



Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN DE LOS
EFECTOS INMUNOLÓGICOS
DE NUEVOS COMPONENTES
DE ALTO VALOR BIOLÓGICO
ELABORADOS POR LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE
MEDICINA CLÍNICA Y SALUD
PÚBLICA**

Víctor Alché Ramírez

Enero de 2021



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: Víctor Alché Ramírez

ISBN: 978-84-1306-836-7

URI: <http://hdl.handle.net/10481/68000>



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Estación Experimental del Zaidín (CSIC)
Dpto. Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas
Grupo de Biología Reproductiva y Microscopía
Avanzada de Plantas



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS INMUNOLÓGICOS DE NUEVOS COMPONENTES DE ALTO VALOR BIOLÓGICO ELABORADOS POR LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA CLINICA Y SALUD PÚBLICA

**PRESENTADA POR:
VÍCTOR ALCHE RAMÍREZ
DIRIGIDA POR:
JUAN DE DIOS ALCHE RAMÍREZ
ELENA LIMA CABELLO**

GRANADA, enero de 2021

Este trabajo ha sido realizado en la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), en el grupo de investigación Biología Reproductiva y Microscopía Avanzada de Plantas (grupo PAIDI BIO-283) del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas.

El trabajo ha sido parcialmente financiado con los siguientes proyectos: P2010-AGR6274 P2011-CVI-7487, CA8313, P18-RT-1577 (Junta de Andalucía), RTC-2015-4181-2; RTC-2016-4824-2; RTC-2017-6654-2 (Programa Retos-Colaboración); 201540E065/09021200008 (Proyecto intramural/contrato apoyo tecnológico CSIC), BFU-2016-77243-P (Plan Nacional I+D), todos ellos cofinanciados con fondos FEDER. Parte de la investigación corresponde al desarrollo de un proyecto europeo del programa MARIE CURIE (FP7-PEOPLE-24 2011-IOF) a través de las ayudas PEOF-GA-2011-301550 otorgada a José Carlos Jiménez López, Karam B Singh y Juan de Dios Alché, y a la ayuda RYC-2014-16536 (Programa de Investigación Ramón y Cajal, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad) otorgada a J.C Jiménez López.

A mis padres, en mi continuo recuerdo

A mi familia, que lo es todo

ÍNDICE

Agradecimientos.....	1
Abstract and keywords.....	3
Resumen y palabras clave.....	5
Notas aclaratorias sobre la estructura de la presente memoria de Tesis Doctoral.....	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 El olivo y la industria oleícola.	11
1.1.1 Origen e Historia del olivo.	
1.1.2 Características generales de la planta.	
1.1.3 La drupa del olivo.	
1.1.4 Agricultura del olivo.	
1.1.5 Industria oleícola.	
1.1.6 Cultivo y explotación del olivo.	
1.2 El procesamiento tradicional de la aceituna y sus alternativas.	19
1.2.1 Tratamiento tradicional de la aceituna de mesa.	
1.2.2 Tratamiento tradicional de la aceituna de almazara.	
1.2.3 Tratamientos alternativos de la aceituna. Aislamiento y procesamiento del hueso.	
1.3 La semilla del olivo. Estructura, composición y usos. Proteínas de interés alimentario y biotecnológico de la semilla del olivo.	22
1.3.1 La semilla del olivo.	
1.3.2 Estructura, composición y usos.	
1.3.3 Proteínas de interés alimentario y biotecnológico de la semilla de olivo.	
1.4 Otras semillas de interés alimentario. El altramuz (usos y beneficios).	27
1.4.1 Generalidades.	
1.4.2 Leguminosas.	
1.4.3 Altramuz.	
1.5 Propiedades beneficiosas del aceite de oliva.	29
1.6 Propiedades beneficiosas del consumo de semillas.	31
1.7 Marcadores fisiológicos y patológicos utilizados para evaluar la capacidad nutricional y nutracéutica de componentes agroalimentarios.	32
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	39
3.1 Materiales.	41
3.1.1 Preparación de los aceites del ensayo NUTRAOLEUM.	
3.1.2 Preparación de las harinas de semillas de olivo.	
3.1.3 Preparación de harinas y proteínas recombinantes de <i>Lupinus</i> .	
3.2 Métodos.	43
3.2.1 Descripción del ensayo clínico NUTRAOLEUM.	
3.2.2 Descripción de los ensayos clínicos adicionales.	
3.2.3 Inducción de inflamación y ensayos de contraste en sangre de pacientes cultivada <i>ex vitro</i> .	

- 3.2.4 *Inducción de inflamación y ensayos de contraste en cultivos celulares in vitro.*
- 3.2.5 *Ensayos de viabilidad celular.*
- 3.2.6 *Generación de un modelo de Resistencia a la Insulina en cultivos de células PANC-1*
- 3.2.7 *Análisis y cuantificación de biomarcadores I (panel de citoquinas relacionadas con procesos de inflamación):*
MANUSCRITO EN PREPARACIÓN: Alché, V.; Lima-Cabello, E.; Alché, J.D. Assessment of quantitative immunoblotting and Bio-Plex methods as alternatives to ELISA for the quantification of biomarkers in whole blood ex vitro challenging assays.
- 3.2.8 *Análisis y cuantificación de biomarcadores II (expresión génica de citoquinas y otros marcadores relacionadas con procesos de inflamación).*
- 3.2.9 *Análisis y cuantificación de biomarcadores III (panel de marcadores relacionados con las rutas de señalización de la insulina y otros).*
- 3.2.10 *Análisis y cuantificación de biomarcadores IV (expresión génica de marcadores relacionados con las rutas de señalización de la insulina y otros).*
- 3.2.11 *Determinación de glutatión y actividades enzimáticas antioxidantes.*
- 3.2.12 *Determinación de la producción de NO y nivel de oxidación.*
- 3.2.13 *Análisis estadísticos.*
- 3.2.14 *Aspectos éticos de la investigación.*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.63

4.1 Análisis *ex vitro* de los efectos de diferentes aceites de oliva sobre el estrés oxidativo y la inflamación en adultos sanos en un ensayo controlado doble ciego aleatorizado.65

4.1.1 *MANUSCRITO EN PREPARACIÓN: Elena Lima Cabello, Victor Alché, José Carlos Jiménez López, Estefanía Sánchez Rodríguez, Sara Biel Glesson, Jose Ramón Fernández Navarro, Miguel Ángel Calleja, Juan Antonio Espejo Calvo, Blas Gil Extremera, Francisco Javier Gómez, Rafael de la Torre, Montserrat Fito, María Isabel Covas, Pedro Vílchez, Emilio Martínez de Victoria, Ángel Gil, María Dolores Mesa, Juan de Dios Alché. Ex vivo blood culture assessment of anti-oxidative and anti-inflammatory effects of virgin olive oils differing in their bioactive contents in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial.*

4.2 Las harinas purificadas de semillas de olivo poseen efectos antiinflamatorios en sangre completa de pacientes diabéticos cultivada *ex vitro* y en cultivos *in vitro* de células pancreáticas.85

4.2.1 *Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos.*

4.2.2 *PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Alché, V.; Jimenez-Lopez, J.C.; Alché, J.D. (2018). Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en cultivos celulares pancreáticos. Libro de abstracts III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. 2018. Editorial Universidad de Jaén. Pp. 60-67. ISBN: 978-84-09-07676-5.*

4.3 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* poseen actividad antiinflamatoria *ex vivo* e *in vitro*, y son capaces de modular la ruta de señalización de la insulina en cultivos pancreáticos resistentes esta hormona.95

4.3.1 PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Alché, V.; Foley, R.C.; Andrikopoulos, S.; Morahan, G.; Singh, K.B.; Alché, J.D.; Jimenez-Lopez, J.C. (2017). Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.) β -Conglutin Proteins Modulate the Insulin Signaling Pathway as Potential Type 2 Diabetes Treatment and Inflammatory-Related Disease Amelioration. *Molecular Nutrition and Food Research* 61(5). Feb 13. doi: 10.1002/mnfr.201600819.

4.3.2 PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Morales-Santana, S.; Foley, R.C.; Melsner, S.; Alché, V.; Siddique, K.H.M.; Singh, K.B.; Alché, J.D.; Jimenez-Lopez, J.C. (2018). Ex vivo and in vitro assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius*. *Journal of Functional Foods*. 40:510-519. doi: 10.1016/j.jff.2017.11.040.

4.3.3 PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Morales-Santana, S.; León, J.; Alché, V.; Clemente, A.; Alché, J.D.; Jimenez Lopez, J.C. (2018). Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β -conglutins reverse back the induced insulin resistance in pancreatic cells. *Food & Function*. 9: 5176-5188. DOI: 10.1039/c8fo01164h.

5. DISCUSIÓN GENERAL. 159

5.1 El consumo por individuos adultos sanos de aceites de oliva enriquecidos en triterpenos (ácidos oleanólico y maslínico) tiene un marcado efecto positivo sobre numerosos parámetros oxidativos e inflamatorios. 161

5.2 Las harinas purificadas de semillas de olivo contienen compuestos anti-inflamatorios que pueden modular la inflamación basal de pacientes diabéticos. 164

5.3 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* modulan la ruta de señalización de la insulina y podrían tener un papel en el tratamiento potencial de la diabetes de tipo 2 y la mejora de la inflamación subyacente..... 164

5.4 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* poseen capacidad antiinflamatoria en modelos *ex vivo* e *in vitro*..... 166

5.4.1 *Algunas beta-conglutinas tienen efectos claros sobre el proceso inflamatorio de las células PANC.*

5.4.2 *Los péptidos de β -conglutina inhiben la producción de múltiples citoquinas y mediadores de la inflamación.*

5.4.3 *Las diferentes isoformas de la β -conglutina tienen efectos sobre el NO en los hemocultivos T2D.*

5.4.4 *Las diferentes isoformas de la β -conglutina tienen efectos sobre el NO en los hemocultivos T2D.*

5.5 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* son capaces de revertir la resistencia inducida a la insulina en un modelo celular pancreático..... 171

5.5.1 *Las β -conglutinas incrementan la captación de glucosa y la expresión génica de los genes de la ruta de señalización de la insulina en células IR-C.*

5.5.2 *Las conglutinas purificadas β 1, β 3 y β 6 incrementan la fosforilación de IRS-1 y los efectores subsecuentes.*

5.5.3 *Efectos de las proteínas β -conglutinas sobre el metabolismo y las vías de señalización*

5.5.4 *Las proteínas β -conglutinas tienen efectos positivos sobre el estrés oxidativo.*

6. CONCLUSIONES.	179
7. BIBLIOGRAFÍA.	183
8. ANEXOS.	199
8.1 Lista de abreviaturas	201
8.2 Figuras y Tablas	205
8.3 Resoluciones Comité de Ética de la Investigación	209
8.4 Publicaciones y comunicaciones presentados a congresos derivadas de la presente tesis.	215

Agradecimientos:

Por supuesto, agradecer en primer lugar a Juan de Dios Alché Ramírez, mi querido hermano y motor fundamental de este trabajo, que me haya motivado, incentivado, dirigido, alentado y muchas veces obligado a realizar esta tarea investigadora. Con él comparto genética, afinidades, y gustos, y por supuesto esa peculiar educación que nos dieron nuestros padres y de la que tanto estamos orgullosos.

A mi querido amigo, y tutor en este trabajo, D. Francisco Javier Gómez, que propuso el inicio de esta Tesis, y no dejó de supervisarlo e incentivarlo. Con él compartimos deporte y tertulia y se ha ido haciendo hueco entre las personas más influyentes de mi vida. Sin su tutela, este trabajo no hubiera sido posible.

A Elena Lima Cabello, codirectora de esta tesis, que ha demostrado una paciencia infinita conmigo, con las irregularidades y la inconstancia provocada por mis ausencias, mis otros trabajos y mis innumerables guardias. A ella se debe gran parte del conocimiento técnico de esta tesis.

A los compañeros de la Estación Experimental del Zaidín, el Dr. Antonio Jesús Castro, D^a Diana Fuensanta Nicolás Llorach, por su eficiencia, su amabilidad y su apoyo, y especialmente al Dr. José Carlos Jiménez, por su colaboración en el diseño y realización experimental, y su labor fundamental en las publicaciones emergentes de este trabajo.

A mis compañeros de la Zona Básica de Salud de Pedro Martínez, profesionales incansables y base fundamental de mi actividad clínica en el Servicio Andaluz de Salud. Allí tuve una excelente acogida, hace ya 14 años y, actualmente son como mi segunda familia.

A Federico Jiménez Villegas, prototipo de Médico de Familia, que fue mi tutor, y docente durante mi residencia como Médico de Familia. Con él asistí como alumno a mi primer curso de Metodología de la Investigación, y despertó en mí, un creciente interés por la actividad investigadora. Actualmente se encuentra entre mis mejores amigos, y sigue siendo un ejemplo para mí.

Al Profesor Jose Manuel Galvez Lamolda, que me enseñó el valor de la amistad hace mas de cuarenta años. Amistad que perdurará hasta el final de nuestros días.

Al Dr. Jose Antonio Pérez Romero y Antonia García Rejón, farmacéuticos, que me contrataron y me dieron una acogida extraordinaria durante años. Allí tuve mi primer contacto con los pacientes, cuando era aún muy joven. Los llevo siempre en mi corazón y en mi memoria.

A Pilar, mi compañera en esto y en todo, el amor de mi vida.

A Victor, mi querido hijo.

A mis amigos, por su apoyo incondicional.

El doctorando y sus directores agradecen a los miembros del consorcio NUTRAOLEUM la colaboración prestada, y las opiniones constructivas para la preparación de la presente memoria.

Abstract

Human and animal feeding is continuously needed of new alimentary sources both healthy and highly productive, in order to accommodate increasing demographic pressure and strong demand of specialized foods. Apart from the regular primary agro-food sources, the design of alternative ways for raw foods processing, re-usage of secondary products or by-products, or the isolation of essential components from foods and their addition to functional or dedicated design-foods represent strategies of wide evolution.

The present work focuses into the alternative usage of two basic food resources. On one side, olive fractionation prior to olive processing in the oil factories is a source of new and valuable products of high added value. One of these products is the flour arising from the olive stone, which is becoming highly valued because of its high content in nutritional components and its emerging nutraceutical capacities. On the other side, the different species of sweet lupins, particularly narrowleafed lupin, represent crops in continuous growth, as its consumption in several preparations (i.e. whole seeds or flours) have shown to display anti-diabetic properties, as well as a satiating property contributing to fight obesity. We lack, however of scientific evidence supporting such properties, which were observed empirically only. Therefore, the main objective of the present Ph.D. work is to obtain such evidence, through the biological assay of components derived from these alimentary sources.

In the case of the olive, the NUTRAOLEUM study was used as the basis. This study has shown to be a highly informative scenario to analyze *in vivo* the benefits of triterpenes of the olive oil (oleanolic and maslinic acids) on the health of healthy humans. The assay encompasses the raw intake by participants of a supplementary dose (30 mL/day) of optimized olive oil, and a functional olive oil, both created by means of olive-derived-technical procedures, in comparison with intake of an extra-virgin olive oil (all of them displaying differential concentrations of these compounds). Fifty-one adults participated in this random, crossed, controlled assay. Differently from other studies emerging from this clinical assay already performed *in vivo*, in this Ph. D. work a new method for *ex vivo* culture of the patients' blood including the induction of an artificial inflammatory state was designed, which allowed the amplification of the signaling network involved. The plasma samples, or the peripheral mononuclear blood cells isolated from the cultures were subjected to a comprehensive analysis of inflammation and oxidative stress by means of ELISA, Q-PCR, quantitative Western blotting and Bio-Plex [i.e. IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , TNF- α , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1], NO concentration, presence of iNOS and changes in the protein nitration profiles), which allowed demonstrating the high anti-inflammatory and anti-oxidant capacity of these compounds (triterpenes) from the olive oil. It was also shown (by using analogous procedures) the anti-inflammatory character of flours derived from olive seeds, which were added to the *ex vivo* blood cultures of the patients. This was particularly evident in the type-2 diabetic patients, who showed a diminution of the sub-clinic inflammatory state, subjacent to this pathology. Such assays with seed flours were also confirmed in a different experimental system, which consist in cell cultures of pancreatic cells, induced by using three different inflammation inducers.

In the case of lupin proteins, recombinant forms of the narrowleafed (r β 1, r β 2, r β 3, r β 4 y r β 6), purified by affinity chromatography were used. These proteins were assayed in several biological systems including their *ex vivo* co-culture with the blood of healthy patients and diabetic/metabolic syndrome patients, *in vitro* culture of pancreatic cells, and *in vitro* cultures of pancreatic cells after the induction of insulin tolerance. In this case, on top of the most relevant markers of inflammation and oxidative state mentioned above, additional markers were used, as those corresponding to

protein carbonylation, markers involved in the insulin signaling pathways and others like IRS-1, GLUT-4, CCL5, CCR2, ICAM-1 and NF- κ B1 (p50), protein kinase B (AKT). Also, analyses regarding the straightforward capacity of the recombinant conglutins to bind insulin and an analysis of IRS-1 phosphorylation were performed. Such studies concluded that r β 1, r β 3, y r β 6 conglutins are able to reduce the expression of pro-inflammatory molecules as well as the whole oxidative state, increasing on the other side the expression of insulin receptors and transporters, possibly favoring recognition and control of the insulin levels. r β 2 y r β 4 isoforms of conglutins are, contrarily, favoring the inflammatory state and had no effect insulin signaling. In the case of insulin-resistant cells, the recombinant conglutins r β 1, r β 3, y r β 6 were able to noticeably improve the levels of the most relevant markers involved in maintaining optimal inflammatory and oxidative state in the resistant cultures.

The present Ph. D. allowed to develop tools and procedures able to dissect the potential nutraceutical effects of different food components, by exemplifying them in two foods of broad use like the olive (and its derivatives) and lupin. This knowledge will be of utility for the agro-food industry and develops new aspects of health, which are likely applicable to the treatment of several pathologies like type-2 diabetes.

Keywords:

Antiinflammatory, antioxidant, β -conglutins, biomarker, *ex vivo* blood culture, diabetes, GLUT-4, flour, IL-1 β , induction, inflammation, INOS, insulin, legumes, *Lupinus angustifolius* L., *Olea europaea* L., olive, oxidation, pancreatic cells, PI3-kinase, resistance, seed, sweet lupin, vicilin.

Resumen

La alimentación humana y animal están continuamente necesitadas de nuevas fuentes alimentarias saludables y altamente productivas para dar cabida a la creciente presión demográfica y a la fuerte demanda de alimentos especializados. Aparte de las fuentes agroalimentarias primarias habituales, el diseño de vías alternativas de procesamiento de estos alimentos basales, la reutilización de productos secundarios o subproductos, o el aislamiento de componentes esenciales de los alimentos y su adición a alimentos funcionales o de diseño son estrategias en amplia evolución.

El presente trabajo se centra en la utilización alternativa de dos recursos alimentarios básicos. Por una parte, el fraccionamiento de la aceituna de forma previa a su procesado en las almazaras es una fuente de nuevos y valiosos productos con alto valor añadido. Uno de estos productos son las harinas procedentes de la semilla del hueso, que están siendo valoradas por su alto contenido en componentes nutricionales y por sus emergentes capacidades nutracéuticas. Por otra parte, las diversas especies de altramuz dulce, y especialmente el altramuz de hoja estrecha, representan cultivos en continuo crecimiento dado que su consumo en diversas preparaciones (ej. semillas completas o harinas) ha mostrado poseer propiedades antidiabéticas, así como propiedades saciantes que contribuyen a luchar contra la obesidad. Carecemos, sin embargo, de evidencias científicas que soporten estas propiedades observadas de forma empírica. Es por tanto el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral obtener dicha evidencia, a través del ensayo biológico de componentes derivados de estas fuentes alimentarias.

En el caso de la aceituna, se ha tomado como base el estudio NUTRAOLEUM, que ha mostrado ser un escenario altamente informativo para analizar *in vivo* los beneficios de los triterpenos del aceite de oliva (ácidos oleanólico y maslínico) sobre la salud de humanos sanos. El ensayo incorpora la toma basal por parte de los participantes de un suplemento diario (30 mL/día) de aceite optimizado de aceite de oliva, y de un aceite de oliva funcional, ambos creados mediante procedimientos de elaiotecnia, en comparación con la toma de un aceite de oliva virgen extra (todos ellos con concentraciones diferenciales de estos compuestos). En el ensayo (aleatorizado, cruzado y controlado) participaron 51 adultos. A diferencia de otros estudios emergentes de este ensayo clínico ya realizados *in vivo*, en esta Tesis Doctoral se optimizó un método de cultivo *ex vivo* de la sangre de los pacientes con inducción de un estado inflamatorio artificial que permitió una amplificación de la red de señales implicadas. Las muestras de plasma obtenidas o las células mononucleares de sangre periférica aisladas de los cultivos fueron sometidas a un exhaustivo análisis de marcadores de inflamación y estrés oxidativo mediante ELISA, Q-PCR, Western blotting cuantitativo y Bio-Plex [i.e. IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL12, IL-13, IL-17, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , TNF- α , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , monocyte chemotactic protein (MCP)-1], concentración de NO, presencia de iNOS y cambios en los patrones de nitración proteica), que permitieron demostrar la elevada capacidad antiinflamatoria y antioxidante de estos compuestos (triterpenos) del aceite de oliva. Igualmente se demostró (por procedimientos análogos), el carácter antiinflamatorio de las harinas derivadas de semillas de olivo que fueron añadidas a los cultivos *ex vivo* de sangre de pacientes, y que fue especialmente evidente en pacientes diabéticos tipo 2 en los cuales se detectó una disminución de la inflamación subclínica subyacente a esta patología. Estos ensayos con harinas de semillas fueron además confirmados en otro sistema experimental, consistente en experimentos en cultivos celulares de células pancreáticas, inducidos con tres inductores diferenciales de inflamación.

