por parte de los cultivos fecales contrastan con los datos de consumo en los cultivos con *Slackia* spp., reflejados en el anterior apartado. Mientras que en los cultivos con *S. equolifaciens* DSM 24851 había un consumo preferencial de las formas agliconas de las isoflavonas, principalmente la daidzeína, los microorganismos de los cultivos fecales consumían preferentemente las formas conjugadas de las isoflavonas. Esto sería un fiel reflejo de las actividades catalíticas que están codificadas por el genoma de cada uno de estos microorganismos. Las cepas del género *Slackia* poseerían actividades que conducen al equol,

mientras que la microbiota fecal de las mujeres del estudio codificaría, mayoritariamente para actividades desconjugativas de isoflavonas, y, en baja medida, para actividades que liberan equol.

En el transcurso de estos cultivos también se analizó mediante DGGE el perfil de las comunidades microbianas mayoritarias (**Figura 22**). No se apreciaron diferencias entre los microorganismos mayoritarios desarrollados a partir de los cultivos con las heces de la mujer 9.3 en medio con y sin isoflavonas (MCB<sub>ISO</sub> y MCB). Sin embargo, los co-cultivos con heces de diferentes mujeres mostraron un patrón de microorganismos mayoritarios diferente. Cuando se combinaban las heces de ambas mujeres (1.1 y 9.3) en un único cultivo, el perfil microbiano pasaba a ser una combinación del perfil de cada una por separado. Por su parte, cuando se incorporaba *S. equolifaciens* DSM 24851 a los cultivos fecales, la banda correspondiente a este microorganismo aparecía pero de manera muy poco intensa. Esto estaba indicando que el crecimiento de esta cepa, inoculada en el orden de  $10^6$  a  $10^7$  ufc/mL, podía verse sobrepasado por otros microorganismos presentes en las heces con mayor capacidad de crecimiento. De esta manera, *S. equolifaciens* DSM 24851 no se desarrollaba lo suficiente como para formar parte de la microbiota mayoritaria representada en los perfiles de DGGE de los cultivos fecales, pues debía competir con la comunidad microbiana de las heces de las mujeres del estudio presentes en concentraciones de entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  ufc/mL. Sin embargo, aunque *S. equolifaciens* no apareciera de forma tan notable en los perfiles de DGGE, su papel en las transformaciones de las isoflavonas hacia equol en los cultivos planteados en este trabajo fue clave, como se mostró anteriormente.

Algunas de las bandas características de los perfiles de DGGE de los cultivos fecales con las heces de las mujeres 1.1 y 9.3 se identificaron mediante escisión, reamplificación y secuenciación. Tras el análisis de las secuencias del ARNr16S y a través de la comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos BLAST y RDP, se identificaron en los cultivos con las heces de la mujer 1.1 (baja productora de equol) dos microorganismos característicos del TGI humano. Uno de estos microorganismos se identificó a nivel de especie, *Escherichia coli* (98 % de homología con las secuencias de las bases de datos) y otro a nivel de género, *Enterobacter* (98 % de homología con las secuencias depositadas en las bases de datos). Por su parte, en los cultivos con las heces de la mujer 9.3 (alta productora de equol), se encontró una banda amplificada con una homología del 94 % con la bacteria AUH-Julong64 aislada a partir de heces humanas y caracterizada como productora de dihidrodaidzeína (Wang *et al.*, 2005), un intermediario de la ruta de biotransformación de daidzeína (Sánchez-Calvo *et al.*, 2013).