En el caso de las proteínas de altramuz, se utilizaron las formas recombinantes (r β 1, r β 2, r β 3, r β 4 y r β 6) de las conglutinas del altramuz de hoja estrecha, purificadas mediante cromatografía de afinidad. Estas proteínas fueron ensayadas en diversos sistemas biológicos que incluyen su co-cultivo *ex vivo* con sangres de pacientes sanos y diabéticos/síndrome metabólico, cultivos *in vitro* de células pancreáticas, y cultivos *in vitro* de células pancreáticas en las que se había inducido tolerancia a insulina. En este caso, además de los marcadores de inflamación y del estado oxidativo más relevantes mencionados anteriormente, se analizaron marcadores adicionales como la carbonilación proteica, y marcadores implicados en la ruta de señalización de la insulina y otros, como IRS-1, GLUT-4, CCL5, CCR2, ICAM-1 y NF- κ B1 (p50), proteína quinasa B (AKT). También se realizaron análisis de la capacidad de unión directa de estas conglutinas recombinantes con la insulina y un análisis de la fosforilación de IRS-1. Estos estudios concluyeron que las conglutinas r β 1, r β 3, y r β 6 son capaces de reducir la expresión y la presencia de moléculas proinflamatorias y el estado oxidativo en general, e incrementar por otra parte la expresión de receptores y transportadores de la insulina, favoreciendo posiblemente el reconocimiento y el control de los niveles de ésta. Las isoformas r β 2 y r β 4 son, por el contrario, favorecedoras de un estado inflamatorio y no tuvieron efecto sobre la señalización de la insulina. En el caso de células resistentes a la insulina, las conglutinas recombinantes r β 1, r β 3, y r β 6 fueron capaces de mejorar notablemente los niveles de los marcadores más relevantes referentes a inflamación y estado oxidativo de los cultivos resistentes.

Esta Tesis Doctoral ha permitido, por tanto, desarrollar herramientas y procedimientos capaces de diseccionar los efectos potencialmente nutracéuticos de diferentes componentes agroalimentarios, ejemplificándolos en el caso de dos alimentos de amplia utilización como son la aceituna (y sus derivados) y el altramuz. Este conocimiento es de utilidad para la industria agroalimentaria y desarrolla nuevos aspectos de la salud, probablemente aplicables al tratamiento de diversas patologías como la diabetes tipo 2.

Palabras clave:

Altramuz dulce, antiinflamatorio, antioxidante, biomarcador, células pancreáticas, conglutinas β , cultivo *ex vivo* de sangre, diabetes, GLUT-4, harina, IL-1 β , inducción, inflamación, INOS, insulina, legumbres, *Lupinus angustifolius* L., *Olea europaea* L., olivo, oxidación, PI3-quinasa, resistencia, semilla, vicilina.

Notas aclaratorias sobre la estructura de la presente memoria de Tesis Doctoral

- La presente memoria contiene textos inéditos que forman parte de la estructura canónica de una Tesis Doctoral. Dichos textos han sido preparados de acuerdo con las instrucciones dictadas por el Programa de Doctorado correspondiente, es decir básicamente escritos en español, con fuente homogénea (tipo Calibri), y tamaño de 12.

- De forma adicional se incluyen dos tipos de documentos:

- a) **MANUSCRITOS EN PREPARACIÓN.** Se trata de textos correspondientes a entidades individualizadas (manuscritos listos para su envío a revistas periódicas indexadas de alto índice de impacto), y que incluyen material y contenido coherente con su lugar de inserción en la Memoria de Tesis Doctoral. Puesto que se trata de textos listos para su envío, se han preparado de acuerdo con las recomendaciones generales para su envío a una revista, y contienen la estructura propia de un artículo (título, palabras clave, resumen, introducción, material y métodos, resultados, discusión, agradecimientos, contribuciones de los autores, leyenda de las figuras etc.). En este caso, los manuscritos han sido preparados en inglés. Para facilitar la lectura y evaluación de la presente memoria, se antecede un resumen en español y un listado de palabras clave a cada uno de estos manuscritos.
- b) **PUBLICACIONES.** En este caso se trata de manuscritos aceptados en revistas de alto índice de impacto. Incluyen material y contenido coherente con su lugar de inserción en la Memoria de Tesis Doctoral. Puesto que se trata de textos ya publicados, contienen la estructura propia de un artículo (título, palabras clave, resumen, introducción, material y métodos, resultados, discusión, agradecimientos, contribuciones de los autores, leyenda de las figuras etc.). En este caso, se han incluido los textos y figuras originales correspondientes al último envío realizado a la editorial, de forma previa a su aceptación y publicación (artículos “pre-print”), con objeto de evitar infringir los derechos de copyright. En estos casos, los documentos “pre-print” se han incluido en el idioma original de la publicación aceptada, bien en español o inglés, y se ha respetado la estructura de la publicación original. Para facilitar la lectura y evaluación de la presente memoria, se antecede un resumen en español a cada una de estas publicaciones, en el caso de que éstas hayan sido publicadas en inglés. En todos los casos se incluye la referencia completa de dichas publicaciones.

Los dos tipos de documentos mencionados aparecen claramente identificados en la memoria mediante un marco coloreado en azul en toda su extensión.

- Las citas bibliográficas correspondientes a la presente memoria de Tesis Doctoral (apartados de introducción, material y métodos, resultados, discusión etc.) han sido preparadas en estilo CSE, para diferenciarlas claramente de las citas incluidas en cada uno de los manuscritos en preparación y publicaciones, en los que se ha utilizado el estilo solicitado por los editores (generalmente de tipo Vancouver).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El olivo y la Industria Oleícola

1.1.1 Origen e Historia del olivo.

Actualmente sigue siendo una incógnita el auténtico origen del olivo cultivado, aunque coexisten variadas teorías, si bien ninguna de ellas es absolutamente concluyente.

La inquietud de los botánicos por la clasificación de las plantas de forma estructurada se remonta a los trabajos de Linneo (Linnaeus 1735). Fueron los taxónomos, en su empeño de establecer diferenciaciones morfológicas, los primeros en intuir la relación entre silvestre y domesticado. Concretamente, en el siglo XIX, uno de los pioneros en desarrollar teorías sobre la domesticación fue Alphonse de Candolle (1886), que propugna que, en la localización del origen de una planta cultivada, deberían coincidir, su área de distribución natural y la localización de sus parientes silvestres.

Disiente sobre esa teoría, Vavilov (1922), que en cambio defiende que los centros de origen de plantas cultivadas no siempre coincidirían con sus antecesores silvestres. En esta teoría se apoya en las características genéticas de los especímenes estudiados. Distingue entre centros primarios (áreas en que inicialmente aparecen los cultivos), y centros secundarios, con alta diversidad, pero distintos de los primarios.

Como consideran Zohary D y Spieguel Roy (1975), aunando investigaciones arqueo- botánicas y genéticas, es apropiado retomar las teorías de Alphonse de Candolle, y dan una base más sólida a las actuales aproximaciones del origen geográfico del cultivo del olivo, que desde de Candolle se denomina Creciente Fértil, zona situada en Siria e Irán, al norte del Mar Muerto, y se dataría aproximadamente en unos 4000 años a.C. Con esta teoría coincide también Vossen (2007), que afirma que el origen pudo ser multilocal y que en la mayoría de los asentamientos en que hay olivo cultivado, se detecta coexistencia con su especie salvaje, acebuche.

Estudios más recientes combinan estos hallazgos con la extracción de aceite a partir de aceituna y la arqueología de los sistemas de extracción (Kapellakis *et al.*, 2008).

Investigadores más actuales, utilizando técnicas más innovadoras, comparan ADN de distintas especies de olivo, localizadas en 21 países, buscando similitudes genéticas, para establecer distintas posibles rutas de expansión del olivar primigenio (Diez *et al.*, 2015) (Figura 1). Estos estudios corroboran el origen geográfico en el Creciente Fértil mencionado previamente.

La expansión del olivo está asociada al comercio marítimo, por lo que su extensión coincide con las rutas del comercio; la confirmación de esta teoría siempre basada en restos arqueológicos (Vossen 2007). La difusión más importante se produjo durante el Imperio Romano y está documentado su uso preferente en la cosmética, usos curativos y fuente de energía; no para uso alimentario, como en la actualidad. (Kapellakis *et al.*, 2008).

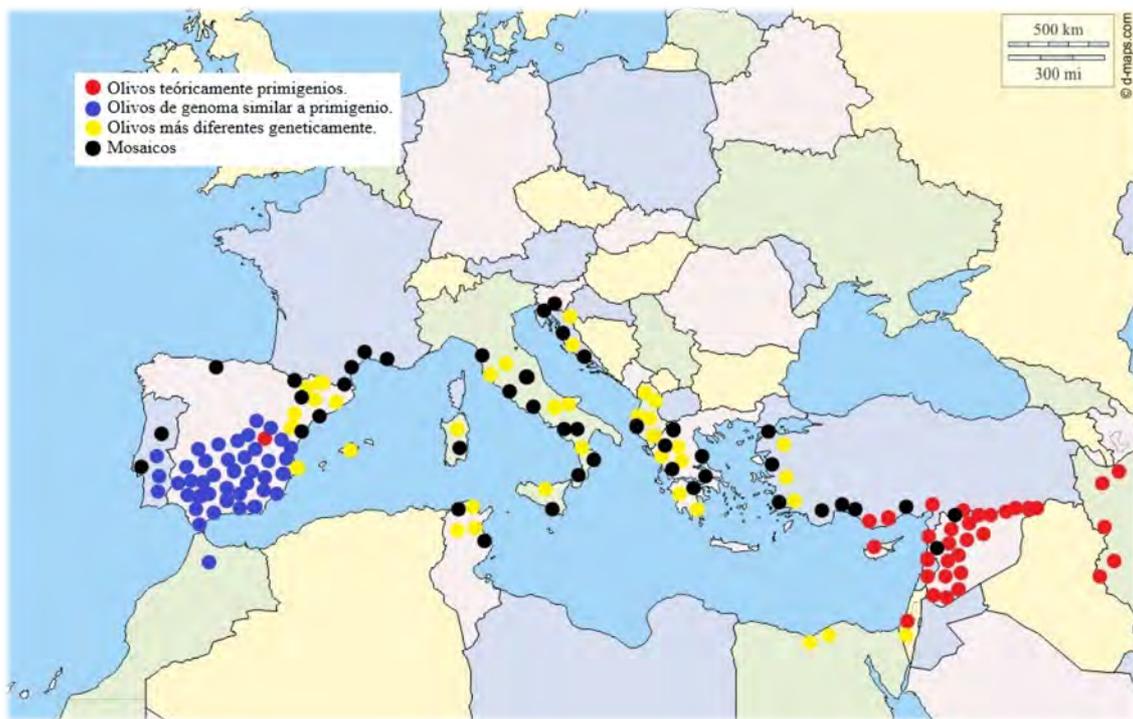


Figura 1. Distribución mediterránea de olivos primigenios, y olivos relacionados. Elaboración propia; Adaptado de Díaz et al., 2015

A España llegaría el olivo, a través del comercio fenicio; las variedades más importantes se asientan en Andalucía y tienen similitudes genéticas con las de Portugal y Norte de África y Marruecos. Siguiendo las líneas anteriormente expuestas, sobre el origen global del olivo como cultivo, vemos que las dos cuestiones fundamentales que se plantean, es desde cuándo está el olivo como cultivo, y cómo diferenciar entre los restos arqueológicos pertenecientes a olivo, versus acebuche. En Andalucía se han realizado estudios de datación del olivo y su domesticación. Para esta función, son fundamentales dos disciplinas, la antracología o estudio de los carbones encontrados en yacimientos arqueológicos, y la carpología o estudio de los huesos. De estos estudios se concluye que en Andalucía el cultivo del olivo no se produce hasta época romana, más concretamente hacia el siglo I d. C, época en que aparecen gran cantidad de macrorrestos fuera del área natural de crecimiento del acebuche, si bien se detecta recolección de acebuchinas desde asentamientos neolíticos (Rodríguez-Ariza y Montes 2005).

Durante el siglo XV, el cultivo del olivo se introdujo en América por misioneros. No obstante, sólo se asentó en algunas áreas de Argentina y Chile; también en California (Kapellakis *et al.*, 2008)

Los estudios genéticos realizados por Diez corroboran que los cultivos de olivo actuales, en el continente americano, tienen similitudes con los del sur de España, Portugal y Marruecos, lo que ayuda a corroborar la mencionada teoría (Diez *et al.*, 2015).

Una expansión del olivo más reciente tuvo lugar durante finales del siglo XIX y principios del siglo XX, donde se comenzó a cultivar en Australia, India, China, Japón y Pakistán. También en el sur de África (Civantos 2004).

1.1.2 Características generales de la planta.

La familia *Oleaceae*, perteneciente al orden Lamiales, comprende 29 géneros de plantas leñosas. De entre estos 29 géneros, el más importante desde el punto de vista económico a nivel internacional es el género *Olea*. El género *Olea* incluye 35 especies, entre las que destaca por su importancia, la *Olea europaea* L., especie diploide de 46 cromosomas.

Se trata de arbustos o árboles de tamaño mediano, troncos gruesos y tortuosos y ramas jóvenes de corteza grisácea. Las características morfológicas dependen mucho de la variedad. Su tamaño es variable, generalmente de 4 a 8 m. Hojas de 15 a 70 mm x 4 a 15 mm, opuestas, de peciolo corto, simples, entre oblongo y lanceoladas, o elípticas; coriáceas, de haz verde oscuro y envés grisáceo, densamente cubierto de pelos peltados.

Inflorescencia con eje central y ramificaciones que pueden ramificarse a su vez; flores de 5 a 7 mm, aisladas, o en pequeños racimos. Pueden ser flores perfectas, que son hermafroditas y están compuestas de estambres y pistilo. Dan fruto.

También se pueden presentar como flores estaminíferas o masculinas, con ovario rudimentario o ausente. No dan fruto, y pueden constituir hasta el 50% en años normales.

Fruto en drupa, de 8 a 20 mm, elipsoidal a más esférica según las variedades; verde en principio, y en la madurez se torna negruzco o pardo, incluso violáceo, también según la variedad. Se describe en apartado independiente.

Sus raíces en general son poco profundas, por lo que es fácilmente trasplantable, aunque su profundidad dependerá de las características del terreno, la climatología y la edad del ejemplar. (Rapaport 2008)

Se distinguen dos variedades (Gómez y Iris, 2011);

- *Olea europaea* variedad *sativa*, u olivo cultivado, de tallos no espinosos, hojas más largas y oblongo-lanceoladas y fruto, por lo general mayor a 15 mm (Figura 2).
- *Olea europaea* variedad *oleaster*, u olivo silvestre, o acebuche, de tallos más tortuosos, ramas más espinescentes, hojas más cortas y a menudo elípticas u abovedadas. Fruto más pequeño.



Figura 2. Olivo de la variedad Picual. Terrenos calizos en Villanueva de las Torres. Granada

1.1.3 La drupa del olivo.

El fruto del olivo es la aceituna. Su procesamiento constituye en la actualidad el motor económico más importante de la industria oleícola. Representa además un activo de futuro en otros posibles sectores de la industria olivarera, en cuanto a que cada vez es más frecuente su procesamiento desglosado en sus distintas fracciones.

Se trata de una drupa, es decir un fruto de una sola semilla, de un tamaño longitudinal entre 1 y 4 cm y entre 0,6 y 2 cm de diámetro. Entre las variedades de tamaño mayor, destaca la Gordal Sevillana, que se destina a consumo de mesa, y entre las más pequeñas, la Arbequina, que se destina a producción de aceite (Rapaport 2008).

La drupa está compuesta de una membrana externa, o epicarpio, una pulpa carnosa de textura oleosa, o mesocarpio y el hueso interior o endocarpio. El endocarpio, a su vez está compuesto de una capa externa, dura, y la semilla en su interior (Figura 3).

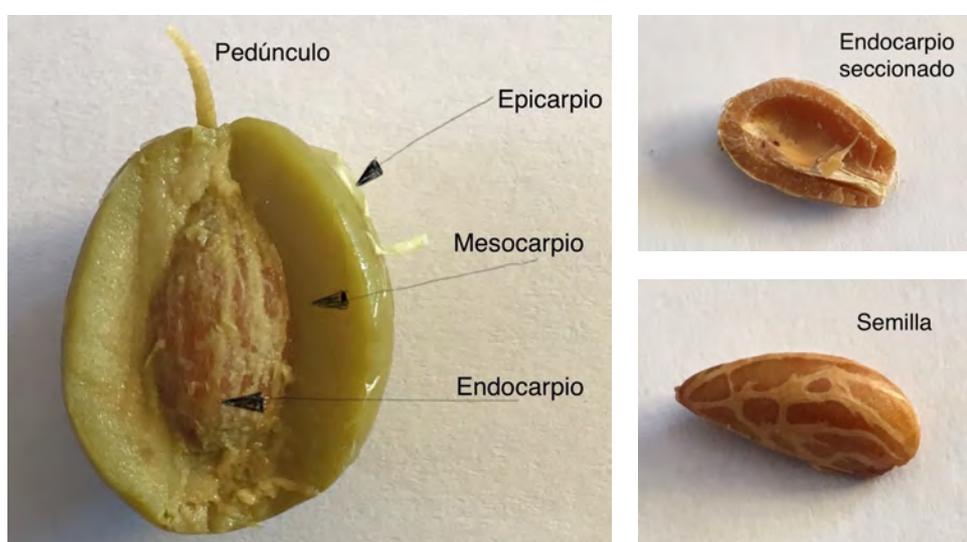


Figura 3. Partes de la drupa de olivo. Elaboración propia

1.1.4 Agricultura del olivo.

El olivo se cultiva en una franja localizada entre los 30° y 45° de latitud, tanto en hemisferio norte, como sur. La planta soporta bien las altas temperaturas, aunque son perjudiciales en período de floración, y unidas a fuerte exposición solar pueden provocar daños en ramaje, incluso en el tronco.

Soporta también el frío, incluso heladas de -8° a -10°, siempre que no se encuentre en fase vegetativa, o que la exposición sea prolongada en el tiempo. La resistencia al frío es muy dependiente de la variedad. Se desarrolla mejor en áreas con una pluviometría entre 600 y 800 mm/año. Es poco exigente en cuanto a suelos.

El olivo tiene un gran poder regenerativo, por lo que sobrevive cientos de años, siendo productivo.

Esta capacidad regenerativa es importante también de cara a su multiplicación. La forma más habitual es mediante un trozo de madera, o estaca, generalmente proveniente de la poda, que, enterrada en condiciones favorables, emite raíces, y genera el brote de yemas en la parte aérea. En

los últimos 20 años es más frecuente que las estacas se enraícen en viveros, donde permanecen uno o dos años. (Molina *et al.*, 2010).

Respecto a los sistemas de cultivo, se clasifican en:

- Tradicional, el más clásico, habitual en la cuenca mediterránea. Densidad baja, entre 30 y 175 árboles por hectárea. En un intento por simplificar sus características, se propuso clasificar las explotaciones entre olivar de secano de alta pendiente (>15%), con mayores costos de producción; olivar de secano con pendiente moderada (<15%), y olivar de regadío, que se incorpora a partir de la década de los 70 y crece mucho desde 1986 (Molina *et al.*, 2010)
- Intensivo entre 350 y 550 árboles por hectárea.
- Súper-intensivo, sobre todo para variedades precoces como Arbequina. Entre 1665 y 3000 árboles por hectárea.

El uso de determinados fertilizantes puede afectar a la calidad y composición del aceite de oliva. Generalmente se usan compuestos nitrogenados, potasio y fosfatos (Romero *et al.*, 2016). Otros aspectos que pueden influir en las características del producto final son el manejo de la explotación en modo ecológico o tradicional, incluso el tipo de poda, en cuanto que modifica la distribución lumínica dentro del árbol.

Una vez madurado el fruto, la recolección se realiza por distintos medios; el más tradicional es el “vareo”, consistente en la sacudida de la rama para que caigan las olivas. Cada día es más frecuente el uso de aparatos mecánicos como vibradoras, a veces unipersonales y otras adaptadas al tractor que actúan sobre una de las patas del olivo. En sistemas superintensivos hay maquinaria específica para la recolección. Respecto al transporte, se debe evitar transportar aceituna ensacada, y en cuanto a su procesamiento, que revisaremos en un apartado independiente, se debe realizar como máximo en las 24 horas posteriores a su recogida.

1.1.5 Industria oleícola.

Según estimaciones de la compañía independiente alemana Oil World (www.oilworld.biz), una vez terminado el balance sobre el ejercicio 2017/18, la producción mundial de aceites vegetales se incrementó un 2,3% respecto a la campaña previa.

La producción de aceites vegetales muestra un incremento muy evidente en el curso de esta década, desde 160 millones de toneladas en la campaña 2011/12 a 203 millones de toneladas en la campaña cerrada a final de septiembre 2018. Entre los aceites de palma y soja, constituyen más del 60% del total de la producción, siendo minoritaria la producción internacional de aceite de oliva como se puede ver desglosado en el gráfico adjunto (Figura 4).

Por otra parte, la mayoría de los aceites mayoritarios han sufrido un incremento notable de su producción en esta última década, como el caso del aceite de palma, del que se incrementó su producción un 39,2%, y el de soja, un 33,7%. El tercer aceite más consumido es el aceite de colza, del que también se incrementó su producción un 7,5%, y el de girasol en cuarto lugar, del que se incrementó la producción hasta un 28% (Mielke 2018).

Producción Mundial de Aceites Vegetales. 2017/18 en Millones de TM

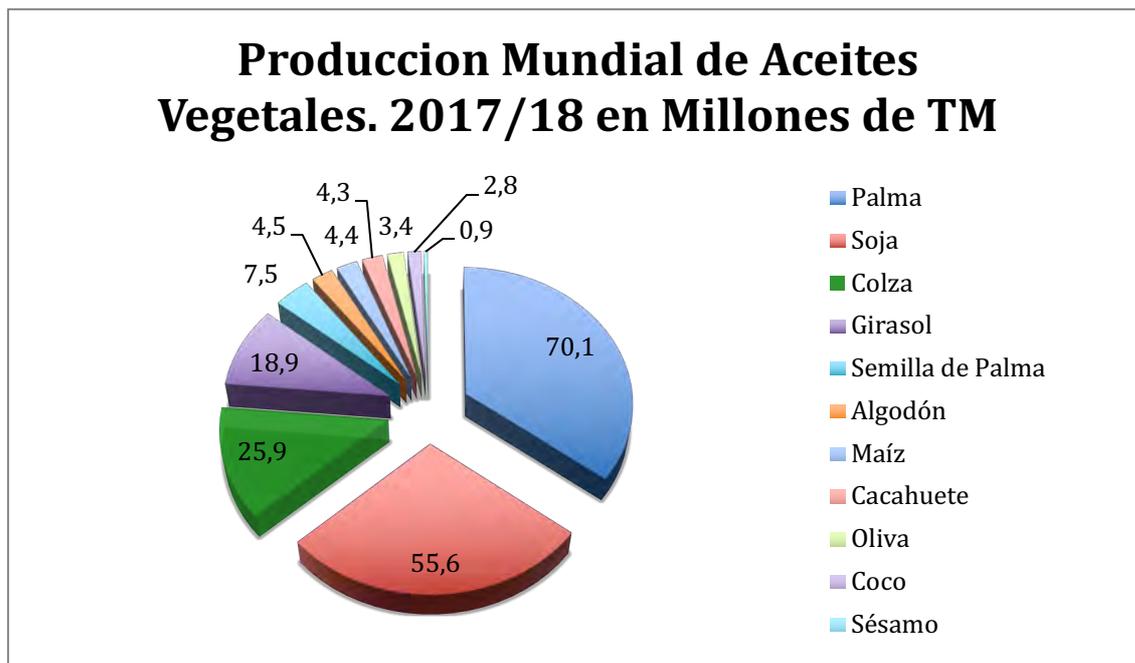


Figura 4. Producción de aceites vegetales. Elaboración propia con datos de Oil World

1.1.6 Cultivo y explotación del olivo

Actualmente, según la base de datos de FAO, con datos de 2017 (FAO 2017), se estima que hay unas 11.425 Hectáreas de olivo plantadas en el mundo, de las cuales la mayor extensión (unas 2630 Hectáreas) se encuentran en España, que es, con diferencia, el primer productor mundial de aceite de oliva (Figura 5).

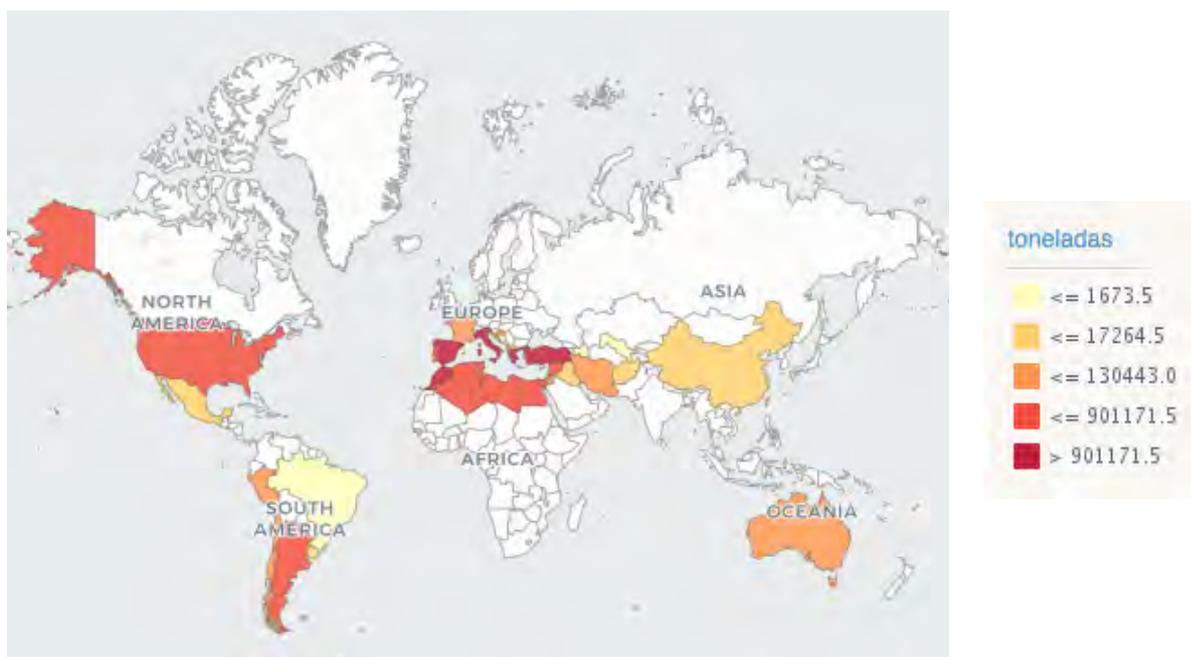


Figura 5. Distribución de la producción mundial de olivo. Base de datos FAO. 2017

En 1959 se creó en Madrid, bajo los auspicios de Naciones Unidas, el Consejo Oleícola Internacional (COI), organismo encargado de la promoción responsable y sostenible del olivar. Este organismo también gestiona los convenios internacionales sobre los productos del olivar y establece o actualiza normas sobre los mismos, con el objetivo de mejorar su calidad. También difunde información y estadísticas sobre el mercado del aceite de oliva y la aceituna de mesa. En los países productores miembros del COI, se concentra el 98% de la producción de aceituna, básicamente localizada en la región mediterránea (COI 2018) (Figura 6).

Respecto a la producción de oliva de mesa, a nivel mundial, y durante el ejercicio 2017/18, fue de 2908500 Tm, registrando un leve incremento de 109000 Tm respecto al ejercicio anterior.

Una vez más, España figura como el primer país productor y exportador del mundo en ese campo, representando un 19,35% de la producción, aunque en este último ejercicio, y respecto al anterior, ha sufrido un descenso de producción en torno a un 1,134%.

Le siguen, en cuanto a producción, Egipto el 17,19%; Turquía 15,47%; Grecia 8,97%; Marruecos 4,46%; Argentina 3,66%; Siria 3,44%.

El resto de los países productores, no alcanzan el 3% del total mundial (COI 2018).

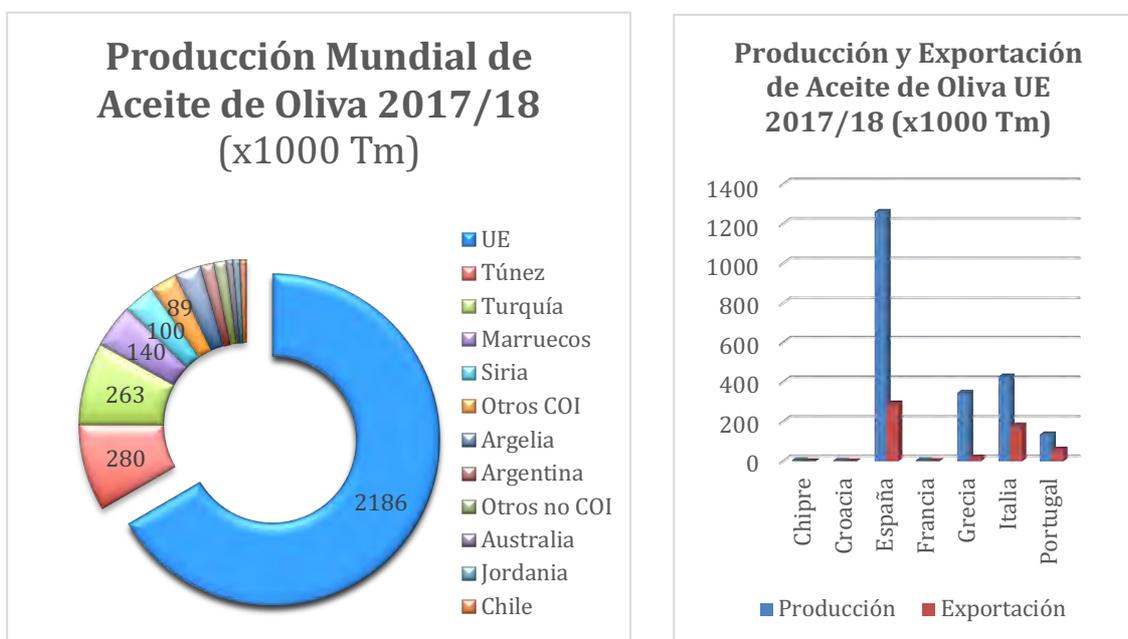


Figura 6. Producción Mundial de Aceite de Oliva. (COI, 2018)

En cuanto al cultivo olivarero en España, existen grandes diferencias por comunidades autónomas, no solo en cuanto a la extensión de los cultivos, también con relación a las variedades cultivadas en cuanto a su uso y aprovechamiento industrial (Tabla 1). Incluso en una misma comunidad autónoma, como es Andalucía, encontramos grandes diferencias entre provincias, no solo en cuanto a producción, en la que ocupa el primer lugar, Jaén que declara unas salidas netas de aceite de sus almazaras de 243481 toneladas al final de la campaña 2018/19, frente a Huelva, que declara solo 4015 toneladas en el mismo período (Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2018). En cuanto al porcentaje de la producción exportada, ocupa el primer lugar, Sevilla, con un 45.50%, siendo el primer exportador español (Junta de Andalucía 2019).

Comunidad Autónoma	Tipo de cultivo	Secano	Regadío	Total, usos	Total, Autonomía
Galicia	Almazara	20		20	
	Total, Galicia				20
País Vasco	Aceituna de mesa	18		18	
	Almazara	189	114	303	
	Total, País Vasco				321
Navarra	Doble aptitud		350	350	
	Almazara	3169	5263	8432	
	Total, Navarra				8782
Rioja	Doble aptitud	41		41	
	Almazara	1779	1498	3277	
	Total, Rioja				3318
Aragón	Aceituna de mesa	6		6	
	Doble aptitud	1590	2	1592	
	Almazara	46491	11829	58320	
	Total, Aragón				59918
Cataluña	Aceituna de mesa	20		20	
	Doble aptitud	970	189	1159	
	Almazara	89666	23186	112852	
	Total, Cataluña				114031
Balears	Aceituna de mesa	27	11	38	
	Doble aptitud	46	28	74	
	Almazara	6233	2298	8531	
	Total, Balears				8643
Castilla León	Doble aptitud	135		135	
	Almazara	5349	845	6194	
	Total, Castilla León				6329
Madrid	Almazara	29045	494	29539	
	Total, Madrid				29539
Castilla La Mancha	Aceituna de mesa	33		33	
	Almazara	369697	59119	428816	
	Total, Castilla La Mancha				428849
C. Valenciana	Aceituna de mesa	9	37	46	
	Doble aptitud	21	16	37	
	Almazara	77287	17393	94680	
	Total, Comunidad Valenciana				94763
Murcia	Aceituna de mesa	5	40	45	
	Doble aptitud	15	7	22	
	Almazara	20012	8663	28675	
	Total, Murcia				28742
Extremadura	Aceituna de mesa	18997	1078	20075	
	Doble aptitud	631	280	911	
	Almazara	205170	57258	262428	
	Total, Extremadura				283414
Andalucía	Aceituna de mesa	23564	32683	56247	
	Doble aptitud	68899	37288	106187	
	Almazara	909762	558277	1468039	
	Total, Andalucía				1630473
Canarias	Aceituna de mesa	10	16	26	
	Doble aptitud	13	147	160	
	Almazara	20	86	106	
	Total, Canarias				292
Extensión cultivada en España					2697434

Tabla 1. Tabla de Elaboración propia con datos Ministerio de Agricultura (Gobierno de España 2018). Comparativa por Comunidades Autónomas. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivo, 2018

1.2 El procesamiento tradicional de la aceituna y sus alternativas.

1.2.1 Tratamiento tradicional de la aceituna de mesa.

En el sector de la aceituna de mesa, España es el primer exportador mundial, según datos de COI, referidos a 2017, siendo Andalucía, líder en la producción nacional. La comercialización del producto, tanto dentro de la CEE como para exportaciones extracomunitarias viene regulado por el Reglamento (UE) nº 1308/2013. Existen en Andalucía 250 entamadoras (industrias de aderezo) y envasado de aceituna de mesa. De ellas, en torno al 36% son a la vez entamadoras y envasadoras, según datos de la Junta de Andalucía. Consejería de Andalucía y Pesca (2008).

Según la Asociación Española de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa (ASEMESA), y como describen en su web (2019), “se denomina aceituna de mesa al fruto de variedades determinadas del olivo cultivado (*Olea europaea sativa*), sano, cogido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal que, sometido a un determinado proceso de elaboración, proporcione un producto listo para el consumo y de buena conservación”.

Las principales variedades empleadas para la comercialización como aceituna de mesa son: Manzanilla, Gordal, Hojiblanca, Carrasqueña, Cacereña, Aloreña, Verdial, Lechín y Picual, muchas de ellas también dedicadas a la explotación oleícola. Respecto a su coloración, se catalogan en tres tipos, dependiendo del momento de recolección y del proceso de elaboración llevado a cabo:

- ◇ Verdes, recogidas en su punto de maduración y de tamaño normal.
- ◇ De color cambiante. Recogidas antes de su completa madurez. Frutos de color violáceo, rosado o marrón.
- ◇ Negras. Frutos totalmente maduros que según zona de producción pueden tener tintes violáceos o rojizos.
- ◇ Ennegrecidas, que adquieren un tinte negro al someterse a un proceso de oxidación.

Otras variedades con menos repercusión internacional, aunque reconocidas y apreciadas por su gran valor gastronómico son la Kalamata griega, que también se dedica a la extracción de aceite, la Barnea israelita, exclusivamente para verdeo, la Picholine francesa de la Costa azul, muy apreciada, y la Ascola italiana, de características parecidas a la Gordal sevillana (Estrada 2011).

Las principales presentaciones comercializadas son:

- Enteras. Conservan su forma original y mantienen el hueso.
- Deshuesadas. Se les ha extraído el hueso y prácticamente mantienen su forma original.
- Rellenas, deshuesadas y rellenas con ingredientes alimentarios.
- Saladas, deshuesadas y cortadas en gajos, o bien en lonjas (aros de grosor similar).

La aceituna de mesa se recoge generalmente antes de concluir su proceso de maduración. En Andalucía, durante los meses de septiembre y octubre.

Los dos principales procedimientos de elaboración son:

-En el caso de aceitunas verdes, tratamiento alcalino para eliminar el sabor amargo de la oleuropeína, y preparación para su posterior fermentación láctica. Posteriormente, se mantienen en salmuera entre 2 y 4 meses.

-En el caso de aceitunas negras, se conservan directamente en salmuera.

Existen diversos procesos básicos de elaboración: aderezo, curado en salmuera, oxidación, deshidratación, y otros (ASEMESA 2019).

Con relación a los productos autorizados en España para el procesamiento de la aceituna de mesa, “podrá usarse cualquier producto alimenticio empleado como acompañamiento o relleno, tales como agua, sal, vinagre, aceite de oliva, azúcares, especias, plantas aromáticas y sus extractos naturales u otros ingredientes utilizados en alimentación humana autorizados según la normativa europea vigente y en particular, la relativa a los nuevos alimentos.” Real Decreto 679/2016, de 16 de diciembre. (España. BOE num 304; 2016)

1.2.2 Tratamiento tradicional de la aceituna de almazara.

La expansión del olivo, como cultivo agrícola, lleva asociado un desarrollo similar de los procesos de extracción del aceite. Originariamente, y desde la Edad de Bronce, las plantas de producción de aceite se ubicaban dentro de las casas, pues el uso del aceite era sobre todo familiar, y se basaban sobre todo en la formación de pasta de aceituna que se obtenía triturando la aceituna con utensilios duros, como piedra o madera y su posterior mezcla con agua caliente, donde se separaba la fase oleosa, por un proceso de decantación.

Durante el imperio romano, al incrementarse la demanda de aceite de oliva, se desarrollaron métodos de extracción más eficaces, como los tornos de presión, al principio de manipulación humana y posteriormente, apoyándose en la fuerza motriz de caballos o vacas (Kapellakis *et al.*, 2008). Este sistema, se fue modernizando y motorizando mediante prensas hidráulicas, y sistemas de centrifugación. De los subproductos que genera este procedimiento, encontramos una fase sólida, que es el orujo y una fase líquida, el alpechín.

En la década de los 70 del pasado siglo, se comenzó a sustituir el sistema de prensado hidráulico, por el sistema de centrifugación de tres fases. Este sistema se basa en una centrifugación horizontal, en la que, por diferencia de densidad, separan aceite, orujo y agua residual (de ahí la denominación, de tres fases). Este sistema, genera más cantidad de alpechín que el sistema convencional de prensas.

Dos décadas después, debido sobre todo a razones de carácter medioambiental, se fue sustituyendo paulatinamente por el sistema de centrifugación de dos fases. En España, esa sustitución fue mucho más repentina, probablemente porque los problemas sobre el medio ambiente, que motivaron el cambio, fueron más graves (Figura 7).

La principal ventaja del sistema de centrifugación horizontal de dos fases, denominado comúnmente como ecológico, estriba en el menor consumo de agua, hasta 70% inferior. Esto conlleva una menor necesidad de energía para calentarla, y asimismo produce un aceite con un mayor contenido en agentes antioxidantes, siendo, por tanto, más estable frente a fenómenos oxidativos.

Sin embargo, la ventaja más importante de este sistema es que no genera alpechín, que se trata de un efluente líquido, con más problemas medioambientales. El procesamiento de centrifugación de dos fases origina mayoritariamente un subproducto denominado alpeorujo. Se estima que en España se genera anualmente más de 4 millones de toneladas de este producto. (Albuquerque *et al.*, 2004)

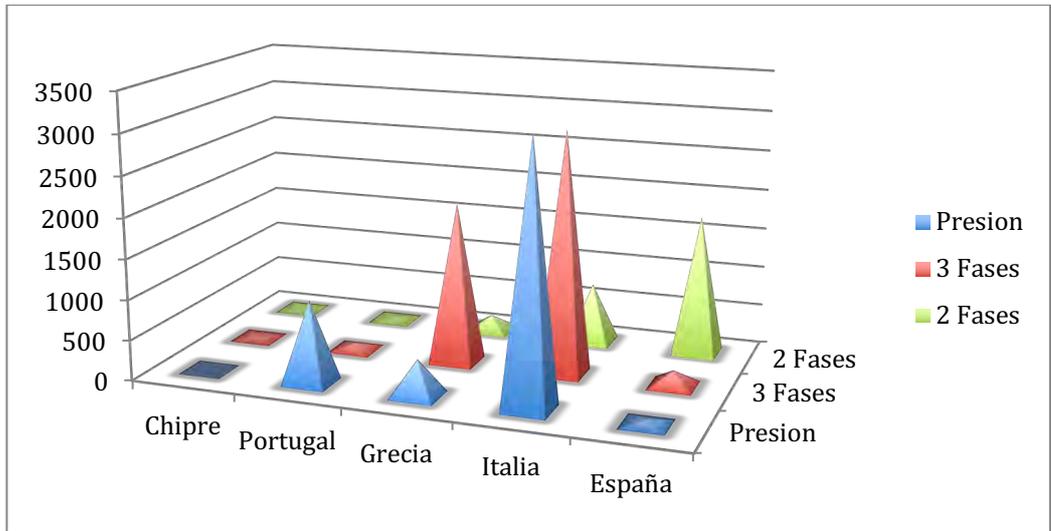


Figura 7. Tipos de extracción oleícola 1999. Número de Almazaras (Mendoza 1999)

En el informe presentado por la European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law (IMPEL), en noviembre de 2003, en que se desglosan los distintos tipos de molturación de aceituna en distintos países productores de aceite de oliva, ya se refleja que, en España, prácticamente la totalidad de los sistemas industriales almazareros son de 2 fases (Figura 8). También Croacia presenta un potente proceso de modernización, mientras el resto de los países productores tienen un proceso más lento, conservando procedimientos clásicos. (Kotronarou y Mendel 2003)

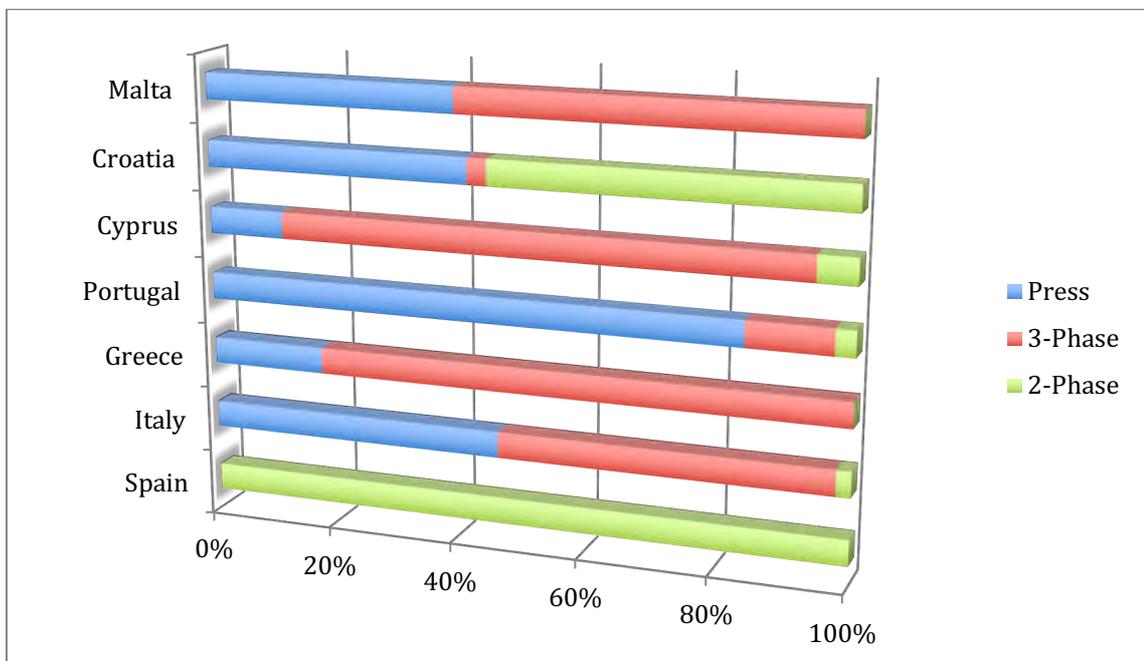


Figura 8. Tipos de molturación de aceituna en países europeos. IMPEL 2003 (Kotronarou y Mendel 2003)

1.2.3 Tratamientos alternativos de la aceituna. Aislamiento y procesamiento del hueso.

Actualmente existe una importante tendencia investigadora sobre el olivo y sus derivados por diversas razones, como se evidencia en el número creciente de proyectos financiados por la Comunidad Europea. En una consulta reciente al Portal CORDIS de la Comisión Europea, encontramos 168 proyectos financiados y recientemente actualizados sobre olivo (<http://cordis.europa.eu>). Esta tendencia se evidencia también en otras entidades potencialmente financiadoras de proyectos de investigación en esta línea.