**Figura 22.** Perfiles de DGGE de diferentes cultivos en MCB<sub>ISO</sub> con *Slackia* spp. y/o con heces de mujeres productoras de equol e identificación de algunas bandas representativas. **a)** DGGE del ADNr16S de diferentes muestras procedentes de los cultivos en MCB o MCB<sub>ISO</sub> de *S. equolifaciens* DSM 24851, de cultivos individuales o mezclados de las heces de las mujeres 1.1 y 9.3, y de cultivos fecales combinando heces de las mujeres 1.1 y 9.3 con *S. equolifaciens* DSM 24851. Marcadores de DGGE: *Ruminococcus flavefaciens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Flavonifractor plautii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *S. isoflavoniconvertens* DSM 22006 y *S. equolifaciens* DSM 24851. **b)** Bandas secuenciadas e identificadas con ayuda del BLAST y del RDP en los cultivos con las heces de la mujer 9.3 (banda a: 94 % de identidad con la bacteria AUH-Julong 64) y en los cultivos con las heces de la mujer 1.1 (banda b: 98% de identidad con *Enterobacter* y banda c: 98 % de identidad con *Escherichia coli*).

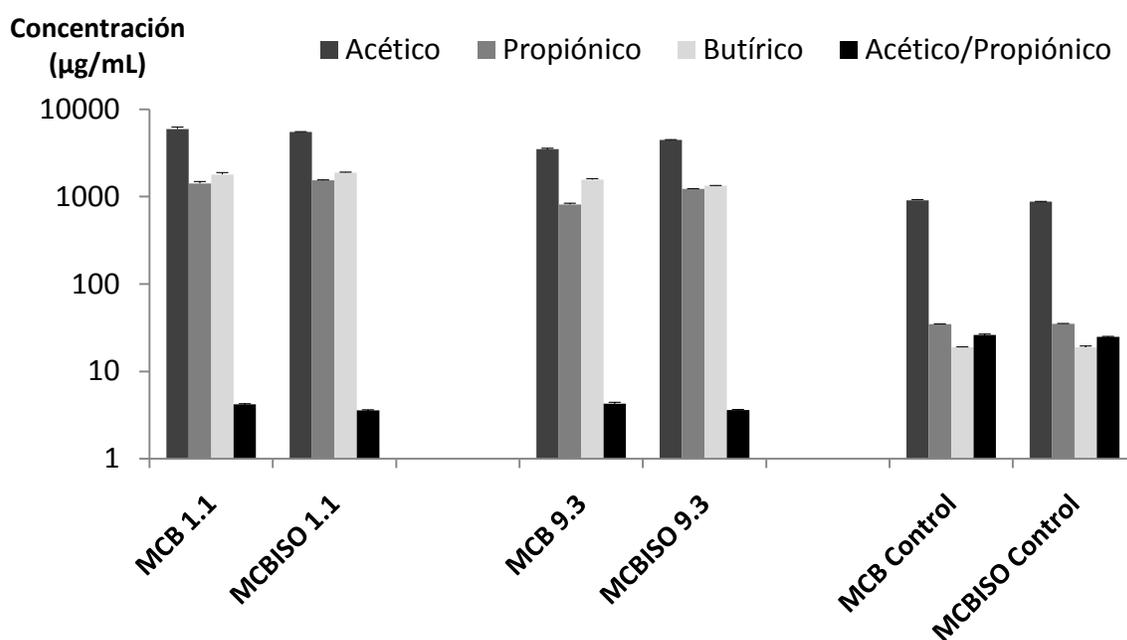
#### 4.6 Determinación de SCFAs.

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs por sus siglas en inglés), constituyen la principal fuente de energía de los enterocitos, por lo que son metabolitos claves para el TGI. En la actualidad poco se sabe sobre la relación existente entre la bioconversión de las isoflavonas y la producción de SCFAs en TGI por la microbiota que lo habita. Lo que sí se sabe es que la producción de SCFAs en el colon se produce a partir de la fermentación de los carbohidratos de la dieta mediante la intervención de ciertos grupos de microorganismos en determinadas condiciones (Neish, 2009). Así mismo, se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles, como los de las uvas o el vino, puede estimular la liberación de SCFAs en el colon (van Dorsten *et al.*, 2012).