Indudablemente, esta actividad investigadora dará sus frutos en el futuro. En la actualidad estamos siendo testigos de la implementación de medidas, resultados de investigaciones previas que están provocando innovaciones en el sector.

Los procedimientos tradicionales, por tanto, está sufriendo cambios, en todos los campos, desde la agricultura, cada vez menos dependiente de los caprichos climáticos, la ecología, con la regulación y aprovechamiento cada vez mas eficiente de los subproductos del olivar, como el hueso para combustible, o incluso para fabricación de nuevos elementos para la construcción; el control de las plagas, con la aplicación de técnicas y productos cada vez más eficientes, siempre con una visión económica que lo haga sostenible (Berbel *et al.*, 2018)

Aportamos a continuación unos ejemplos sobre actividades investigadoras, con su consecuente aplicación a la práctica.

- Tesis Doctoral sobre el potencial de la desinfección química del agua de riego para el control de la verticilosis del olivo (Gómez-Gálvez 2018). Estas investigaciones promueven la publicación en la Junta de Andalucía (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural) de Folleto Divulgativo destinado a agricultores, en el que se informa sobre la forma de control de la plaga mediante el uso de productos peroxilados en el riego.
- Tesis Doctoral sobre aprovechamiento del alpeorujo como enmienda orgánica en el olivar (García-Ortiz 2016). En paralelo, se observan ya empresas de compostaje y comercialización de abono de orujo, como se puede apreciar en la web www.olipe.com.
- Empresas innovadoras sobre cosmética, alimentación funcional, uso de subproductos como el hueso, para extracción de semilla, incluso fabricación de aceite, y harina de semilla. (www.elayo.es)

1.3 La semilla del olivo. Estructura, composición y usos. Proteínas de interés alimentario y biotecnológico de la semilla del olivo.

1.3.1 La semilla del olivo.

Como ya hemos visto en apartados previos, España es muy importante a nivel mundial en el cultivo de olivar. Este hecho confiere especial relevancia en su consideración como productor de biomasa, siendo el sector oleícola el principal contribuyente a la biomasa agrícola del país.

La campaña olivarera de 2018 ha alcanzado una producción de 1.339.221 toneladas, según la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (www.juntadeandalucia.es/organismos)

Esta producción genera una serie de subproductos, con importante contenido energético, además de otros productos valorizables (Figura 9).

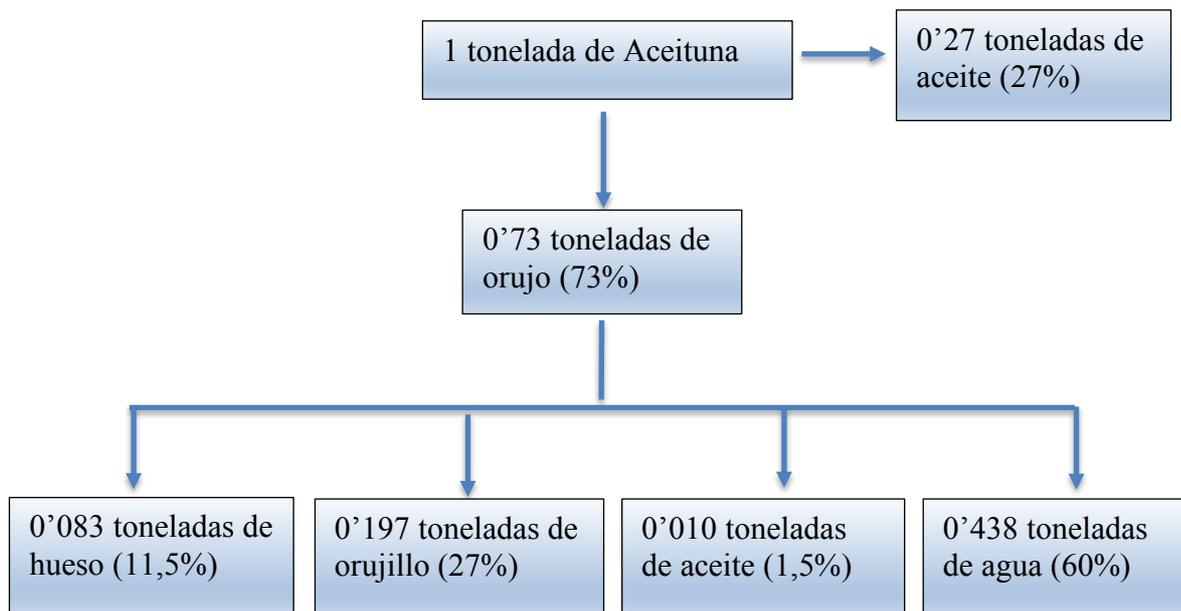


Figura 9. Fraccionamiento industrial de la aceituna. Datos de Agencia Andaluza de Energía, actualizados en diciembre 2018.

Respecto a dichos subproducto, el hueso de aceituna constituye el 15% de la aceituna. La industria de la aceituna de mesa deshuesa aproximadamente el 80% del producto para su comercialización, con o sin relleno. Este procedimiento se lleva a cabo mediante maquinaria deshuesadora, que clasifica, orienta y procesa la aceituna, resultando un subproducto que contiene el hueso en sí, y un cilindro de pulpa denominado tapín, que generalmente se destina a la industria de orujo.

Respecto a la aceituna de almazara, el alpeorujo resultante se destina igualmente a la industria orujera. El 70% del orujo se deshuesa tras la molturación. (Junta de Andalucía. Agencia Andaluza de la Energía 2018). Gran parte del contenido proteico del alpeorujo corresponde a proteínas de almacenamiento, dato que podría abrir una nueva vía de expectativa comercial sobre todo de cara a la nutrición animal (Jiménez JC *et al.*, 2005).

1.3.2 Estructura, composición y usos.

La semilla es la parte reproductiva o germinativa del olivo, aunque como hemos comentado antes, es poco eficiente en ese sentido, y desde el punto de vista agrícola, se prefieren otros sistemas como el de estacas.

Se encuentra dentro de la parte leñosa o hueso de la aceituna, y se compone de una piel o tegumento, una porción rica en nutrientes, que envuelve al embrión, denominada endospermo, y el embrión propiamente dicho, que está constituido por dos cotiledones.

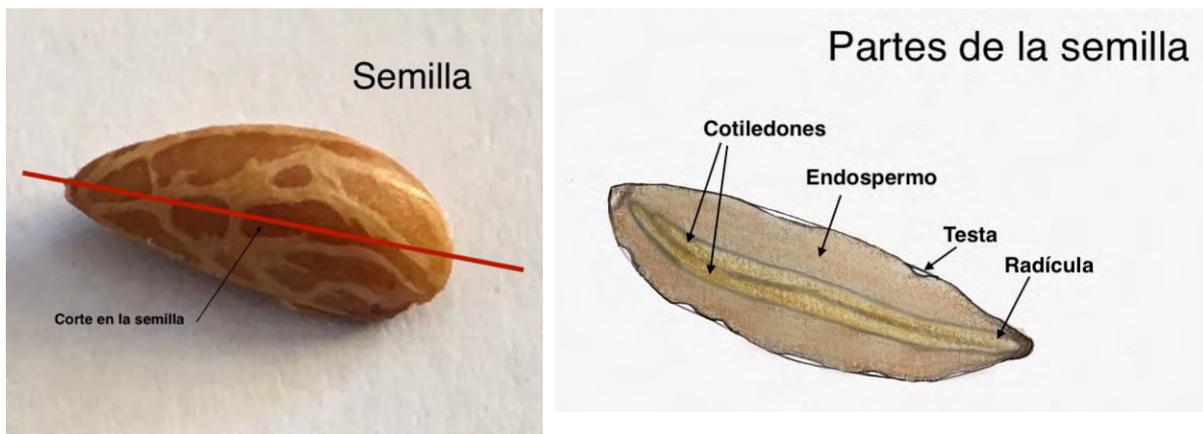


Figura 10. Esquema de la distribución histológica de la semilla de olivo. (basado en Rapaport, 2008)

La semilla puede ser aislada del hueso tras la fractura del endocarpio y su separación. Desde el punto de vista industrial, este sistema se ha llevado a cabo mediante prensas y tamices selectivos, por tamaño y densidad y actualmente hay empresas que usan sistemas mas modernos, que se apoyan en sistemas ópticos para descartar las partículas de hueso.

La semilla tiene una composición nutricional, con alto contenido en fibra (16%), parcialmente insoluble y alta concentración de grasas insaturadas saludables (47.5%). Del total de la grasa, el 67% es ácido oleico, y el 19% son ácidos grasos omega 6, y entre ellos, una alta proporción de eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA). Presenta cantidades elevadas de compuestos fenólicos, hidroxitirosoles, oleuropeína, y destaca la presencia de nuzhenida. No contiene gluten. (Información nutricional en el etiquetado de Semillas Elayo, 2019). Recientemente, un amplio estudio ha refinado el análisis proximal de componentes de la semilla del olivo (Maestri *et al.*, 2019) estableciendo datos más precisos sobre la proporción de fibra/lípidos/proteína (47%/30%/17%), la composición de ácidos grasos, polifenoles etc. Hay estudios que comparan la composición de la semilla de la aceituna con la del alpeorujo, encontrando interesantes similitudes, sobre todo en cuanto al contenido en proteínas de almacenamiento tipo globulinas. (Jiménez *et al.*, 2007) También encontramos componentes de la semilla en el aceite de oliva, sobre todo proteínas, aunque también otros elementos que no siempre le confieren características positivas. (Luaces *et al.*, 2004)

Los sistemas de explotación oleícola mas frecuentes en España utilizan el fruto en su totalidad, y como hemos visto en apartados anteriores, a pesar de que existen sistemas eficientes de deshuesado.

Actualmente existe la tendencia en algunas empresas, de promover y comercializar varios productos innovadores dentro de la línea de explotación del olivo. Todo ello parte de iniciar el proceso con el deshuesado. Para ello se utilizan maquinarias basadas en una modificación mas eficiente del sistema Ulrich (Schlegel 1962). (Figura 11).

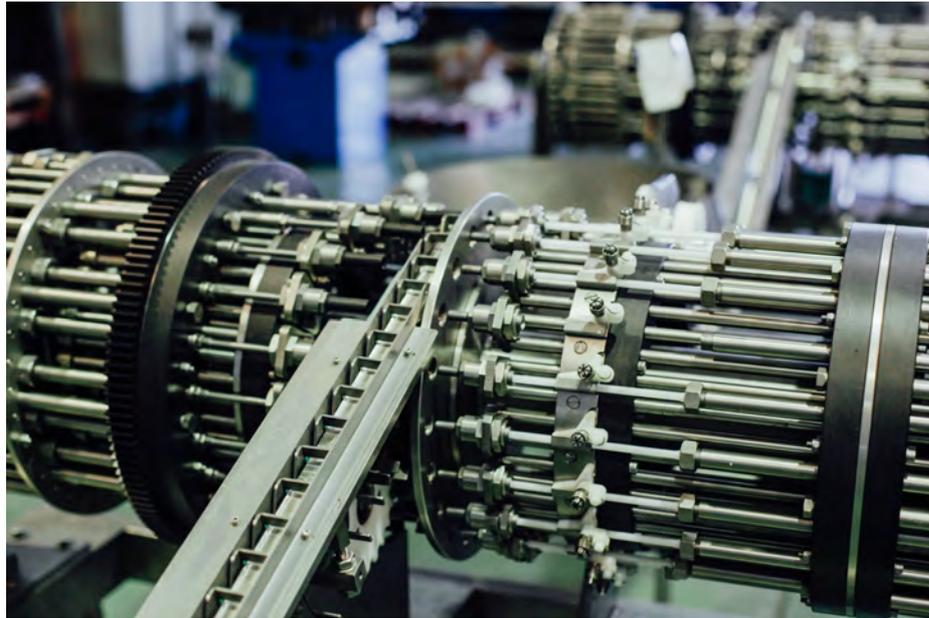


Figura 11. Deshuesadora industrial. Foto de publicidad del Grupo INTEA (www.grupointea.com).

El deshuesado previo permite el procesado de la pulpa, con muchos menos residuos, y otras alternativas de procesamiento como la deshidratación de la pulpa, que también se usa como técnica de estabilización y conservación previa a su comercialización. Así, encontramos en el mercado en la actualidad, aceite de oliva desecado sin hueso, semillas de Olivo, aceite de semillas de Olivo, harina de semilla de olivo, aceites funcionales, productos cosméticos y más.

Respecto al aprovechamiento del hueso, el uso más habitual, al que estamos más familiarizados es a la comercialización como pellet para calefacción. Actualmente se han patentado otros usos como el empaquetado para filtros de carbón activado, fabricación de electrodos para baterías de litio, briquetas de mayor duración para ahumado (Driss 2010); incluso, al combinarlo con resinas, materiales con superficie ultra compacta de madera de propiedades estéticas atractivas, gran dureza y resistencia a la erosión, así como resistencia al calor (www.elayo.es).

1.3.3 Proteínas de interés alimentario y biotecnológico de la semilla de olivo.

Cada vez tienen más trascendencia para la alimentación humana los alimentos de origen vegetal, como muestran las tendencias de consumo. También las recomendaciones de expertos en nutrición han desplazado las recomendaciones de los últimos años hacia un consumo menos abundante en carnes, y de mayor frecuencia en productos vegetales, haciendo hincapié en el consumo de semillas.

Independientemente, o quizás con alguna relación a estas recomendaciones, es cierto que hay un incremento notable en la tendencia investigadora en cuanto a la composición y efectos de las semillas en general, y en particular, del caso de la semilla de olivo que tratamos a continuación. También pueden influir en este aspecto, los avances en técnicas proteómicas, y la tendencia creciente de seguridad alimentaria, en cuanto al conocimiento y minimización de compuestos tóxicos (Rodríguez *et al.*, 2012).

El aceite de oliva, en su composición presenta un componente mayoritario de triacilglicéridos (98% del total), destacando entre ellos el ácido oleico. Además de este componente, una parte minoritaria está constituida por un complejo conjunto de sustancias (unos 230 compuestos

químicos), algunos de ellos volátiles, fenoles, pigmentos como la clorofila, alcoholes alifáticos, hidrocarburos triterpénicos, esteroides y otros (Luchetti 2000), (Lozano *et al.*, 2009).

Está descrito el aporte proteico de la semilla (y su origen tisular concreto), a la composición global de proteínas del aceite de oliva, obtenido mediante el método habitual de molturación completa del fruto (Krebesová *et al.*, 2015). Este estudio describe que el aporte proteico procedente de la semilla es, cuantitativamente, muy superior al que procede del mesocarpio. Muy recientemente se ha conseguido conocer la composición polipeptídica del aceite de oliva (Castro *et al.*, 2020), que contienen mayoritariamente proteínas de almacenamiento de semillas de tipo globulina, además una 13-lipoxigenasa activa, y varias proteínas potencialmente alergénicas entre las que figura el panalérgeno profilina.

El estudio de la estructura celular y subcelular de los tejidos de la semilla permite situar los lugares donde se acumulan los componentes lipídicos y proteicos, localizándose, respectivamente en cuerpos lipídicos y proteicos, mostrando una organización eficiente que se repite en distintos estudios, y que se modifica según el estadio fisiológico de la semilla, por ejemplo, durante su desarrollo (Zafra *et al.*, 2018) y durante la germinación. La composición de la semilla varía según su estado de madurez. Determinados componentes como las oleosinas, localizadas en la superficie de los cuerpos lipídicos (proteínas pequeñas, con funciones diversas, como organizador de formación y estructura de cuerpos lipídicos, un probable papel señalizador), enzimas, como lipasas, con actividad durante el proceso de germinación (Zienkiewicz *et al.*, 2011a, 2011b). Sin embargo, las proteínas más abundantes son proteínas de almacenamiento de semillas de tipo 11S (globulinas).

Según su solubilidad, las proteínas de almacenamiento de semillas (SSP), se clasifican en albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas diluidas), prolaminas (solubles en mezclas de alcohol y agua), y glutelinas (solubles en soluciones diluidas de ácidos o bases) (Alché *et al.*, 2006).

En el olivo, las proteínas más abundantes en la semilla madura pertenecen a la familia de las globulinas 11S (similares a leguminas), que representan aproximadamente el 70% del total. Dichas proteínas, se sintetizan en forma de dos precursores de 41 kDa y 47,5 kDa, que a su vez están formados por varias subunidades, unidas entre sí por puentes disulfuro (Alché *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007).

Recientemente se ha estudiado también la presencia de SSP adicionales en la semilla de olivo, encontrándose globulinas 7S pertenecientes a la familia vicilina. (Jiménez López *et al.*, 2016; Zafra *et al.*, 2016, 2018).

En relación con otros componentes mas minoritarios, como son enzimas (algunas de ellas responsables del aroma del aceite), destacan lipooxigenasas, alcohol-deshidrogenasa, alcohol-acil-transferasa, y otras enzimas relacionadas con el metabolismo de 13-hidroperóxido (Luaces *et al.*, 2004) entre otras (Zienkiewicz *et al.*, 2014).

En la tendencia de evitar en lo posible componentes antinutricionales, se han realizado estudios sobre digestibilidad, alergenicidad, presencia de gluten, en la tendencia a que este conocimiento mejore las características nutricionales y las potenciales propiedades funcionales de este producto. (Zafra 2019, Zafra *et al.*, 2019).

Dentro de las características nutraceuticas de la semilla de olivo, comenzando por el concepto, acuñado por Stephen de Felice en 1989, y sujeto a una serie de regulaciones, como la propuesta por Ziesel (1999): "*I propose to define nutraceuticals as those diet supplementers that deliver a concentrated form of a presumed bioactive agent from a food, presented in a nonfood matrix, and used to enhance health in dosages that exceed those that could be obtained from normal foods*".

Dentro de esta tendencia se encuentran distintos estudios que pretenden detectar y analizar desde las características ultraestructurales y tisulares de los alimentos a sus bases químicas, composición proximal, hasta las propiedades funcionales que se desprenden de ellos, tanto de productos alimentarios clásicos como novedosos, incluyendo los subproductos derivados de su procesamiento y estableciendo en la medida de lo posible el paralelismo entre su estructura y su función (Varzakas *et al.*, 2016)

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) ya está reconocido como alimento funcional *per se*, desde el desarrollo del concepto de dieta mediterránea como alimentación saludable, por (Keys y Grande-Covián 1957). Se desprende que parte de los componentes beneficiosos del aceite de olivo, dependen en parte de la semilla, ya que esta está presente en el proceso de molturación.

La situación actual, es el intento continuado de segregar las propiedades atribuibles a la semilla, por sí sola, como es ejemplo este estudio que presentamos. En esta memoria se describe también la acción favorable de esta semilla sobre la señalización de la insulina en pacientes diabéticos. (Lima-Cabello *et al.*, 2017a).

1.4 Otras semillas de interés alimentario. El altramuz (usos y beneficios).

1.4.1. Generalidades

“Las semillas son la base principal para el sustento humano. Son las depositarias del potencial genético de las especies agrícolas y sus variedades resultantes de la mejora continua y la selección a través del tiempo” (FAO 2019).

Dentro de las semillas alimentarias encontramos un amplio espectro desde el punto de vista botánico, pero globalmente, según contempla la FAO, partimos de las más abundantes en cuanto a cultivo y consumo, que son los cereales, que representan casi la mitad de las calorías consumidas en el mundo. Comprenden varias especies, como trigo blando (*triticum aestivum*), trigo duro (*triticum durum*), cebada (*hordeum vulgare*), avena (*avena sativa*), centeno (*secale cereale*), maíz (*zea mays*), entre cultivos más abundantes en España, para uso en grano como alimentación y también para fabricación de bioetanol (Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019). La comunidad autónoma más productiva, en cuanto a Cereales es Castilla- León, con un 34% de la producción nacional.

Especial importancia tiene el arroz (*oryza sativa* y *oryza glaberrima*), cereal de especial importancia para la alimentación humana, a la que se dedica el 95% de la producción global, siendo básico en la dieta de más de la mitad de la población mundial. (FAO 2019).

Una subespecie, de consumo expansivo, similar a los cereales, pero no herbáceo, son los pseudocereales, como el sésamo, la chía, la quinoa, y otras. Es muy minoritario respecto al consumo global de cereales.

El segundo lugar respecto al consumo mundial, lo representan las leguminosas, que describimos más extensamente a continuación.

Le siguen, las semillas denominadas genéricamente nueces, entre las que se encuentran las nueces de distintas especies, en sentido botánico, como la nuez de macadamia, nuez de castilla, anacardo, y otras semillas, como la almendra, pistacho, bellota, castaña, etc.

Otras variedades, como las gimnospermas, que producen semillas sin flor ni fruto, como es el caso de piñón de distintos pinos, semillas de otras coníferas, castaño japonés y otras.

Existen otras especies, que no encajan en la clasificación anterior, y de gran interés alimentario, como el café, chocolate, semillas de girasol, etc.

1.4.2. Leguminosas.

Las Leguminosas o Fabáceas son una familia de amplia distribución en el planeta, con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies. Junto a los cereales y algunas frutas y raíces, han sido la base de la alimentación humana durante milenios.

Dentro de ellas, la división más grande y diversa de la familia, la constituyen las Faboideas o Papilionoideas, con 476 géneros y 13.860 especies. Se extienden por todos los continentes excepto las regiones árticas e incluye a las leguminosas, más comúnmente usadas como alimento o forraje (Gepts *et al.*, 2005). Comprende muchas plantas útiles y muy conocidas como el garbanzo (*Cicer arietinum*), frijol o judía (*Phaseolus vulgaris*, *lunatus*, y *acutifolius*), haba (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*), lenteja (*Lens culinaris*), altramuz (*Lupinus albus*).

La lenteja fue probablemente una de las primeras especies en ser domesticadas. Las legumbres son muy ricas en proteínas, carbohidratos y fibra, mientras que el contenido en lípidos es relativamente bajo, y los ácidos grasos que los componen son insaturados. Una gran excepción a esa regla es la soja, con gran contenido lipídico.

Debido a sus especiales características nutricionales y sus propiedades beneficiosas para la salud, especialmente en personas diabéticas, el altramuz forma parte de una línea de trabajo prioritaria dentro de nuestro grupo de investigación, por lo que lo consideramos en un apartado independiente.

1.4.3. Altramuz.

Dentro de las leguminosas, un género botánico destacado es *Lupinus*. Son especies originarias del mediterráneo (subgénero *Lupinus*) y de América (subgénero *Platycarpos*). Reciben el nombre familiar de altramuz, chocho, tremosos, lupin; existen unas 300 especies conocidas. Ya se cultivaba el lupinus en granjas del mar Egeo, 400 años antes de Cristo, con fines nutricionales y medicinales. (Prusinski 2017)

Son plantas de tallo erecto, y miden entre 0'5 y 2 metros de altura, de número impar de foliolos. Hay especies que se cultivan con propósitos ornamentales, teniendo éstas, flores organizadas en largas inflorescencias, con pétalos de color blanco a azulado o rosado. Sus frutos son legumbres con semillas de forma esférica achatada.

De la gran variedad de *lupinus*, sólo 5 especies son cultivadas. Se trata de las especies *albus*, *luteus*, *consentanii*, *angustifolius* y *mutabilis*. La producción de altramuz en España se mantiene constante durante la campaña 2018-19, aunque sigue siendo poco significativa a nivel global. Representa 3,2 miles de Toneladas, que se producen prácticamente entre ambas Castillas, más en Castilla León, aunque en ésta última campaña, levemente superada por Castilla La Mancha. A nivel mundial, en esta campaña, la producción se ha incrementado levemente. El primer productor mundial es Australia, seguida de la Unión Europea (Polonia produce el 70% de la UE), y a continuación Rusia. (Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2019).

Independientemente de sus usos alimentarios, se han descubierto propiedades asociadas a algunas de sus conglutinas ($\beta 1$ y $\beta 6$) como antifúngico contra determinadas plagas (Jiménez-López JC *et al.*, 2016).

En los últimos 20 años se han descubierto propiedades novedosas del altramuz blanco, que le confieren gran interés en la aplicación de diferentes tipos de alimentos funcionales. Gran componente proteico, ácidos grasos con una proporción deseable de omega 6/omega 3, y fibra, así como otros componentes específicos como polisacáridos, antioxidantes y carbohidratos sin almidón, por lo que se le presuponen interesantes propiedades nutricionales como regulador fisiológico,

mejorando parámetros de control en hipertensión arterial, diabetes, resistencia a la insulina y cáncer colorectal. (Prusinski 2017)

Las semillas de altramuz en general contienen una cantidad variable de alcaloides, con algo de toxicidad y que le confieren un sabor especialmente amargo. Es por eso, que determinadas especies son más cultivadas que otras (las más apreciadas son el *lupinus albus* y *angustifolius* y *luteus*, por su bajo contenido en alcaloides). Tradicionalmente, la neutralización de estos alcaloides, al menos parcialmente, se realizaba con enjuague múltiple con agua, lo que eliminaba parte de las proteínas solubles, o bien la preparación en salmuera.

Entre sus propiedades más beneficiosas para la salud, se encuentran, la mejora en el control de la presión arterial, y por tanto del riesgo cardiovascular. (Belski *et al.*, 2010)

Presentan resultados cada vez más prometedores, las propiedades de las semillas del género *lupinus*, (*albus* y *angustifolia*), respecto a la mejora en los parámetros de control de la diabetes. (Dove *et al.*, 2011) (Lima Cabello *et al.*, 2015,2017b)

1.5 Propiedades beneficiosas del aceite de oliva.

Podríamos decir que el término “Dieta Mediterránea” se acuñó en la década de los 60 del siglo XX, a partir de un estudio epidemiológico que comparaba patrones de alimentación y estilos de vida en siete países del mundo. Este estudio estuvo coordinado por Ancel Keys, y se basó en hallazgos previos de mayor longevidad poblacional en países como Grecia, sur de Italia y España (Keys y Grande-Covián 1957). Se denominó Seven Countries Study (SCS) (www.sevencountriesstudy.com). Es un estudio diseñado para evaluar condiciones de salud a través de estudios de cohortes basados principalmente en modelos de nutrición y su influencia en la presentación o no, de eventos cardiovasculares (Keys *et al.*, 1986). En este estudio se describe la dieta mediterránea como una tendencia nutricional en la que el aceite de oliva es prácticamente la única grasa usada, hay un alto consumo de frutas y nueces, vegetales, legumbres, pescado y cereales. Moderadas o bajas cantidades de vino tinto, y escasa ingesta de carnes rojas. Esta tendencia investigadora dio lugar a que rápidamente se evidenciaran las propiedades saludables de muchos alimentos, como las nueces y el aceite de oliva, que inmediatamente fueron considerados como funcionales (Aranceta *et al.*, 2011a).

La investigación en ese sentido ha ido mejorando su evidencia en los últimos años, sobre todo gracias a estudios de intervención, en gran medida liderado por el estudio PREDIMED, diseñado en nuestro país (Estruch *et al.*, 2013). En este estudio se incluyeron 7447 sujetos, sin eventos cardiovasculares, aunque pertenecían a grupos de riesgo como diabetes, e hipertensión arterial. Se repartieron en tres grupos de intervención. A uno se le aplicó una dieta baja en grasa, y los otros dos grupos, ambos con dieta mediterránea, y a su vez uno de ellos suplementado con aceite de oliva y otro con nueces. Antes los 5 años de seguimiento, se evidenció que los dos grupos de dieta mediterránea habían sufrido una reducción de un 30% en el riesgo relativo de sufrir un evento cardiovascular desfavorable. Sobre ese modelo de investigación se asentaron otros estudios basados en prevención primaria. Como ejemplo, se encuentra evidencia de que el consumo de AOVE, junto a ejercicio físico, previene sobre la aparición diferida de diabetes (Salas-Salvadó *et al.*, 2014). Estos factores, junto a pérdida de peso, se están teniendo en cuenta en otro estudio actualmente en marcha, el PREDIMED plus.

Este tipo de estudios sobre intervención nutricional, van cambiando las recomendaciones nutricionales, actualizándolas continuamente, y resumiéndolas para hacerlas manejables por la

población general (Aranceta *et al.*, 2011b), como es el caso de las pirámides de alimentación saludable (Aranceta *et al.*, 2016).

Las continuas investigaciones descritas sobre nutrición recomendable han ido consolidando y reforzando la recomendación de consumo de aceite de oliva, como beneficioso para la salud, siempre basados en estudios sobre uso/beneficio y su proyección sobre prevención de eventos desfavorables.

Partiendo de la premisa de que la hipertensión arterial es el factor predisponente más importante, en cuanto a aparición de eventos cardiovasculares desfavorables, junto a tabaquismo e IMC elevado, en 2005 se publicó un estudio que describe las propiedades de la dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, comparándola con otros dos tipos de dieta (hiperproteica e hipercarbonatada) en cuanto a la mejoría de las cifras tensionales y del perfil lipídico. (Appel LJ *et al.*, 2005).

Se describen también efectos protectores de la dieta mediterránea frente al cáncer (Schwingshackl L *et al.*, 2017)

Sin embargo, y siguiendo la tendencia creciente de investigación en nutrición y nutracéutica, surgieron numerosos estudios que pretenden encontrar una explicación más técnica de esas propiedades, muchas veces realizados *ex vivo*, y casi siempre basándose, en avanzadas técnicas de laboratorio, gracias a la expansión de métodos de investigación proteómica y genómica. Estas tendencias están permitiendo grandes avances, tanto en la investigación de componentes estructurales de alimentos conocidos, como de nuevas tendencias alimentarias, como el caso del consumo de semillas de olivo, que constituye uno de los apartados de esta tesis.

Esta tendencia ha dado lugar a estudios, como decíamos, no solo de composición, sino de interacción de esos compuestos en el organismo, como el caso del hallazgo de que la oleuropeína presente en aceite de oliva, module la inducción inflamatoria en pacientes alérgicos al polen de olivo (Lima-Cabello *et al.*, 2018b). Parte de los resultados de esta tesis se basan en esa tendencia investigadora.

En cuanto a la dieta mediterránea, se describen ya innumerables hallazgos, beneficiosos para la salud; sirvan como ejemplo, la concentración disminuída de lipoproteínas aterogénicas (Jones 2012), o reducción de la inflamación de bajo grado (Camargo *et al.*, 2011).

En referencia al aceite de oliva, presenta un perfil saludable de ácidos grasos, a lo que se une la presencia de compuestos fenólicos con propiedades biológicas favorables (Lopez-Miranda *et al.*, 2010) (Covas *et al.*, 2009), tiene un efecto antiagregante plaquetario (de Roos B *et al.*, 2011). Aumenta los niveles de HDL colesterol, y actúa sobre el endotelio vascular (Sánchez Rodríguez *et al.* 2018)

Partiendo de ensayos de intervención, mediante exposición alimentaria a tres tipos de aceites de oliva, uno de ellos, de extracción convencional y otros dos, optimizado y funcional mediante la adición de componentes bioactivos, y comparándolos entre sí y con aceite de girasol, se está llevando a cabo el estudio NUTRAOLEUM (Biel *et al.*, 2016). Este ensayo, ampliado en uno de los objetivos de esta tesis, concluye sin lugar a duda, los importantes beneficios del aceite de oliva y de algunos componentes estudiados, que podrían mejorar en el futuro, esa parcela de la industria alimentaria, al demostrar los efectos beneficiosos de determinados componentes bioactivos como son los triterpenos (ácido oleanólico y maslínico).

En ese sentido, se han realizado estudios en que se desglosan diferentes componentes bioactivos del AOVE, relacionándolos con biomarcadores de estrés oxidativo y de inflamación (Sánchez-Rodríguez E *et al.*, 2019)

Hay estudios que describen los beneficios de distintos componentes de la semilla de olivo en cuanto al efecto antiinflamatorio sobre células pancreáticas *in vitro*, tanto en controles (Lima-Cabello *et al.*, 2018a), como en pacientes diabéticos (Lima-Cabello *et al.*, 2017b, 2017c)

La evidencia favorable en cuanto a salud del aceite de oliva, se resumió recientemente en la III conferencia internacional sobre aceite de oliva virgen, y salud, del que salió un documento de consenso de reciente publicación (Gaforio *et al.*, 2019).

1.6 Propiedades beneficiosas del consumo de semillas.

Con relación a las recomendaciones nutricionales, y como hemos comentado en apartados previos, cada vez existe mas evidencia de la conveniencia del consumo de vegetales. A eso se une una mayor inversión económica a nivel global, una eficiencia cada vez mayor en cuanto a la producción, y una mayor conciencia respecto al equilibrio ecológico. Se describen sin dudar las propiedades saludables de la fruta y las hortalizas y resto de verduras comestibles, como hemos referido en apartados previos (Aranceta *et al.*, 2016).

En cambio, el apartado que nos ocupa, el consumo de semillas tiene menos evidencia científica que avale sus propiedades saludables, si bien la literatura científica publicada avala sus beneficios para la salud. Se trata de un grupo muy poco homogéneo de productos, en los que mezclamos muchas veces clasificaciones biológicas, con consideraciones económicas, incluso gastronómicas. Desde el punto de vista técnico las semillas son embriones vegetales envueltos por la cáscara, mas o menos leñosa. La semilla sería en principio, capaz de germinar produciendo una nueva planta. Es frecuente considerar las semillas juntamente con los frutos secos, sobre todo desde el punto de vista gastronómico. Como ejemplo diferenciador, los pistachos y almendras, sí serían semillas, y las nueces son frutos.

Simultáneamente a la realización del estudio PREDIMET (Estruch *et al.*, 2013), que aporta evidencia sobre los beneficios del consumo de Nueces, se llevó a cabo otro estudio, que aporta evidencia sobre los beneficios para la salud cardiovascular del consumo de semillas (Ros E y Hu F 2013). Es de reseñar un estudio conjunto sobre frutos secos y semillas, que aporta evidencia sobre protección de la inflamación vascular (Jiang *et al.*, 2006)

Recientemente se están estudiando las capacidades de determinadas proteínas de la semilla de lupino de hoja estrecha como regulador del metabolismo de los glúcidos y su capacidad para controlar la resistencia insulínica en células pancreáticas (Lima-Cabello *et al.*, 2019b, 2018c)

Es por eso, por lo que la literatura científica está muy dividida en cuanto a la segregación por cada uno de los elementos, dada la gran variabilidad de productos respecto o su origen y usos.

El uso tradicional de las semillas, desde las mas habituales, o clásicas, como los cereales (avena, arroz, cebada...), legumbres (habas, soja, lupinos...), semillas oleaginosas como el girasol, o incluso brotes germinados como el berro, se ha ido simultaneando con usos menos habituales, quizás influidos por la tendencia cada vez más cosmopolita de la cocina. Como ejemplo el uso de semillas de lino y amapola desecadas, los pseudocereales como la quinoa, la chía o el sésamo. El procesamiento también es muy variables, desde la fabricación de aceite (semillas de girasol, como ejemplo más inmediato) o incluso aceites más sofisticados como el aceite de semilla de argán, de uso culinario (M'rani-Alaoui M *et al.*, 2019) o al uso de lino como pienso animal, que mejora las características del producto final.

En cuanto al aceite de girasol, tiene un efecto hipocolesterolémico significativo, asociado a su gran concentración de esteroides vegetales, uno 725 mg/100gr. (Palou *et al.*, 2005)

Referente a las propiedades beneficiosas del consumo de semillas y frutos secos, se diseñó un estudio comparativo por cohortes en 10 países Europa, que aporta evidencia sobre sus beneficios para la salud. (Jenab M *et al.*, 2006)

Respecto a las propiedades de las semillas y nueces, y en relación con la prevención de cáncer, la agencia European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC), promovió un estudio que concluye que la asociación del consumo de nueces y semillas ayuda a prevenir la aparición de cáncer colorectal. (Jenab M *et al.*, 2004).

Como contrapunto a los efectos beneficiosos de las semillas en nutrición, tenemos que describir posibles intolerancias, como la celiaquía, que es una enteropatía de mecanismo inmunitario, desencadenada por el consumo de gluten en personas genéticamente predispuestas, y cuyo tratamiento consiste en eliminar el gluten (cereales con gluten, trigo, cebada, centeno, avena, kamut, espelta y variedades híbridas) de la dieta (Mascort J y Carrillo R 2019).

Se describen también alergias a determinados elementos de las semillas, generalmente proteínas, muchas veces de causa desconocida, que pueden ocurrir también por causa no alimentaria, como manipulación de harinas. Describimos estudios respecto a semillas de lupinus como inductores de alergenidad (Lima-Cabello E *et al.*, 2017d, 2019a)

1.7 Marcadores fisiológicos y patológicos utilizados para evaluar la capacidad nutricional y nutracéutica de componentes agroalimentarios.

Aunque en apartados anteriores hemos expresado las propiedades beneficiosas para la salud de muchos alimentos, gran parte de esta evidencia se basa en el consumo de estos nutrientes de forma tradicional.

Habría que reseñar que el alimento en sí contiene partes que le podrían conferir algún efecto indeseable, como podría ser mal sabor, problemas de digestibilidad, alergias, y otros factores negativos. Por otra parte, partes del alimento que podrían ser deseables por sus cualidades nutritivas, no se aprovechan suficientemente, por distintas causas, como puede ser que estén protegidas por estructuras leñosas, o que en el proceso de manufacturado se destruyan o incluso, que no se cocinen adecuadamente.

Es por eso, que cada vez tiene más importancia el conocimiento profundo de la estructura y propiedades de los alimentos. Para ello, y desde hace años, existen distintas líneas de investigación que aportan conocimiento sobre la estructura, y cada vez más, sobre la ultraestructura organizativa de los alimentos de forma global. Sirvan como ejemplo los trabajos de identificación de proteínas de almacenamiento en semilla de olivo (Castro-López AJ *et al.*, 2007), o la identificación de proteínas en lupinus y su potencial alergenidad cruzada con otras semillas (Jiménez-López *et al.*, 2015, 2016a, 2018).

La tendencia investigadora actual, y con una trayectoria de evidencia publicada durante las últimas décadas, consiste en el análisis de escenarios de señalización de diversos parámetros, generalmente basados en la detección y cuantificación de citocinas. Así se puede analizar las respuestas a innumerables estímulos, como toxinas, fármacos, alérgenos, o en otro sentido, a productos que modulen positivamente la señalización detectada. Este paradigma permite estudiar desde eventos ya producidos como puede ser una inflamación *in vivo*, mediante determinación en muestra biológica, (Ansar W y Ghosh S 2013) o inducciones generadas en animales de experimentación y evidenciar que tipo de respuesta se ha producido, o escenarios *ex vivo*, donde es factible evaluar una exposición potencialmente tóxica, o de toxicidad desconocida.). Recientemente se ha introducido la modalidad de cultivos de sangre completa, incubada con sustancias “challenge” o desafío, tecnología diseñada para poder medir un un gran número de citocinas en un volumen relativamente pequeño de muestra (Medzhitov R 2010), como se desarrolla en la presente tesis

Las citocinas son polipéptidos. Las secretan distintas células, sobre todo las relacionadas con el sistema inmunitario, en relación con antígenos, o bien moléculas que se identifican como asociadas a patógenos. También responden a otras citocinas. (Porter *et al.*, 2020).

Las principales categorías de citocinas son:

- Quimiocinas, relacionadas con la atracción y migración de leucocitos.
- Factores estimulantes de Colonias Hematopoyéticas.
- Interferones, inhiben la replicación viral y otras funciones.
- Factores de Necrosis Tumoral (TNF-alfa, linfotóxina-alfa y linfotóxina-beta)
- Interleucinas (IL), cada vez más estudiadas, y descritas sus múltiples funciones.
- TFG, proinflamatoria.

El estudio de las interacciones moleculares de cada una de estas moléculas es compleja y constituye en gran medida el concepto de estudio de la inmunología (Male D *et al.*, 2014).

Describiremos, pues, en este apartado, una aproximación a las moléculas utilizadas en este trabajo.

- Interleucina 1 (IL 1), producida por linfocitos B, células dendríticas, células de endotelio, macrófagos, monocitos y linfocitos NK (natural killer). Actúa provocando la coestimulación de linfocitos T mediante la activación de otras citocinas como IL-2. Retroalimenta linfocitos B, provocando proliferación y maduración. Retroalimenta a los linfocitos NK, haciéndolos más citotóxicos. Induce asimismo la producción de IL 1, IL 6, con lo que se induce la producción de reactantes de fase aguda en hígado (Proteína C reactiva-PCR) IL 8, TNF, GM-CSF y PGE. En el caso de la IL-1 β es una citoquina pro inflamatoria que liberan especialmente los monocitos y los macrófagos ante daño celular o infección. Actúa sobre el SNC provocando fiebre. La usamos como marcador en estudios sobre la inflamación subclínica en diabetes tipo 2 (Dinarello CA y van der Meer JWM 2013).
- Oxido nítrico sintasa inducible (iNOS); Inducida por citocinas inflamatorias, la iNOS combina el oxígeno con guanido nitrógeno de la L-arginina, para dar lugar al Oxido Nítrico NO, que es tóxico para bacterias y células tumorales. En este trabajo se utiliza preferentemente como marcador del daño oxidativo provocado por especies de oxígeno reactivo (ROS), en cultivos de células pancreáticas expuestas a harinas de semilla de olivo (Marquez-Estrada L 2016)
- Factor de Necrosis tumoral (TNF), que a su vez induce la producción de otras citocinas, como IL 1, GM-CSF, IFN gamma, e induce la selectina E en el endotelio vascular. Se ha utilizado como marcador en evaluación de daño provocado por ROS en pacientes diabéticos (Saibandith B *et al.*, 2017)
- Interleucina 2 (IL 2) producida por la célula T, induce más células T y B activadas. Elimina células extrañas mediante activación de monocitos y macrófagos.
- Interleucina 4 (IL 4) Regula negativamente la producción de IL 12. Induce cambios en la Ig G e IgE, está implicada, junto a IL 13 en la producción de IgE en la alergia atópica.
- Interleucina 5 (IL 5) Induce proliferación de eosinófilos y linfocitos B activados. Induce cambios en IgA.
- Interleucina 6 (IL 6), producida por fibroblastos, macrófagos monocitos y otras células, inducen la diferenciación de células B en células plasmáticas. Inducen reactantes de fase aguda, y tiene actividad pirógena. Lo hemos usado como marcador de inflamación. (Muriana FJG *et al.*, 2017)

- Interleucina 7 (IL 7) Diferenciación de células madre y Activación de linfocitos T maduros.
- Interleucina 8 (IL 8) media la quimiotaxis y activa neutrófilos.
- Interleucina 10 (IL 10) importante por su uso clínico en supresión de respuesta inmunitaria patogénica en la alergia y enfermedades autoinmunes.
- Interleucina 12 (IL 12) Fundamental en la diferenciación de tipos celulares de linfocitos.
- Interleucina 13 (IL 13) Inhibe la activación y secreción de citocinas por macrófagos. Induce cambios en IgG e IgE, Induce cambios en el endotelio vascular.
- Interleucina 17 (IL 17) tiene acción pro- inflamatoria, Estimula la producción de TNF, IL 1 beta, IL 6, IL 8 y G-CSF.
- Interleucina 37 (IL 37). Recientemente se han descubierto nuevas citocinas, relacionadas con IL 1, pero con unas nuevas características y funciones, que podrían generar nuevos estudios respecto a inflamación. Se trata de la IL 37 (Boraschi *et al.*, 2011), de la que emergen estudios sobre su funcionalidad y participación en la enfermedad (Jia H *et al.*, 2018).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La hipótesis de partida que se pretende demostrar consiste en que diversos preparados de las industrias almazareras y de las industrias alimentarias poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y beneficiosas sobre el sistema inmune y diversas patologías metabólicas. Estos preparados incluyen por una parte un AOVO sometido a procesos de optimización tecnológica para incrementar su valor biológico, y por otra parte harinas de semillas de olivo procesadas para incrementar su contenido en componentes no lipídicos, así como proteínas purificadas de altramuz de tipo β -conglutina.