La determinación de SCFAs en el transcurso de los cultivos fecales se utilizó con la finalidad de analizar el metabolismo microbiano de los carbohidratos del medio en relación con el metabolismo de las isoflavonas. El medio en el que se llevaron a cabo las fermentaciones, MCB<sub>ISO</sub>, está compuesto por un 0.2 % de glucosa, sin embargo una fuente adicional de glucosa es la presente en forma de glucosa en las formas glicosiladas de las isoflavonas con las que se suplementó dicho medio. Se determinaron por CG el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido butírico, el ácido isobutírico, el ácido valérico, el ácido isovarérico y el ácido caproico en los cultivos en MCB o en MCB<sub>ISO</sub> con heces de las mujeres 1.1 y 9.3. La intencionalidad de este análisis fue la evaluación de las diferencias de metabolismo de carbohidratos en presencia y ausencia de isoflavonas.

Los resultados de la determinación mediante CG de los SCFAs producidos mayoritariamente en dichos cultivos (ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico) y la relación entre dos de los SCFAs más abundantes (el ácido acético y el ácido propiónico), en comparación con los controles de ambos medios, se reflejan en la **Figura 23**. No se observaron diferencias al comparar los resultados del catabolismo de carbohidratos entre los cultivos fecales llevados a cabo en medio con y sin isoflavonas (MCB<sub>ISO</sub> y MCB). Así mismo, los perfiles de los SCFAs mayoritarios fueron semejantes entre los cultivos con las heces de la mujer 1.1 (baja productora de equol) y los cultivos con las heces de la mujer 9.3, (alta productora de equol) entre los que si se había observado un metabolismo diferencial de isoflavonas. Si bien, los perfiles de los SCFAs minoritarios mostraron mayores variaciones entre los cultivos fecales de ambas mujeres. En general, durante las fermentaciones llevadas a cabo por los microorganismos que se desarrollaron

en los cultivos fecales, se producía un aumento considerable del ácido acético (pasando desde 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los controles a 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los cultivos fecales), del ácido propiónico (pasando desde 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los controles a 1400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los cultivos fecales) y del ácido butírico (pasando desde 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los controles hasta 1600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los cultivos fecales). Por su parte, la relación entre el ácido acético y el ácido propiónico se redujo desde un valor de 26 en los controles hasta 4 en los cultivos fecales, indicando un aumento notable en la producción de ácido propiónico con respecto al ácido acético.



**Figura 23.** Concentración (en ppm o  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los principales SCFAs (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico) y la relación ácido acético/ácido propiónico determinados mediante CG en los cultivos de heces de las mujeres 1.1 y 9.3 en MCB o MCB<sub>ISO</sub> así como en los controles de dichos medios realizados antes de las fermentaciones.

Al no observarse diferencias entre los perfiles de SCFAs del medio con y sin isoflavonas, el análisis de estos datos no sirvió como una medición indirecta de las transformaciones microbianas de las isoflavonas en el medio colónico planteado en este trabajo. Estos datos de producción de SCFAs en los cultivos fecales de heces menopáusicas productoras de equol tras un consumo continuado de isoflavonas de soja comerciales, son todavía preliminares y deben ser considerados en el futuro con posteriores ensayos y abordajes experimentales.

## 5. CONCLUSIONES

---

## 5. CONCLUSIONES.

A continuación se enumeran las principales conclusiones que se obtuvieron de este estudio.