Objetivos:

Objetivo 1

Evaluar los beneficios de la administración de tres aceites de oliva virgen extra (AOVE) con distinto contenido en compuestos bioactivos sobre biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación en adultos sanos.

Objetivo 2

Determinar el efecto harinas de semillas como “challenge” en sistemas in vitro de cultivos de citoquinas de sujetos sanos, mediante la identificación y cuantificación de moléculas marcadoras de actividad antiinflamatoria.

Objetivo 3

Valorar los efectos de las conglutinas purificadas de altramuz sobre la ruta de señalización de la insulina y la inflamación basal de pacientes diabéticos tipo 2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Preparación de los aceites del ensayo NUTRAOLEUM.

Los aceites de oliva fueron preparados especialmente para el ensayo clínico NUTRAOLEUM, como se describe en Biel *et al.*, (2016). Básicamente se utilizó como base un aceite de oliva virgen extra (VOO), producido a partir de olivos de la variedad 'Picual'. Los aceites generados poseen una composición similar en el componente graso y de micronutrientes (por ejemplo, vitamina E, sitosteroles etc.), con excepción del contenido en fenoles/triterpenos. Se usó como control un aceite VOO obtenido por procedimientos tradicionales. A continuación, se generó un aceite virgen extra optimizado (OVOO) mediante mezcla de los mejores aceites de oliva de varias variedades de olivo con alto contenido fenólico y triterpénico, usando igualmente procedimientos de extracción optimizados. Finalmente se generó un aceite de oliva funcional (FOO), rico tanto en componentes fenólicos como triterpénicos, mediante la adición de un extracto de ácidos oleanólico y maslínico al OVOO. Estos extractos fueron obtenidos desde la piel de la aceituna mediante procedimientos físicos. Las características de los tres aceites de oliva utilizados se muestran en la Tabla 2

Tabla 2. Características de los aceites de oliva administrados (Extraído de: Sánchez-Rodríguez *et al.*, *Nutrients* 2018, 10,626).

	VOO	OVOO	FOO
Fatty Acid Profile (%)			
C18:0	2.3	2.2	2.1
C18:1n9	78.9	78.2	78.4
C18:2n6	6.6	6.8	6.9
C18:3n3	0.6	0.7	0.7
C20:0	0.4	0.4	0.4
C20:1	0.3	0.4	0.4
C22:0	0.1	0.1	0.1
C24:0	<0.1	<0.1	<0.1
Total phenolic compounds (ppm)	124	490	487
Hydroxytyrosol and derivates	105	424.0	423.0
Lignanes	18.2	61.3	59.2
Flavonoids	0.7	3.4	3.2
Simple phenols	0.0	0.9	0.9
Total triterpenes (mg/kg)	86.5	86.3	388.8
Maslinic acid	47.3	47.3	217.7
Oleanolic acid	39.2	39.1	171.1
Ursolic acid	<10	<10	<10
α -tocopherol (ppm)	174	183	176
Squalene (mg/100 g)	529.2	536.2	545.5
Total pigments (ppm)	15.73	17.59	16.78
Total carotenoid pigments (ppm)	7.08	6.79	6.97
Total sterols (ppm)	1437	1396	1460

FOO, functional olive oil; OVOO, optimized virgin olive oil; VOO, virgin olive oil.

3.1.2 Preparación de las harinas de semillas de olivo.

Para la preparación de harinas de semilla se utilizó el procedimiento descrito por Zafra *et al.*, (2013). Básicamente, se utilizaron semillas de olivo de la variedad 'Picual', cedidas por las empresas Elayotecnia S.L. (Castillo de Locubín, Jaén) y almazara “el Picón” (Albanchez de Mágina, Jaén). Estas semillas fueron obtenidas a partir de aceitunas maduras mediante deshuesado y posterior fractura y separación de los endocarpos (Fig. 12). El material se conservó a -20°C hasta su uso. Para la preparación, desengrasado y pre-tratamiento de la harina de semilla de olivo, se trituraron 40 g de semillas, y la harina resultante fue desengrasada utilizando hexano (Figura 12 C de la misma) (Sánchez-Vioque *et al.*, 1998 con ligeras modificaciones). Brevemente, el triturado se agitó con 100 ml de hexano durante 20 min y continuación se eliminó la fase superior (hexano). Este proceso se repitió otras 3 veces más, dejándose secar finalmente el triturado resultante. A continuación, se realizaron 4 lavados de 20 min con agua mediante agitación y posterior filtración. Finalmente, la harina se lavó con etanol al 20% (v/v) y se dejó secar.



Figura 12: Semillas maduras de *O. europaea* cv. 'Picual' y productos de su transformación.

A: semillas resultantes del deshuesado de aceitunas maduras. B: almendras obtenidas tras la ruptura y separación del endocarpo. C: pasta oleaginosa generada mediante triturado de las semillas. D: harina resultante del desgrasado de la pasta mediante tratamiento con hexano y posterior secado de la muestra. Reproducido de Zafra *et al.*, (2013).

3.1.3 Preparación de proteínas recombinantes de *Lupinus*.

Se prepararon 5 proteínas recombinantes correspondientes a β -conglutinas de altramuz como se describe en Lima-Cabello *et al.*, (2018d). En resumen, se generaron 5 genes sintéticos (GenScript) correspondientes a las conglutinas β 1, β 2, β 3, β 4 y β 6 de *Lupinus*, sobre un vector para expresión bacteriana modificado a partir de pET28a (+), asociado a un “tag” de expresión de tipo 6xHis. Las secuencias utilizadas como base corresponden a las entradas HQ670409, HQ670410, HQ670411,

HQ670412 y HQ670414 (GenBank). Las 5 formas de conglutina fueron expresadas en células competentes 2(DE3) Rosetta™ pLysS Singles™ (Novagen), mediante un método de autoinducción (Jiménez-López *et al.*, 2016b). La purificación de las conglutininas recombinantes se realizó a partir de los precipitados bacterianos, y la pureza de las proteínas recombinantes se determinó como superior al 95%, con rendimientos entre 10-25 mg/ml de cultivo. La concentración proteica se determinó mediante reactivos comerciales (Bradford -Pierce- y Protein Assay -ThermoFisher-).

3.2 Métodos.

3.2.1 Descripción del ensayo clínico Nutraoleum

Las características detalladas referentes al ensayo clínico Nutraoleum se describen en Biel *et al.*, (2016), así como en varios trabajos emergentes de dicho estudio (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018, 2019). En resumen, se trata de un estudio aleatorizado, doble ciego, cruzado, controlado y multicéntrico. El análisis se realizó en los hospitales “Virgen de las Nieves” y “San Cecilio”, ambos pertenecientes al Servicio Andaluz de Salud y localizados en Granada.

Aparte de un estudio paralelo de biodisponibilidad de nutrientes, el ensayo fundamentalmente utilizado en este trabajo consistió en un consumo continuado para evaluar los efectos de polifenoles y triterpenos contenidos en tres aceites de oliva diferenciales como se indica en el apartado correspondiente.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: individuos entre 20-60 años, saludables en el examen físico básico y bioquímico de rutina, así como en sus parámetros hematológicos, que aportaron consentimiento informado escrito para adherirse al protocolo.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: fumadores, consumidores de suplementos antioxidantes, aspirina u otras drogas con propiedades antioxidantes establecidas, hiperlipidemia, obesidad con índice de masa corporal (IMC) mayor de 30 kg/m², diabetes, hipertensión, enfermedad celíaca u otra enfermedad intestinal, o condiciones limitantes de su movilidad, o enfermedades graves.

Los pacientes fueron reclutados en la ciudad de Granada a través de anuncios en fuentes y centros públicos. Se estimó como objetivo de reclutamiento una muestra de 54 pacientes totales en igualdad de género.

Se aleatorizó el consumo diario de tres tipos de aceite (VOO, OVOO y FOO -ver apartado de materiales-) en tres grupos de pacientes, sobre una base de consumo de 30 ml/día por paciente. Los aceites se administraron a lo largo de periodos de tres semanas, precedidos por dos semanas de lavado, consistente en el consumo exclusivo de aceite de girasol como grasa alimentaria.

Se mantuvo un control dietético de forma previa al ensayo y a través de éste a través de encuestas nutricionales. Las tomas de muestras se realizaron en ayunas, al comienzo del estudio (línea de base) y al inicio y final de cada una de las fases de intervención/lavado (Figura 13).

Para los análisis de cultivo e inducción *ex vivo* realizados, se extrajeron alícuotas de sangre de los pacientes (3 ml) usando tubos de heparina-Li (BD Vacutainer System, Heidelberg, Alemania).

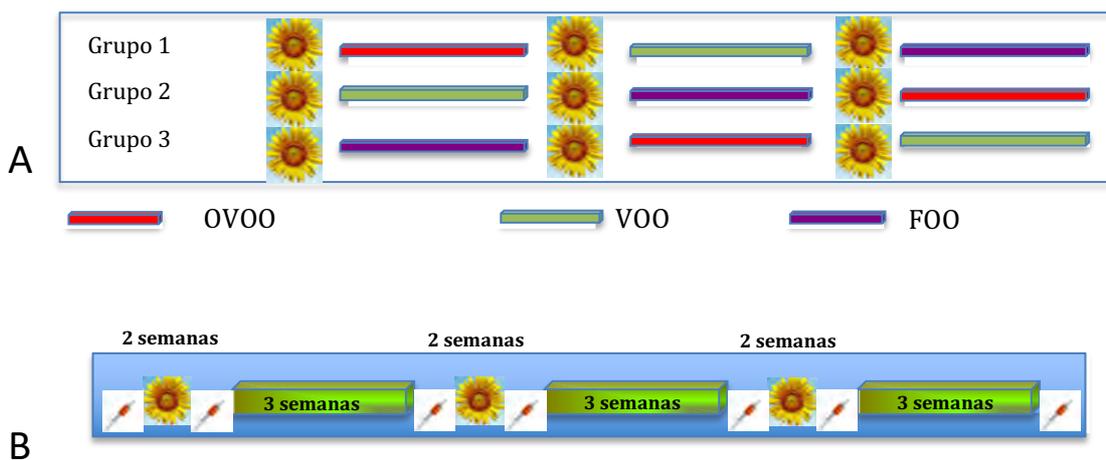


Figura 13. Diagrama gráfico de los grupos de intervención diseñados en el proyecto NUTRAOLEUM (A) y puntos de recogida de muestras (B).

3.2.2 Descripción de los ensayos clínicos adicionales.

De forma adicional al ensayo clínico Nutraoleum mencionado anteriormente, se diseñaron los dos ensayos clínicos siguientes:

- “Descifrando las bases genéticas del nexo de unión entre alergias alimentarias y diabetes tipo 2”. En este proyecto se propuso la aplicación de nuevos elementos genéticos reguladores (elementos genómicos reguladores no codificantes, miRNA) como bio-marcadores fundamentales para la evaluación del riesgo de DT2 (durante el embarazo - etapa fetal, en recién nacidos y lactantes) y del diagnóstico más temprano (pruebas de diagnóstico de última generación) de la progresión de la patogénesis de la DT2 desencadenados por factores nutricionales (alérgenos alimentarios) durante la infancia y en edad adulta. En este estudio los sujetos procedían del área de cobertura de la zona básica: Pedro Martínez, perteneciente al A.G.S. Nordeste de Granada, seleccionados y evaluados por el doctorando, médico de familia que ejerce sus funciones en el Consultorio de Villanueva de las Torres. Entre los criterios de inclusión figuran la captación estratificada en consulta de atención primaria, según acudan a realizar los controles previstos en el Proceso Asistencial Diabetes. Los pacientes sanos tuvieron edad comprendida entre los 18 y 50 años sin sintomatología, niveles de glucosa en plasma en ayunas y otros parámetros analíticos normales (ej. glucemia en ayunas 70-100 mg/dl). Los pacientes diabéticos tenían edad comprendida entre 18 y 50 años, niveles de glucosa en plasma en ayunas y otros parámetros analíticos ampliamente desviados de la normalidad (ej. glucemia en ayunas >125 mg/dl, Hemoglobina A1c \geq 6.5% o nivel de glucosa superior a 200 mg/dL en SOG). Este grupo de pacientes debía tener asociado igualmente un Índice de Masa Corporal igual o superior a 30. Como criterio de exclusión figuró la no aceptación del consentimiento informado. El tamaño muestral fue calculado en función de las diferencias predecibles de la variable dependientes (Elementos genéticos reguladores no codificantes), y otros factores variables. Para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias en el contraste de hipótesis mediante una prueba de Chi cuadrado bilateral para dos muestras independientes, teniendo en cuenta

que el nivel de significación es 5% y calculando un 10% de pérdidas, se consideró necesario incluir 30 pacientes (10 por grupo). Como variables dependientes se consideraron la existencia de elementos genéticos reguladores no codificantes, mientras que las variables independientes incluyeron diversas variables demográficas (Número de identificación, edad, raza, fecha de inclusión en el estudio, género), variables antropométricas y clínicas (aquellas obtenidas mediante exploración, peso, talla, temperatura, tensión arterial, frecuencia cardíaca y respiratoria, pulsioximetría...). Como variables analíticas se incluyeron los resultados de los parámetros analíticos básicos (hemograma, y bioquímica: glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, transaminasas, urea, creatinina, ionograma, Hg A1c...). Para los análisis de cultivo e inducción *ex vivo* realizados, se extrajeron alícuotas de sangre de los pacientes (3 ml) usando tubos de heparina-Li (BD Vacutainer System, Heidelberg, Alemania).

- “Evaluación de la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de componentes agroalimentarios alternativos procedentes del procesamiento de la aceituna”. Se trata de un ensayo clínico aleatorizado, cruzado, doble-ciego y controlado, diseñado y ejecutado en el marco del proyecto previo Nutraoleum, para obtener evidencia científica adicional que sustente los posibles beneficios inmunológicos del aceite de oliva. Los criterios de inclusión, exclusión etc. de los pacientes son por tanto idénticos a los descritos para este proyecto.

3.2.3 Inducción de inflamación y ensayos de contraste en sangre de pacientes cultivada *ex vivo*.

En el caso de las muestras de pacientes del estudio Nutraoleum, y antes de las 3 horas posteriores a la extracción, la sangre fue diluida en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (1:3) y agitada suavemente en tubos de 3 mL (Greiner Bio-one, Solingen, Alemania). Se sembraron alícuotas de 1 mL cada una en cada uno de los 24 pocillos de placas de incubación (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Alemania), y las placas fueron incubadas durante 24 h a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂. De cada extracción de sangre se realizaron incubaciones en triplicado, incluyendo además controles positivos y negativos en paralelo. Para cada muestra se cultivaron submuestras, incluyendo fitohemaglutinina (PHA, 10 µg/mL -Sigma Chemicals, USA-), lipopolisacárido de *E. coli* (LPS, 1 µg/mL -Sigma Chemicals, USA-), y forbol 12-miristato 13-acetato + ionomicina (PMA, 25 ng/mL + IO, 1µg/mL -Sigma Chemicals, USA-). En todos los experimentos se usaron los mismos lotes de PHA, LPS, PMA y IO, y las diluciones se realizaron con PBS (Phosphate Buffered Saline). Tras el cultivo, las muestras fueron retiradas de cada pocillo y centrifugadas a 700x g durante 5 min a 20 °C. Los sobrenadantes (plasma) fueron divididos en alícuotas para los ensayos posteriores y fueron almacenados a -20 °C.

En el caso de ensayos adicionales al mencionado Nutraoleum, los procedimientos utilizados son similares a los descritos en el apartado anterior, con ligeras modificaciones que incluyen el co-cultivo con conglutinas purificadas (Lima-Cabello *et al.*, 2018). En este caso se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en lugar de plasma para el análisis de biomarcadores correspondiente. Los PBMC fueron aislados desde la sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente utilizando Histopaque 1077 (Sigma Chemicals, USA), lavados tres veces con solución equilibrada en sales de Hanks (Life Technologies, USA), y resuspendidos en medio completo RPMI (Sigma Chemicals, USA) suplementado con penicilina, estreptomycin y L-glutamina (100 U/mL, 100 µg/mL y 2 mM, respectivamente -Sigma Chemicals, USA).

3.2.4 Inducción de inflamación y ensayos de contraste en cultivos celulares *in vitro*.

Los cultivos celulares se realizaron utilizando la línea celular PANC-1 (CIC: Centro de Instrumentación Científica, UGR) correspondiente a células epiteliales pancreáticas de humano caucásico, como describen Lima-Cabello *et al.*, 2018e; Tizón-Rodríguez, 2019. Las células PANC-1 fueron cultivadas en frascos de 75 cm² revestidos de poli-L-lisina (~2.0–2.5 x 10⁶ células/ml) utilizando medio DMEM (Sigma) suplementado con glutamina 2mM y suero bovino fetal inactivado por calor 10%. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con un volumen forzado de CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C. Con objeto de mantener un crecimiento celular en monocapas se realizaron rutinariamente subcultivos utilizando la tripsinización como método de separación de las células adheridas una vez que la confluencia de éstas alcanzaba el 90% de la superficie. El subcultivo se realizó mediante lavado repetido con PBS y tratamiento con tripsina-EDTA 0.25% (Lonza) durante 10 minutos en las mismas condiciones de cultivo. La actividad de la tripsina se neutralizó añadiendo medio de cultivo al doble de su volumen. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos y lavadas con PBS y se procedió al conteo celular y al análisis de la viabilidad, utilizando un contador automático Countess II FL (Thermo Fisher) al inicio y al final de cada experimento. En todos los casos, la viabilidad fue superior al 95%.

Para la realización de los experimentos de cocultivo, las células fueron cultivadas hasta alcanzar un 80% de confluencia e inmediatamente se procedió a separar las células en lotes que permitieran la discriminación entre los distintos tratamientos. Estos lotes consistieron básicamente en:

- Células control, sin ningún tratamiento posterior.
- Tratamiento con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) (Sigma) durante 24 horas a una concentración de 1µg/ml.
- Tratamiento con LPS en las mismas condiciones anteriores, además de cocultivo con diferentes extractos (Lima-Cabello *et al.*, 2018b), harinas (Zafra *et al.*, 2013) (Lima-Cabello *et al.*, 2017b, 2018a), proteínas recombinantes (Lima-Cabello *et al.*, 2017a, 2018b, 2018d).
- Células control, tratadas con el vehículo (disolvente o solución acuosa en donde se encuentran diluidos los componentes a testar) sin ningún otro tratamiento adicional.

3.2.5 Ensayos de viabilidad celular.

Con objeto de determinar los efectos potencialmente citotóxicos de las diferentes concentraciones de LPS y la combinación de LPS y los extractos, proteínas, harinas etc. mencionados anteriormente, se utilizó el método colorimétrico del MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Para ello, las células PANC-1 fueron sembradas en placas de 96 pocillos (103 células en 100 µL de medio de cultivo por pocillo) y se incubaron una noche. Posteriormente, las células fueron tratadas con los tratamientos de contraste indicados LPS. Se realizaron al menos dos réplicas para cada experimento. El fundamento de la técnica consiste en que las células viables son capaces de captar el MTT y reducirlo a cristales de formazán (compuesto violeta cuya máxima absorbancia es de c.a. 570 nm) mediante la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Las células no viables o sin un metabolismo activo, no son capaces de convertir el MTT en formazán. En la práctica, se adicionaron 10 µL de MTT 12mM a cada pocillo y el cultivo se mantuvo a 37°C durante

4 horas. A continuación, se añadieron 100 µL de una solución SDS-HCl y, tras 4 horas adicionales de cultivo a 37°C, se procedió a la lectura de la ABS₅₇₀.

3.2.6 Generación de un modelo de Resistencia a la Insulina en cultivos de células PANC-1

Las células PANC-1 fueron cultivadas en condiciones estándar como se describe en el apartado correspondiente. Una vez alcanzada una densidad celular de 2×10^4 células/mL se determinó la dosis óptima de insulina y la duración del tratamiento requerido para establecer un estado de resistencia a la insulina (IR-C), como se describe en Lima-Cabello *et al.*, (2018e). Brevemente, las células se dividieron en dos grupos, con seis réplicas por grupo. El grupo 1 incluyó células cultivadas en 200 μ L de medio completo, mientras que el grupo 2 incluyó células tratadas además con insulina en concentraciones 3×10^{-5} y 3×10^{-9} nmolL⁻¹ cuando las células se convirtieron en adherentes. Las células fueron cultivadas durante 24, 48 y 72 h. Tras cada uno de esos periodos, se midió la concentración de glucosa en el medio mediante el método de la glucosa oxidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Abcam, UK). Los cultivos se consideraron resistentes a la insulina (IR-C) cuando se mantuvo la menor concentración posible de glucosa en el medio para una determinada concentración de insulina, que en este caso resultó ser de 3×10^{-7} nmolL⁻¹. La capacidad de resistencia a la insulina de los cultivos fue confirmada utilizando diversos marcadores entre los que destaca IRS-1 y GLUT-4. Este estado de resistencia se mantuvo generalmente durante unas 48h, por lo que los ensayos de contraste con proteínas recombinantes se realizaron dentro de un periodo de seguridad de 24 h.

3.2.7 Análisis y cuantificación de biomarcadores I (panel de citoquinas relacionadas con procesos de inflamación).

MANUSCRITO EN PREPARACIÓN: Alché, V.; Lima-Cabello, E.; Alché, J.D. Assessment of quantitative immunoblotting and Bio-Plex methods as alternatives to ELISA for the quantification of biomarkers in whole blood ex vitro challenging assays.

Assessment of quantitative immunoblotting and Bio-Plex as alternative methods to ELISA for the quantification of essential biomarkers in whole blood *ex vivo* challenging assays.

Elena Lima-Cabello^{1†}, Víctor Alché^{2†}, Francisco Javier Gómez-Jiménez³, Antonia Pérez-Lázaro², Jose Carlos Jimenez-Lopez¹, Antonio Jesús Castro¹, Juan de Dios Alché^{1*}

¹ Estación Experimental del Zaidín. Spanish National Research Council (CSIC). Profesor Albareda 1. 18008 Granada. Spain.

² Servicio Andaluz de Salud (SAS). Granada. Spain.

³ Department of Medicine. University of Granada. Granada. Spain.