1. Tras ensayar distintas condiciones experimentales para las incubaciones de heces con isoflavonas de soja, se seleccionaron como más adecuadas tiempos de fermentación de 24 h y condiciones de agitación del medio.
2. El tratamiento de las muestras con EMA, previamente a la extracción de ADN, fue útil para discernir entre células de *Slackia* intactas de aquellas con membranas alteradas. Sin embargo, estos tratamientos fueron poco útiles para analizar las comunidades microbianas que se desarrollaron en las fermentaciones de heces con isoflavonas, posiblemente debido a la complejidad de las mismas.
3. *Slackia equolifaciens* DSM 24851 y *Slackia isoflavoniconvertens* DSM 22006 fueron capaces de crecer y de llevar a cabo la biotransformación de las isoflavonas de soja hasta producir equol, en el modelo colónico experimental diseñado.
4. La microbiota fecal de mujeres menopáusicas productoras de equol, fue capaz de desarrollarse y de llevar a cabo la biotransformación de las isoflavonas de soja hacia la producción de equol en el modelo colónico experimental diseñado. Los niveles de este metabolito se incrementaron en las incubaciones en que se combinaron heces de varias mujeres. El aumento en la diversidad de los microorganismos presentes podría potenciar las rutas catalíticas de conversión de estos compuestos.
5. La combinación de las cepas del género *Slackia* y de las heces de una o varias mujeres productoras de equol supuso también un incremento notable en las tasas de producción de equol. Este efecto sinérgico podría indicar que para asegurar la biodisponibilidad y efectividad de las isoflavonas se necesitan consorcios microbianos más que cepas únicas de microorganismos.

6. El análisis de los ácidos grasos de cadena corta no permitió correlacionar el metabolismo de los carbohidratos con la biotransformación de isoflavonas, pues no se observaron diferencias en los ácidos grasos de cadena corta mayoritarios entre las fermentaciones realizadas en medio con y sin isoflavonas.

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>ACOG</b>	<i>American College of Obstetricians and Gynecologist</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEEM</b>	Asociación Española para el Estudio de la Menopausia
<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr16S</b>	ARN ribosomal del componente con coeficiente de sedimentación 16S de la subunidad pequeña de los ribosomas procariotas
<b>BAL</b>	Bacterias del ácido láctico
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alingment Search Tool</i>
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>cm</b>	Centímetro/s
<b>Da</b>	Daidzeína
<b>Da-G</b>	Daidzina
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante
<b>DSMZ</b>	Colección de cultivos tipo alemana
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EMA</b>	Monoazida de etidio
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Receptor estrogénico de tipo $\alpha$
<b>ER<math>\beta</math></b>	Receptor estrogénico de tipo $\beta$
<b>ERs</b>	Receptores estrogénicos
<b>FID</b>	Detector por ionización en llama
<b>FLR</b>	Detector de fluorescencia
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>g</b>	Gramos/s
<b>G+C</b>	Desoxirribonucleótidos guanina y citosina
<b>GAM</b>	<i>Gifu Anaerobic Medium</i>

<b>Ge</b>	Genisteína
<b>Ge-G</b>	Genistina
<b>h</b>	Hora/s
<b>4-HBPH</b>	4-hidroxibenzofenona
<b>HERS</b>	<i>The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study</i>
<b>IMS</b>	<i>International Menopause Society</i>
<b>IPLA-CSIC</b>	Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>L</b>	Litro/s
<b>MCB</b>	Medio Colónico Bacteriano
<b>MCB<sub>ISO</sub></b>	Medio Colónico Bacteriano suplementado con isoflavonas
<b>min</b>	Minuto/s
<b>mg</b>	Miligramo/s
<b>mL</b>	Mililitro/s
<b>mm</b>	Milímetro/s
<b>M</b>	Molar (moles/L)
<b>mM</b>	Milimolar (milimoles/L)
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b>nM</b>	Nanomolar (nanomoles/L)
<b>µg</b>	Microgramo/s
<b>µL</b>	Microlitro/s
<b>µM</b>	Micromolar (micromoles/L)
<b>O-DMA</b>	O-desmetilangolensina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDA</b>	<i>Photodiode array</i>
<b>PMA</b>	Monoazida de propidio
<b>psi</b>	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno

<b>RDP</b>	<i>Ribosomal Database Project</i>
<b>RNasaA</b>	Ribonucleasa A
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundo/s
<b>spp.</b>	Especies
<b>S</b>	Unidades Svedberg
<b>SCFAs</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>SI</b>	Estándar interno
<b>SULT</b>	Sulfotransferasa
<b>TAE</b>	Tris acetato EDTA
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenediamina
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>THS</b>	Terapia Hormonal Sustitutiva
<b>UDP</b>	Uracilodifofato
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>UGT</b>	Glucuronosiltransferasa UDP
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de alto rendimiento
<b>V</b>	Voltio/s
<b>V2-V3</b>	Regiones variables 2 y 3 del ARNr16S
<b>W</b>	Watio/s
<b>WHI</b>	<i>Women's Health Initiative</i>

## REFERENCIAS

- Adlercreutz, H., Hamalainen, E., Gorbach, S. y Goldin, B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. *Lancet* 339, 1233 (1992).
- Almstrup, K., Fernandez, M.F., Petersen, J.H., Olea, N., Skakkebaek, N.E. y Leffers, H. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environ. Health Perspect.* 110, 743-748 (2002).
- Al-Safi, Z. A. y Santoro, N. Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. *Fertil. Steril.* 101, 905-915 (2014).
- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. y Cook-Newell, M. E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* 333, 276-282 (1995).
- Arjmandi, B. H. Alekel, L., Hollis, B.W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P. y Kukreja, S.C. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr.* 126, 161-167 (1996).
- Atkinson, C., Berman, S., Humbert, O. y Lampe, J. W. In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *J. Nutr.* 134, 596-599 (2004).
- Atkinson, C., Frankenfeld, C. L. y Lampe, J. W. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 230, 155-170 (2005).
- Axelsson, M. y Setchell, K. D. The excretion of lignans in rats -- evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. *FEBS Lett.* 123, 337-342 (1981).
- Barnes, Prasain, J., D'Alessandro, T., Arabshahi, A., Botting, N., Lila, M.A., Jackson, G., Janle, E.M. y Weaver, C.M. The metabolism and analysis of isoflavones and other dietary polyphenols in foods and biological systems. *Food Funct.* 2, 235-244 (2011).
- Beer, A. M. Phytotherapy in menopausal symptoms. *MMW Fortschr. Med.* 156, 40-41 (2014).
- Bennetts, H. W., Underwood, E. J. y Shier, F. L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Br. Vet. J.* 102, 348-352 (1946).
- Blair, R. M., Appt, S. E., Franke, A. A. y Clarkson, T. B. Treatment with antibiotics reduces plasma equol concentration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Nutr.* 133, 2262-2267 (2003).
- Carter, M. W., Matrone, G. y Smart, W. W., Jr. Effect of genistin on reproduction of the mouse. *J. Nutr.* 55, 639-645 (1955).
- Champagne, C. P., Tompkins, T. A., Buckley, N. D. y Green-Johnson, J. M. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol.* 27, 968-972 (2010).
- Chandrasekharan S. y Aglin A. Pharmacokinetics of Dietary Isoflavones. *J Steroids Hormon Sci* S12: 004(2013).
- Clavel, T. y Mapesa, J.O. Isoflavones and functional foods alter the dominant intestinal microbiota in postmenopausal women. *J. Nutr.* 135, 2786-2792 (2005).
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. y Knight, R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258-1270 (2012).
- D'Archivio M., Filesi, C., Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. y Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita* 43, 48-361 (2007).

- Decroos, K., Vanhemmens, S., Cattoir, S., Boon, N. y Verstraete, W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch. Microbiol.* 183, 45-55 (2005).
- Falony, G., Vlachou, A., Verbrugghe, K. y De Vuyst, L. Cross-feeding between *Bifidobacterium longum* BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7835-7841 (2006).
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. y Vigi, V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr. Suppl.* 91, 48-55 (2003).
- Geller S.E., y Studee Laura. Botanical Supplements for Menopausal Symptoms: What Works, What Doesn't. *J. Womens Health.* 14(7): 434-649. (2005).
- Grady, D., Applegate, W., Bush, T., Furberg, C., Riggs, B y Hulley, S.B. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control. Clin. Trials* 19, 314-335 (1998).
- Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., Hsia, J., Hulley, S., Herd, A., Khan, S., Newby, L.K., Waters, D., Vittinghoff, E., Wenger, N. y HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 288, 49-57 (2002).
- Halm, B. M., Franke, A. A., Ashburn, L. A., Hebshi, S. M. y Wilkens, L. R. Oral antibiotics decrease urinary isoflavonoid excretion in children after soy consumption. *Nutr. Cancer* 60, 14-22 (2008).
- Izumi, T. Piskula, M.K, Osawa, S., Obata, A.; Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. y Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* 130, 1695-1699 (2000).
- Jin, J. S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hattori, M. & Benno, Y. *Slackia equolifaciens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of producing equol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1721-1724 (2010).
- Jin, J. S., Nishihata, T., Kakiuchi, N. y Hattori, M. Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 1621-1625 (2008).
- Kronenberg, F., Melby, M. K., Messina, M., Kurzer, M. S. & Utian, W. H. Amato, et al concluded that "soy isoflavone supplementation offers no benefit to quality of life in postmenopausal women". *Menopause* 20, 588-589 (2013).
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. y Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5925-5930 (1996).
- Ley, R. E. Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R, Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R. y Gordon, J.I.. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320, 1647-1651 (2008).
- Maruo, T., Sakamoto, M., Ito, C., Toda, T. & Benno, Y. *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eggerthella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1221-1227 (2008).
- Matthies, A., Blaut, M. & Braune, A. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1740-1744 (2009).
- Messina, M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J. Nutr.* 140, 1350S-4S (2010).
- Messina, M. The safety and benefits of soybean isoflavones. A natural alternative to conventional hormone therapy? *Menopause* 14, 958; author reply 958-9 (2007).
- Messina, M., Nagata, C. y Wu, A. H. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. *Nutr. Cancer* 55, 1-12 (2006).

- Muyzer G. Ellen C. de Wall y Andre G.U. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiolog.* 695-700 (2006).
- Neish, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136, 65-80 (2009).
- Nocker, A., Cheung, C.Y. y Camper, A.K.. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods*, 67(2), pp. 310-320 (2006).
- O'Hara, A. M. y Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7, 688-693 (2006).
- Pan, M. H., Lai, C. S. y Ho, C. T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 1, 15-31 (2010).
- Pastor, V. y Perote, A. La Soja y la Salud. *Edimsa* (2007).
- Peñalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chem* 87:297–305 (2004).
- Pilsakova, L., Rieckansky, I. y Jagla, F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol. Res.* 59, 651-664 (2010).
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B.; Liang, H.; Zheng, H.; Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N.; Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S. D. y Wang, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65 (2010).
- Rekha, C. R. y Vijayalakshmi, G. Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1198-1208 (2010).
- Rossouw JE1, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-333 (2002).
- Rotimi, V. O. y Duerden, B. I. The development of the bacterial flora in normal neonates. *J. Med. Microbiol.* 14, 51-62 (1981).
- Rowland, I. R., Wiseman, H., Sanders, T. A., Adlercreutz, H. y Bowey, E. A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr. Cancer* 36, 27-32 (2000).
- Sánchez-Calvo J.M., Rodríguez-Iglesias M.A., Molinillo J. M. G. y Macías F. A.. Soy isoflavones and their relationship with microflora: beneficial effects on human health in equol producers. *Phytochemistry Reviews.* 12, 4 970-1000 (2013).
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M. y Finlay, B.B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90, 859–904 (2010).
- Setchell, K. D., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N. y Axelson, M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 569-578 (1984).
- Setchell, K. D., Brown, N. M. y Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* 132, 3577-3584 (2002).