† These authors contributed equally to the present work

* Author for correspondence at juandedios.alche@eez.csic.es

ABSTRACT

Cytokines and other inflammatory mediators play key roles in all immune responses, and offer important new avenues to explore, both the mechanistic understanding of immunotoxicity and the development of new assays to test the potential of novel compounds. Whole blood *ex vivo* challenging assays for measuring cytokine responses are becoming increasingly used tools, primarily due to the easy access of samples from healthy donors and patients and the minimal processing of samples required. The availability of methods to measure cytokines and other inflammatory mediators or markers with high sensitivity and specificity is critically important. Enzyme-Linked Immuno-Sorbant Assay (ELISA) is the most widely used and best-validated method with high sensitivity, although sometimes limited by its ability to measure only a single protein in each sample, which is today becoming surpassed. Western Blotting represents an alternative to ELISA, also offering high sensitivity and reproducibility, nowadays with the development of quantitative assays. Recent developments in serum cytokine quantification technology include multiplex arrays. Multiplex Arrays offer the potential of better evaluating the complexity and dynamic nature of oxidative damage and inflammatory responses and offer substantial cost and sample savings over traditional ELISA and Western Blotting measurements. In the present study, we have used ELISA, Western Blotting, and the emerging Bio-Plex technologies to simultaneously quantitate and compare four analytes encompassing a representation of cytokine panel: interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-6 and interferon-gamma (IFN)- γ . Furthermore, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)- γ , TNF- α , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 β , and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 were assayed in culture supernatants from peripheral blood by using Bio-Plex approaches. Comparison was established between the data obtained through the different methods used, and a broad discussion concerning the advantages and drawbacks of their use was made.

Keywords: cytokines, ELISA, inflammation, Multiplex arrays, Western blotting

1. INTRODUCTION

There is an emerging trend in the last few decades to investigate cytokine responses to a variety of stimuli, including endotoxins, allergens, antibiotics, etc. [1-3]. Cytokines are a family of pleiotropic proteins that are involved in numerous immunological functions including the regulation and production of other cytokines [4]. Cytokines participate in many physiological processes, including the regulation of immune and inflammatory responses.

In this context, inflammatory biomarkers show considerable promise for improving the efficiency and progression of drug development and regulatory decision-making early in clinical development. Whole blood *ex vivo* challenging was introduced recently as a new methodology to measure large numbers of cytokines simultaneously in a relatively small volume of sample [5]. The major advantage of profiling multiple cytokines in the same sample is that such analysis can provide a more complete picture of the plethora of cytokines secreted during an immune response. The other obvious advantages include smaller sample volume, cost and the time taken to perform the assay.

However, the ability to reliably measure serum based inflammatory mediators [6], along with the advancement of cellular and molecular immune-based measurement technologies, has tremendously enhanced the state of research in this field. Most previous studies have reported cross-sectional cytokine levels that were measured at one point in time using Western Blotting and the traditional ELISA method [7]. Therefore, such cross-sectional single cytokine measurements likely do not reflect the true complexity of relevant inflammatory processes *in vivo*. Recent developments in serum cytokine quantification technology include multiplex arrays. Multiplex arrays offer the potential of better evaluating the complexity and dynamic nature of inflammatory. In addition, electrochemiluminescence-based multiplex assays have been developed and promoted for requiring far less subject serum per measurement, and for being far more cost effective than traditional ELISA and Western-Blotting measurements.

The present work intends to carry out an assessment of three of the most commonly used methods to identify and quantify biomarkers in the context of *ex vivo* blood challenging assays. Such assessment was made in terms of sensitivity, reliability as well as in some practical issues including hands-on time, availability and comparative pricing.

2. METHODS

Participant' study

A total number of ten healthy control subjects were recruited for this study, and respective informed full consents were obtained from each participant (Table 1). The subjects were unrelated and diagnosed at the coverage area of basic area "Pedro Martínez" (A.G.S. NorthEast Granada, Spain). Samples consisted in venous blood, which was collected from the cubital vein in 4-ml lithium-heparin tubes by well-trained authorized personal. All study

procedures were performed in accordance with a protocol previously approved by the ethics committee of research for the area of Granada, Spain). All participant provided full written, and informed consents for the procedures.

	Control Group	P-value
Male	10	
Age	40 (30,43)	0.007
Blood Pressure (mmHg)	12/7 (11/7, 12/7)	<0.001
Heart Rate (bpm)	64 (65, 76)	<0.001

Table 1. Characteristics of healthy participants. Values represent the median (25th percentile 75th percentile); to detect differences between groups we used analysis of variance (ANOVA). Significant P-values are marked in bold type.

Whole blood Culture

Venous blood was drawn into lithium–heparin tubes (BD Vacutainer System, Heidelberg, Germany) in the morning. Participants were fasted for 12 hours before blood collection (Fasting consisted in no food or drink intake but water). Within 3 h, whole unseparated blood was diluted 1:3 with Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) and HEPES 2.4%; (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and agitated gently in 50-ml tubes (Greiner Bio-one, Solingen, Germany). One ml aliquots were seeded per well of 24-well plates (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Germany) and cultured for 24 h at 37°C and an atmosphere of 5% CO₂. The whole blood assay procedure was established from pilot studies with blood from four healthy subjects. All parameters for each subject including blood withdrawal were measured in one assay on the same plates in order to ensure intra-individual cross-comparison of results. From each blood drawing, we performed triplicate incubations in parallel with positive and negative controls, separate cultures that included *E. coli* lipopolysaccharide (LPS, 5 pg/ml), phytohaemagglutinin (PHA, 1µg/mL) and Phorbol 12 myristate 13 acetate + ionomycin (PMA+IO, 1µg/ml). Samples were incubated in triplicate with negative controls (PBS 25%; Sigma-Aldrich). The same lots of LPs, PHA, PMA+IO and PBS were used for all experiments. Blood cultures were removed from each well to be centrifuged at 700 g for 5 min at 20°C, and supernatants were aliquoted and stored at -80°C until further analysis.

Assessment of cytokine profiles by ELISA.

Quantitation of cytokines, IL-1β, IL-2, IL-6 and TNF-α levels in culture supernatants were measured in duplicate using human ELISA set according to the manufacturer's instructions (Diaclone SAS, France). Samples were applied to wells of 96-well polystyrene microtiter plates that were precoated with specific monoclonal antibodies before incubation, and then wells were washed five times, followed by incubation with the respective HRP-conjugated polyclonal antibodies. After the repeat of aspiration and washing steps, the substrate solutions and stop solutions were added one after another. The optical density of each well was determined at 450 nm using a microplate reader (Bio-Rad, Richmond, CA) within 30 minutes.

Assessment of cytokine profiles by quantitative Western blotting.

The analyses were performed on culture supernatants obtained from whole blood culture. Total proteins concentration for each sample was determined with the Bradford assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as a standard. Aliquots corresponding to 20 µg of total proteins were heated to 95°C for 5 min with an equivalent volume of sample buffer, containing 2% SDS and 5% mercaptoethanol, bromophenol blue and 20% glycerol, and loaded onto 10% and 12% Stain-free polyacrylamide gels (Bio-Rad) for proteins separation. Proteins separated by SDS-PAGE were electrotransferred to PVDF membranes and probed with appropriate antibodies. Membranes were blocked for 1 h at 37°C in a blocking solution containing 3% BSA, 0.05% Tween-20, and PBS (pH 7.4) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies in the blocking solution. These primary antibodies consisting in IL-2 (15,4kDa), IL-6 (26kDa) IL-1β (17kDa) and TNF-α (26kDa) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Membranes were rinsed three times with washing solution (0.05% Tween-20 in PBS) for 10 min each, followed by incubation for 1 h at room temperature in a 1:5000 dilution of goat anti-rabbit IgG-HRP, purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), with 3% BSA in PBS. The membranes were then washed three times for 10 min each in the same washing solution. Chemiluminescence detection was carried out with the ImmunoStar™ WesternCTM Chemiluminescence Kit (Bio-Rad,) according to the manufacturer's instructions. Results visualization and documentation were performed with a C-DiGit blot scanner (LI-COR, USA). Quantitative (densitometry) analysis of protein bands was performed using ImageJ v1.47 (Bio-Rad).

Assessment of cytokine profiles by Bio-Plex.

Culture supernatants aliquots for cytokine measurement were stored at -80°C until the assay. Levels of 17 cytokines were determined using a Bio-Plex human cytokine 17-plex panel and a Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). We assessed the levels of interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN)-γ, TNF-α, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), macrophage inflammatory protein (MIP)-1β, and monocyte chemotactic protein (MCP)-1. Samples (minimum volume, 12 µL) were diluted (1:4) using Bio-Plex human serum diluent kits (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Assays were performed according to the manufacturer's instructions [8,9]. Briefly, 50 µL of each diluted serum sample were added to a suspension of beads coated with 17 primary antibodies in each well of an assay plate and incubated for 30 min at room temperature with shaking at 300 rpm. After the incubation, the beads were washed 3 times and subsequently reacted with a mixture of 17 types of biotin-conjugated secondary antibody. After a 30 min reaction, the beads were again washed and re-suspended in assay buffer containing streptavidin-phycoerythrin (Str-PE). After 10 min of agitation at room temperature, the beads were washed and re-suspended in assay buffer without Str-PE. Cytokine concentrations were measured using a Bio-plex Array Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Cytokine types were identified on the basis of the luminescence of the beads, and cytokine concentrations captured by primary antibody on the beads were determined using PE luminescence. For statistical analysis, cytokine concentrations of less than the lower limit of detection were given a value of half of the limit of detection.

The lower detection limits of the assays were 62.21 pg/ml for IL-1 β , 10.12 pg/ml for IL-2, 0.67 pg/ml for IL-4, 72.03 pg/ml for IL-6, 146.60 pg/ml for IL-7, 92.84 pg/ml for IL-8, 83.90 pg/ml for IL-12(p70), 577.83 pg/ml for IFN-g, 821.04 pg/ml for TNF- α , and 3.16 pg/ml for IL-13. The mean coefficient of variation was \approx 1, further confirming the quality of the assays.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM of 6 patients for group. Two-tailed Student's t-test was used to compare between two groups. One-way ANOVA followed by Dunnett's test was used to compare among three or more study groups. $P < 0.05$ is regarded as statistically significant. Statistical significance was defined as a P -value < 0.05 for two-sided testing. Gaussian distribution of the data was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. To detect differences between groups we used Wilcoxon's matched-pairs test.

3. RESULTS

Influence of 24-h incubation of whole blood with LPS, PMA and PHA+IO

Incubation for 24 h with LPS led to increased concentrations of the cytokines IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12(p70), IL-17, IFN- γ and TNF- α (Table 2). The concentrations of IL-7, IL-8, IL-13 were not altered. Elevated concentrations of IL-6, IL-7, IL-8, IL-17, IFN- γ , TNF- α and chemokine (MCP-1) were measured after challenge with PMA when compared with the basal group, whereas IL-1b, IL-4, IL-12(p70) and IL-13 were not stimulated by incubation for 24 h (Table 2). Incubation for 24 h with PHA+IO led to increased concentrations of the cytokines IL-1b, IL-2, IL-7, IL-8, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α and chemokine CCL2 (MCP-1) (Table 2).

	Basal (0h)	LPS (24h)	P -value ¹	PMA (24h)	P -value ²	PHA+IO(24)	P -value ³
IL-1 β	62.21	353	<0.001	105	<0.001	394	<0.001
IL-2	10.12	324	<0.001	342	<0.001	643	<0.001
IL-4	16.57	564	<0.001	453	<0.001	465	<0.001
IL-6	72.03	307	<0.001	305	<0.001	79	<0.001
IL-7	146.60	134	0.877	435	<0.001	435	<0.001
IL-8	92.84	96.3	0.365	763	<0.001	853	<0.001
IL-12(P70)	83.90	982	<0.001	83.90	0.654	97.34	0.654
IL-17	577.83	4213	<0.001	5234	<0.001	4453	<0.001
IFN- γ	958.53	2654	<0.001	2463	<0.001	2743	<0.001
TNF- α	121.04	543	<0.001	367	<0.001	577.63	<0.001
IL-13	3.16	4.2	0.654	5.6	0.765	7.6	0.324

Table 2. Influence of 24H incubation with 5pg/mL *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), 1 μ g/mL phytohaemagglutinin (PHA) and 1 μ g/ml Phorbol 12 myristate 13 acetate + ionomicine (PMA+IO) on cytokine release with Bio-Plex procedure. Values represent the median (25th percentile, 75th percentile); to detect differences between groups we used Wilcoxon's matched-pairs test. P -value¹ describes differences between Basal 0 h and LPS 24 h; P -value² gives differences between Basal 0 h and PMA 24 h; P -value³ gives differences between Basal 0 h and PMA+IO 24 h significant P -values are marked in bold type. Cytokine concentrations are given in pg/ml.

Cytokine assay by ELISA

We also measured culture supernatants of TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-2 levels in the same healthy subjects using ELISA. Compared to basal subjects LPS challenge for 24 h was associated with high concentration of TNF α , IL-1 β , IL-6 and IL-2 as shown in Table 3. Challenge with PMA altered the secretion of TNF α , IL-6 and IL-2 cytokines when compared to the basal group. Concentrations of cytokines IL-2, TNF α , and IL-1 β were also altered when stimulation with PMA+IO was assessed. Bio-Plex Pro™ assay and ELISA gave highly correlated results (Table 3).

	Basal (0h)	LPS (24h)	<i>P</i> -value ¹	PMA (24h)	<i>P</i> -value ²	PHA+IO	<i>P</i> -value ³
IL-1 β	64.21	303.4	<0.001	70.1	<0.001	357	<0.001
IL-6	11.30	278	<0.001	285	<0.001	80.02	<0.001
TNF- α	14.63	334	0.877	465	<0.001	485	<0.001
IL-2	17.12	298	<0.001	301	<0.001	443	<0.001

Table 3. Influence of 24H incubation with 5pg/mL *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), 1 μ g/mL phytohaemagglutinin (PHA) and 1 μ g/ml Phorbol 12 myristate 13 acetate + ionomicine (PMA+IO) on cytokine release with ELISA procedure. Values represent the median (25th percentile, 75th percentile); to detect differences between groups we used Wilcoxon's matched-pairs test. *P*-value¹ describes differences between Basal 0 h and LPS 24 h; *P*-value² gives differences between Basal 0 h and PMA 24 h; *P*-value³ gives differences between Basal 0 h and PMA+IO 24 h significant *P*-values are marked in bold type. Cytokine concentrations are given in pg/ml.

Protein levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-2 in culture supernatants of healthy control subjects.

Four biomarkers (Tumor necrosis alpha-TNF α , interleukin (IL)-1 β , interleukin (IL)-6 interleukin (IL)-2) determined in our analyses showed significant changes in their expression. In the absence of a stimulus, their production was negligible.

However, treatment with LPS induced the production of IL-1 β , TNF α and IL-6, (+143%, +243% and +243% *versus* basal respectively) as observed Figure 1A, 1B and Figure 2A respectively, whereas PMA induced the production of TNF α , IL-6 (+175%, +228%, *versus* basal respectively). PHA+IO showed reduced potential to induce IL-6, but increased IL-1 β and TNF- α production (+234%, +243% *versus* basal respectively). Challenging with LPS and PMA+IO showed a higher increase in IL-2 protein compared with the basal group (+193% and +196% *versus* basal respectively). No differences were observed with PMA challenging when compared with basal group (Figure 2B).

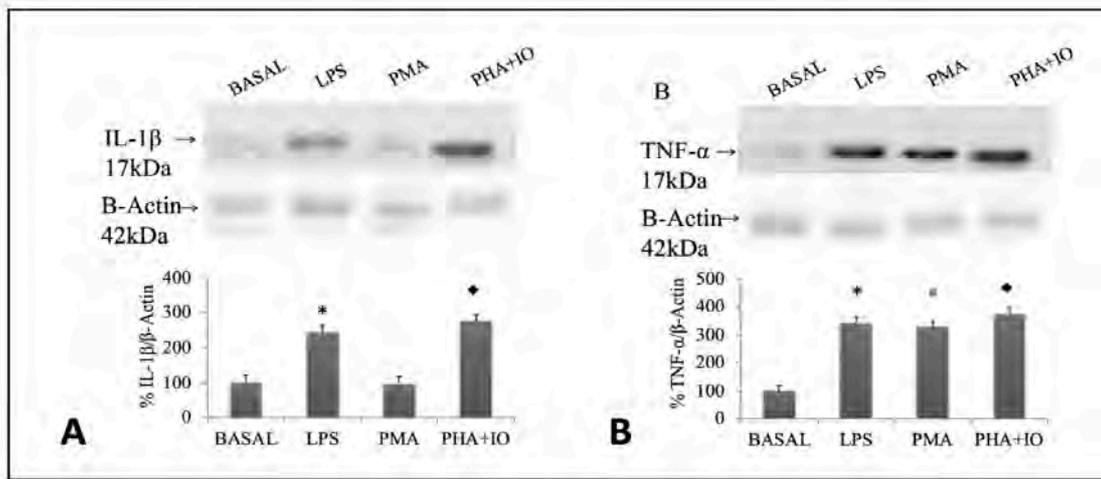


Figure 1. Protein levels of IL-1-β and TNF-α in culture supernatants of healthy control subjects. Stimulation of whole blood was performed with, Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS), phytohaemagglutinin (PHA) and Phorbol 12 myristate 13 acetate + ionomycin (PMA+IO). Western blot analysis of IL-1β (A) and TNF-α (B) protein levels in culture supernatants from C. Densitometry analysis of specific bands expressed as percentage relative to healthy control subjects (C) samples (100%). β-actin levels were used as loading control. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left. Photographs are representative of four independent experiments. Data are described as the mean values ± standard deviation of four experiments. p* <0.05 C versus LPS, p[#] <0.05 C versus PMA; p• <0.05 C versus PHA+IO.

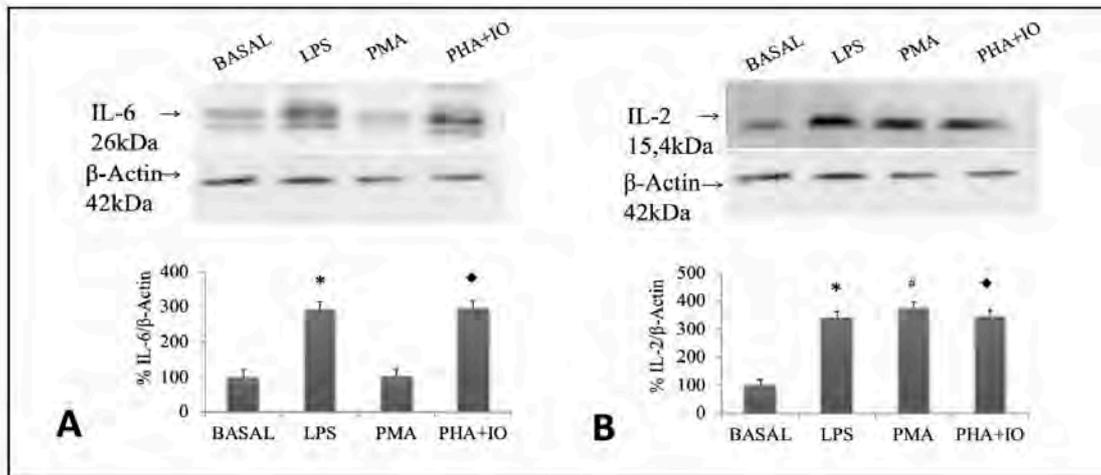


Figure 2. Protein levels of IL-6 and IL-2 in culture supernatants of healthy control subjects. Stimulation of whole blood was performed with, Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS), phytohaemagglutinin (PHA) and Phorbol 12 myristate 13 acetate + ionomycin (PMA+IO). Western blot analysis of IL-6 (A) and IL-2 (B) protein levels in culture supernatants from C. Densitometry analysis of specific bands expressed as percentage relative to healthy control subjects (C) samples (100%). β-actin levels were used as loading control. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left. Photographs are representative of four independent experiments. Data are described as the mean values ± standard deviation of four experiments. p* <0.05 C versus LPS, p[#] <0.05 C versus PMA; p• <0.05 C versus PHA+IO.

4. DISCUSSION

In our current study we investigated the effects of LPS, PHA and PMA+IO on the secretion of cytokines from peripheral blood cells in order to assess their contribution to induced accumulation of inflammatory mediators in human blood comparing ELISA, Western Blotting, and the multiplex (Bio-Plex) technologies simultaneously.

Due to the highly pleiotropic and redundant nature of cytokines, a single biological event can be affected by the complex interplay between several cytokines, so the most important thing is to find which cytokine is “appropriate” for immunotoxicology assessment. We selected a whole blood culture system optimized for studies on the release of immune mediators from unseparated cell populations of peripheral blood samples, similar to other protocols [10,11]. As a stimulus for the adaptive immune system we chose PHA [12], a common T cell mitogen. Stimulation of the innate immune system was achieved by endotoxin (LPS), a potent activator of cells of the macrophage/ monocyte lineage [13]. PMA activates protein kinase C, while ionomycin is a calcium ionophore, and stimulation with these compounds bypasses the T cell membrane receptor complex and will lead to activation of several intracellular signaling pathways, resulting in T cell activation and production of a variety of cytokines and inflammatory mediators. The differences in challenging reagents and treatments may result in the production of different types of cytokines at different levels as shown in our results. In our study, although PHA and PMA/ionomycin increased the production of some cytokines LPS was the optimal challenge in our study, and could significantly increase the production of more cytokines in 24 h. Several authors [14] found that after 24 h culture, LPS increased the secretion of IFN- γ , IL-6 and TNF- α in whole blood from healthy people, but not IL-4 [14]. In our assay we compared using multiplex assay, traditional separate ELISA and Western Blotting the activation method for cytokine production.