- Setchell, K. D., Brzezinski, A., Brown, N.M., Desai, P.B., Melhem, M., Meredith, T., Zimmer-Nechimias, L., Wolfe, B., Cohen, Y. y Blatt, Y. Pharmacokinetics of a slow-release formulation of soybean isoflavones in healthy postmenopausal women. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1938-1944 (2005).
- Setchell, K. D. y Clerici, C. Equol: history, chemistry, and formation. *J. Nutr.* 140, 1355S-62S (2010).
- Setchell, K. D. y Clerici, C. Equol: pharmacokinetics and biological actions. *J. Nutr.* 140, 1363S-8S (2010).
- Setchell, K. D., Clerici, C., Lephart, E.D., Cole, S.J., Heenan, C., Castellani, D., Wolfe, B.E., Nechemias-Zimmer, L., Brown, N.M., Lund, T.D., Handa, R.J. y Heubi, J.E. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 1072-1079 (2005).
- Stancanelli, R., Mazzaglia, A., Tommasini, S., Calabro, M.L., Villari, V., Guardo, M., Ficarra, P. y Ficarra, R. The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: a spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 980-984 (2007).
- Tsangalis, D. Ashton, J. F., McGill, A. E. J., y Shah, N. P. Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soy milk by beta-glucosidase producing bifidobacteria. *J. Food. Sci.* 67: 3104-3113 (2002)
- Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231-1246 (2010).
- Tsuji, H., Moriyama, K., Nomoto, K., Miyanaga, N. y Akaza, H. Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS. *Arch. Microbiol.* 192, 279-287 (2010).
- Turnbaugh, P. J. y Gordon, J. I. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J. Physiol.* 587, 4153-4158 (2009).
- Valladares, L., Garrido, A. y Sierralta, W. Soy isoflavones and human health: breast cancer and puberty timing. *Rev. Med. Chil.* 140, 512-516 (2012).
- van Dorsten, F.A., Peters, S., Gross, G., Gomez-Roldan, V., Klinkenberg, M., de Vos, R.C., Vaughan, E.E., van Duynhoven, J.P., Possemiers, S., van de Wiele, T. y Jacobs, D.M. Gut microbial metabolism of polyphenols from black tea and red wine/grape juice is source-specific and colon-region dependent. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11331-11342 (2012).
- van Duynhoven, J., Vaughan, E.E., Jacobs, D.M., Kemperman, R.A., van Velzen, E.J., Gross, G., Roger, L.C., Possemiers, S., Smilde, A.K., Dore, J. y Westerhuis, J.A., Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4531-4538 (2011).
- Wade, W., G. Downes, J., Dymock, D., Hiom, S.J., Weightman, A.J., Dewhurst, F.E., Paster, B.J., Tzellas, N. y Coleman, B.. The family Coriobacteriaceae: reclassification of *Eubacterium exiguum* (Poco et al. 1996) and *Peptostreptococcus heliotrinireducens* (Lanigan 1976) as *Slackia exigua* gen. nov., comb. nov. and *Slackia heliotrinireducens* gen. nov., comb. nov., and *Eubacterium lentum* (Prevot 1938) as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 2, 595-600 (1999).
- Walsh, C. J., Guinane, C. M., O'Toole, P. W. y Cotter, P. D. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett.* (2014).
- Wang, X. L., Hur, H. G., Lee, J. H., Kim, K. T. y Kim, S. I. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 214-219 (2005).
- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A. y Hendrich, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.* 125, 2307-2315 (1995).
- Yokoyama, S. y Suzuki, T. Isolation and characterization of a novel equol-producing bacterium from human feces. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2660-2666 (2008).

Yu, Z. T., Yao, W. y Zhu, W. Y. Isolation and identification of equol-producing bacterial strains from cultures of pig faeces. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 73-80 (2008).

Zoetendal E. G., Heilig, H.G., Klaassens, E.S., Boon, J.C., Kleerebezem, M., Smidt, H. y de Vos, W.M. Isolation of DNA from bacterial samples of the human gastrointestinal tract. *Nat. Protoc.* 1, 870-873 (2006).