The multiplex assay was introduced recently as a new methodology to measure large numbers of cytokines simultaneously in a relatively small volume of sample [15]. The major advantage of profiling multiple cytokines in the same sample is that such analysis can provide a more complete picture of the plethora of cytokines secreted during an immune response. The other obvious advantages include smaller sample volume, cost and the time taken to perform the assay. However, to realize the full potential of the two methods (ELISA *versus* Multiplex), the same six LPS, PHA and PMA+IO stimulated plasma samples were assayed in parallel for TNF- α , IL-1 β , and IL-6 by ELISA for single cytokines and Multiplex analysis using the multiplex panels. The results, shown in Table 2 and Table 3, indicate that the overall values of the cytokines are not significantly different between assays. In the, IL-1 β value was 13.7% higher than ELISA (R^2 of 0.99) and IL-6 value on average was 1.6% higher than ELISA (R^2 of 0.99). No differences were found when TNF- α was measured. Overall, the results between ELISA and Multiplex are quite comparable as determined by correlation analysis. In this regard, when assessing Western blot assay protein levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-2 (Figure 1 and Figure 2) showed a similar pattern in accordance with the results observed with the traditional ELISA and Multiplex assays. The advantage of the Western

Blot over the ELISA test is that far more indicators are examined than the single antigen in ELISA. Western blot and ELISA both provide ways to quantify the amount of protein in cell (or tissue) lysates based on their binding to a primary antibody. The main difference is that Western Blot provides separation of proteins based on size. That way, proteins can be quantified even if the primary antibody has non-specific binding to other epitopes (which results in bands corresponding to other molecular weights). The downside is that the method is time consuming and a bit hard to master. ELISA, on the other hand, is quick and easy but not very useful unless the primary antibody is really specific. Although, for the detection of TNF- α , IL-1 β , IL-2 and IL-6 in culture supernatants, both the Bio-Plex assay and ELISA correlated well with the western blot.

Our results indicate that the Bio-Plex Pro™ system can be used to measure cytokine levels in LPS, PHA and PMA+IO-stimulated human plasma samples and that the levels obtained by this technique are comparable with ELISA and Western Blot results. It is therefore feasible to use this optimized technology to detect and quantify cytokines and other potential biomarkers. The ability to multiplex biomarker quantification in a relatively small volume of a clinically relevant sample will no doubt have important implications in the progression of compounds in clinical development.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was partially funded by research projects: P2010-AGR6274 P2011-CVI-7487, CA8313, P18-RT-1577 (Andalusian Regional Government, Spain), RTC-2015-4181-2; RTC-2016-4824-2; RTC-2017-6654-2 (Spanish “Retos-Colaboración” call); 201540E065 (internal CSIC funding), BFU-2016-77243-P and PID2019-10586GB-100 (Spanish National R+D program), all of them co-funded by EU ERDF program.

REFERENCES

- [1] Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol.* 2013; 56:131-142.
- [2] Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu VG, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 2013;12: 349-361
- [3] Borasch D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, Oostingh GJ, Pfaller T, Pixner C, Posselt G, Italiani P, Nold MF, Nold-Petry CA, Bufler P., Dinarello CA. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur. Cytokine Netw.* 2011; 22: 127-147
- [4] Dinarello CA, Renfer L, Wolff SM. Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:4624–4627.

[5] Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140:771–776.

[6] Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-Neutrophil Interaction: Paradigm for Chronic Inflammation Revisited. *Immunology and Cell Biology*. 2001;79:502–6.

[7] Gordon S, Fraser I, Nath D, Hughes D, Clarke S. Macrophages in tissues and in vitro. *Curr Opin Immunol*. 1992;4:25–32.

[8] Aziz N, Nishanian P, Mitsuyasu R, Detels R, Fahey JL. Variables that affect assays for plasma cytokines and soluble activation markers. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:89.

[9] Breen EC, Reynolds SM, Cox C, Jacobson LP, Magpantay L, Mulder CB, Dibben O, Margolick JB, Bream JH, Sambrano E, Martinez-Maza O, Sinclair E, Borrow P, Landay AL, Rinaldo CR, Norris PJ. A multi-site comparison of high-sensitivity multiplex cytokine assays. *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 8(8):1229-42.

[10] Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TMR, Frokiaer H. Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines – a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *J Immunol Methods*. 2009;340:95–101.

[11] Djuardi Y, Wibowo H, Supali T, et al. Determinants of the relationship between cytokine production in pregnant women and their infants. *PLoS ONE*. 2009;4:e7711.

[12] Breidthardt T, Frohn C, Luhm J, Kirchner H, Brand JM. Prolactin induces enhanced interferon gamma release in peripheral whole blood after stimulation with either PHA or LPS. *Immunobiology*. 2002;206:424–431.

[13] Rosso M, Heine H, Meusch U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol*. 2011;31:379–446.

[14] Keski-Nisula L., Roponen M., Hirvonen M.R., Heinonen S., Pekkanen J. Stimulated cytokines production correlates in umbilical arterial and venous blood at delivery. *Eur. Cytokines Netw*. 2004;15:347–352.

[15] Oliver KG, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system *Clin. Chem*. 1998;44:2057–2060.

En el caso de cultivos celulares, y tras incubación durante 24h, los medios de cultivo celular fueron eliminados con tampón PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, USA) a 4°C y las células fueron lisadas en tampón RIPA suplementado con una dilución 1/100 de un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma, USA) durante 1 h. Tras la centrifugación a 12,000 × g a 4 °C durante 30 min, el sobrenadante se almacenó a –80 °C hasta su uso en los análisis indicados anteriormente (ELISA, Western blotting, Bio-Plex...).

3.2.8 Análisis y cuantificación de biomarcadores II (expresión génica de citoquinas y otros marcadores relacionados con procesos de inflamación).

Se realizaron PCRs cuantitativas a tiempo real para la determinación de la expresión de los genes: IL-1 β , iNOS y TNF- α . En el caso de muestras de plasma y PBMCs, la extracción de ARNm se realizó usando un kit específico Qiagen® miRNA Purification Kit. En el caso de cultivos celulares, el ARN total fue aislado mediante la utilización del kit RNeasy Tissue isolation kit (Quiagen). La calidad y concentración del ARN fue evaluada mediante la razón de absorbancias 260/240nm (relación entre ácidos nucleicos y fenoles) y razón de absorbancias 260/280nm (relación entre ácidos nucleicos y proteínas) usando un microespectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo).

La primera hebra de ADNc fue sintetizada utilizando el kit High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem). Para los ensayos de expresión el ADNc fue amplificado utilizando el sistema de PCR cuantitativa LightCycler 480 (Roche). Los primers y sondas utilizadas fueron aquellas disponibles por TaqMan Gene Expression Assays: Hs01555410_m1, Hs01075529_m1, Hs00174128_m1, respectivamente (Applied Biosystems). Los cambios en los niveles de expresión de estos tres genes fueron determinados mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. El número de ciclos a partir del cual los transcriptos fueron detectados (CT) fueron normalizados con respecto al número de ciclo al cual se detecta el gen constitutivo elegido, β -Actina (Hs99999903_m1, Applied Biosystems) referido como Δ CT. La eficiencia de la PCR fue determinada por análisis basados en la curva estándar para la amplificación de los genes elegidos y del control endógeno, las cuales fueron altamente similares.

3.2.9 Análisis y cuantificación de biomarcadores III (panel de marcadores relacionados con las rutas de señalización de la insulina y otros).

Se realizaron análisis de Inmunoblotting cuantitativo de la presencia de los marcadores: Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1), P13 kinasa p85, Glucose Transporter Type 4 (GLUT-4) y proteína kinasa B (AKT).

La extracción y cuantificación de proteínas totales, SDS-PAGE, transferencia, bloqueo de las membranas, incubación con los anticuerpos, detección y cuantificación de las bandas inmunoreactivas se realizaron básicamente como se describe en el apartado 3.2.7.

En este caso, los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-IRS-1 (107-185 kDa), anti-PI3-kinase (p85) (85kDa), anti-GLUT-4 (50-60kDa), y anti-protein kinase B (AKT) (60kDa), todos ellos disponibles comercialmente a través de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.).

De forma adicional, se realizó un análisis de la fosforilación de IRS-1, que incluyó el análisis mediante Western blotting de los extractos con los siguientes anticuerpos primarios: phospho-IRS-1 (Tyr612), phospho-Akt (Ser473), phospho-caveolin-1 (Tyr14), y phospho-CBL (Tyr700) (todos ellos de Santa Cruz, USA).

De forma alternativa, la cuantificación de los niveles de diversas citoquinas y del factor TNF- α fueron medidos en duplicado usando kits de determinación de ELISA de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL12, IL-17, INF- γ , y TNF- α , Diaclone SAS, France). Las muestras se aplicaron a placas microtiter de 96 pocillos, que habían sido pre-incubadas con los anticuerpos monoclonales específicos. Posteriormente, las placas fueron lavadas 5 veces, y seguidamente incubadas con los respectivos anticuerpos policlonales secundarios conjugados con peroxidasa (HRP). Tras la repetición de los lavados, se añadieron secuencialmente las soluciones de sustrato y de parada

de la reacción. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo mediante lectura a 450 nm usando un lector de microplacas (Bio-Rad, Richmond, CA) en los 30 minutos siguientes.

3.2.10 Análisis y cuantificación de biomarcadores IV (expresión génica de marcadores relacionados con las rutas de señalización de la insulina y otros).

Se realizaron PCRs cuantitativas a tiempo real para la determinación de la expresión de los genes: Insulin receptor substrate 1 (IRS-1) y glucose transporter type 4 (GLUT-4).

La extracción de ARNm, ARN total, síntesis de ADNc, y determinación de los cambios en los niveles de expresión de los genes se realizaron como se describe en el apartado 3.2.8.

En este caso, los primers y sondas utilizadas fueron aquellas disponibles por TaqMan Gene Expression Assays (número de acceso GenBank: NM_005544.2, ID de ensayo: Hs00178563_m1; número de acceso GenBank: NM_001042.2, ID de ensayo: Hs00168966_m1).

De forma alternativa, el cDNA obtenido fue mezclado con RT² SYBR Green qPCR (Qiagen) y alicuoteado sobre un “array” de PCR disponible comercialmente para analizar la expresión de marcadores de diabetes-obesidad-inflamación (real-time RT² Profiler PCR Array PAHS-023Z, Qiagen), que incluye el análisis de CCL5, CCR2, ICAM-1, IFN- γ , IL-6, IL-12, TNF- α , y NF- κ B1 (p50). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando un termociclador Light Cycler[®] 480 (Roche), en el que las muestras se procesaron en duplicado a lo largo de 40 ciclos: 1 ciclo de 95 °C 10 min, 40 ciclos de 95 °C 15 s, y 40 ciclos de 60 °C 1 min. Los ciclos umbrales fueron medidos, y la expresión relativa de los genes se comparó calculando comparando los valores de Ct. Las diferencias en la expresión génica se evaluaron calculando el número de veces (fold-change) en los niveles de expresión basados en cambios de al menos dos veces arriba o abajo en comparación con la expresión génica del grupo control. Todos los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de genes control de expresión constante (housekeeping genes -beta actina, hipoxantina fosforibosil transferasa 1, beta-2-microglobulina y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa-), que no variaron significativamente entre los grupos de estudio.

3.2.11 Determinación de glutatión y actividades enzimáticas antioxidantes.

Los extractos celulares correspondientes a los cultivos celulares fueron utilizados para determinar los niveles de glutatión reducido (GSH) y las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT). Para ello se utilizaron kits comerciales (Canvax, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.12 Determinación de la producción de NO y nivel de oxidación.

Los extractos celulares correspondientes a los cultivos celulares fueron utilizados para determinar los niveles producción de NO utilizando un kit comercial ab65328 (Abcam, UK). En breve, las muestras de todos los grupos experimentales fueron desproteinizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cargó una cantidad idéntica de las muestras (30 μ L) y de los marcadores en placas microtiter de 96-pocillos. Se añadió la nitrato reductasa, el cofactor enzimático, y el tampón de ensayo, seguido del “enhancer”, y los reactivos de Griess R1 y R2. Tras incubar 1 h, se midió la A540 nm en un lector de microplacas (iMark Bio-Rad, USA), y se sustrajo el valor del control blanco (medio sin células). Las concentraciones totales de nitrito/nitrato se calcularon usando una curva patrón.

El nivel de oxidación de los extractos (inmunodetección de grupos carbonilo introducidos en las proteínas debido a reacción con especies de oxígeno reactivo -ROS-) se determinó mediante el OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (EMD Millipore, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando muestras de los extractos separados en geles de poliacrilamida al 12% mediante SDS-PAGE y electrotransferidos a membranas PVDF.

Alternativamente, se utilizó como marcador de estrés nitrosativo el análisis de los perfiles de proteínas nitradas en las muestras de plasma, utilizando en este caso un anticuerpo primario anti-3 N-Tyr (Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando igualmente muestras de los extractos separados en geles de poliacrilamida al 12% mediante SDS-PAGE y electrotransferidos a membranas PVDF.

3.2.13 Análisis estadísticos

Los datos relativos a marcadores son expresados como media \pm SEM de 6 pacientes por grupo. El significado estadístico de estos resultados se obtuvo utilizando el software SPSS. Se utilizó un test de t-Student's de dos colas para comparar entre dos grupos. Para comparar entre tres o más grupos de estudio se utilizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Dunnett's. Se consideró $P < 0.05$ como estadísticamente significativo. Se usó una prueba de Kolmogorov–Smirnov para analizar la distribución Gaussiana de los datos. Para detectar diferencias entre grupos se usó una prueba Wilcoxon's. En el caso de las determinaciones de GSH, SOD y CAT, los ensayos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t-Student test.

3.2.14 Aspectos éticos de la investigación.

Los protocolos clínicos realizados en el presente trabajo fueron propuestos para su evaluación de las normas éticas esenciales y criterios deontológicos correspondientes, y fueron informados favorablemente por parte del Comité de Ética de la Investigación del Centro de Granada (CEI-Granada) en las siguientes resoluciones:

- Resolución de 04/12/2013 referente al proyecto: “Nuevos Procesos en la Industria Almazarera Andaluza para la Elaboración de Nuevos Productos de Alto Valor Biológico con Aplicaciones en Salud Humana. El Estudio Nutraoleum”.
- Resolución de 09/05/2017 referente al proyecto: “Evaluación de la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de componentes agroalimentarios alternativos procedentes del procesamiento de la aceituna”.
- Resolución de 09/07/2018 referente al proyecto: “Descifrando las bases genéticas del nexo de unión entre alergias alimentarias y diabetes tipo 2”.

Dichas resoluciones se incluyen como Anexo 8.3 en la presente memoria. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las siguientes declaraciones internacionales sobre ética de la investigación:

- “The Principles of Good Laboratory Practice”, desarrollados de acuerdo con la OCDE y adoptados por las directivas EU (Directiva 2004/9/EC, y Directiva 2004/10/EC).

- “The Declaration of Helsinki (DoH, Edinburgh 2000)”, guía ética para médicos y otros participantes en la investigación médica de la “World Medicine Association” (WMA, www.wma.net).
- Convención del Consejo Europeo para la protección de los derechos humanos y la dignidad en relación con la aplicación de la biología y la medicina (Oviedo 1997, www.coe.int).
- Declaración universal de bioética y derechos humanos adoptada por la conferencia general de la UNESCO de 19 octubre 2005 (www.unesco.org).
- CIOMS/WHO Guías éticas internacionales para la investigación biomédica que implique a sujetos humanos (1993, revisada en 2001, www.cioms.ch).

Los ensayos están igualmente contemplados dentro de las normativas españolas siguientes:

- Ley 14/2007, de 3 de julio sobre investigación biomédica.
- Real Decreto 65/2006, de 30 de enero sobre la importación y exportación de muestras biológicas (cuando sea aplicable).
- Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, sobre la determinación de los parámetros de calidad y seguridad para donar, obtener, evaluar, procesar, preservar, almacenar y distribuir células y tejidos humanos y normas sobre su uso en humanos.
- Orden de 14 de abril de 2000, de adaptación de los anexos del Real Decreto 2043/1994 de 14 de octubre en referencia a la inspección y verificación de buenas prácticas de laboratorio al progreso técnico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis *ex vitro* de los efectos de diferentes aceites de oliva sobre el estrés oxidativo y la inflamación en adultos sanos en un ensayo controlado doble ciego aleatorizado.

4.1.1 *MANUSCRITO EN PREPARACIÓN: Elena Lima Cabello, Víctor Alché, José Carlos Jiménez López, Estefanía Sánchez Rodríguez, Sara Biel Glesson, Jose Ramón Fernández Navarro, Miguel Ángel Calleja, Juan Antonio Espejo Calvo, Blas Gil Extremera, Francisco Javier Gómez, Rafael de la Torre, Montserrat Fito, María Isabel Covas, Pedro Vilchez, Emilio Martínez de Victoria, Ángel Gil, María Dolores Mesa, Juan de Dios Alché. Ex vivo blood culture assessment of anti-oxidative and anti-inflammatory effects of virgin olive oils differing in their bioactive contents in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial.*

RESUMEN

El ensayo clínico NUTRAOLEUM (registrado en ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739A) ha demostrado ser un escenario informativo en relación al análisis *in vivo* de los beneficios para la salud de los triterpenos del aceite de oliva (ácidos oleanólico y maslínico). El ensayo engloba la absorción basal tras el suplemento en la dieta (30 mL por día) de un aceite de oliva optimizado (OVOO, 490 ppm de compuestos fenólicos y 86 ppm de triterpenos), y de un aceite de oliva funcional (FOO, 487 ppm de compuestos fenólicos y enriquecido con 389 ppm de triterpenos) durante tres semanas en comparación con un aceite de oliva virgen estándar (124 ppm de compuestos fenólicos y 86 ppm de triterpenos). Cincuenta y uno adultos sanos participaron en este estudio aleatorizado, cruzado y controlado. Hasta la fecha, se han determinado beneficios adicionales para la salud basados en este ensayo sobre biomarcadores de la función antioxidante, inflamatoria, del síndrome metabólica y endotelial, fundamentalmente *in vivo*.

En el presente trabajo, se ha optimizado un sistema de cultivo de sangre y de contraste *ex vivo* con diferentes inductores de inflamación para evaluar la respuesta anti-inflamatoria y anti-oxidante de los individuos participantes en el ensayo NUTRAOLEUM. Determinamos los marcadores oxidativos iNOS, presencia de proteínas nitradas en el aminoácido tirosina y producción de NO, así como los biomarcadores de inflamación IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL12, IL-17, INF- γ , y TNF- α usando un panel de métodos experimentales. Este estudio confirma de forma consistente el primer nivel de evidencia ya obtenido *in vivo* en relación con los beneficios para la salud de los triterpenos del aceite de oliva (ácidos oleanólico y maslínico) en adultos sanos, en este caso en un escenario inflamatorio y oxidativo inducido *ex vivo*. Además, fueron ensayados diversos marcadores adicionales. Como se discute, el sistema experimental utilizado también aporta una herramienta excelente para diseccionar los efectos de los componentes presentes en el aceite de forma individual.

***Ex vivo* blood culture assessment of anti-oxidative and anti-inflammatory effects of virgin olive oils differing in their bioactive contents in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial.**

Elena Lima Cabello^{1II}, Víctor Alché^{2II}, José Carlos Jiménez López¹, Estefanía Sánchez Rodríguez³, Sara Biel Glesson⁴, Jose Ramón Fernández Navarro⁴, Miguel Ángel Calleja⁴, Juan Antonio Espejo Calvo⁵, Blas Gil Extremera⁶, Francisco Javier Gómez⁶, Rafael de la Torre^{7,8}, Montserrat Fito^{8,9}, María Isabel Covas^{8,10}, Pedro Vílchez¹¹, Emilio Martínez de Victoria¹², Ángel Gil^{3,8,13}, María Dolores Mesa^{3,13}, Juan de Dios Alché^{1*}.

¹Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain; Elena.lima@eez.csic.es

²Andalusian Health System, Health Center “Villanueva de las Torres”, Granada, Spain. Victor.alche.sspa@juntadeandalucia.es

³Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, Armilla, 18016 Granada, Spain; estefaniasr@outlook.com (E.S.-R.); agil@ugr.es (A.G.)

⁴Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental “Alejandro Otero” (FIBAO), Avenida de Madrid 15, 18012 Granada, Spain; sbiel@fibao.es (S.B.-G); estrategia@innofood.es (J.R.F.-N); mangel.calleja.sspa@juntadeandalucia.es (M.A.C)

⁵Instituto para la Calidad y Seguridad Alimentaria (ICSA), Avenida de la Hispanidad 17, 18320 Santa Fe, Granada, Spain; jaespejo@hotmail.com

⁶Department of Medicine, University of Granada, Avenida de la Investigación 11, Armilla, 18016 Granada, Spain; Blasgil@ugr.es; Fgomez@ugr.es

⁷Integrative Pharmacology and Systems Neuroscience Research Group, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), Universitat Pompeu Fabra (CEXS-UPF), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain; rtorre@imim.es

⁸Spanish Biomedical Research Networking Centre, Physiopathology of Obesity and Nutrition (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain; María.nuproas@gmail.com

⁹Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group, Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain, Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain; mfito@imim.es

¹⁰NUPROAS Handelsbolag, Nackä, Sweden. NUPROAS HB, Apartado de Correos 93, 17242 Girona, Spain

¹¹Laboratorio CEM Europa S.L., Polígono Industrial “Cañada de la Fuente”, Carretera Fuensanta, s/n, 23600 Martos, Jaén, Spain; pvilchez@cmeuropa.com

¹²Department of Physiology, Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, University of Granada, Parque Tecnológico de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, Armilla, 18100 Granada, Spain; emiliom@ugr.es

¹³Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA). Complejo Hospitalario Universitario de Granada, 18014 Granada, Spain

^{II}Identical contribution

*Correspondence: juandedios.alche@eez.csic.es; Tel.: +34-958-181-600

Abstract

NUTRAOLEUM trial (registered in ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739A) has proven an informative scenario regarding the analysis of the *in vivo* health benefits of olive oil triterpenes (oleanolic and maslinic acids) in healthy humans. The trial encompasses the raw intake of an optimized VOO (OVOO, 490 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes), and a functional olive oil (FOO, 487 ppm of phenolic compounds and enriched with 389 ppm of triterpenes) supplementation (30 mL per day) during three weeks in comparison to a standard VOO (124 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes). Fifty-one healthy adults participated in this randomized, crossover, and controlled study. Up to date, additional health benefits based on this trial have been determined and described on antioxidant, inflammatory, metabolic syndrome and endothelial function biomarkers, mainly *in vivo*.

In the present study, an *ex vivo* blood culture and challenging system with different inducers or inflammation and oxidative stress conditions was optimized to assess the anti-inflammatory and anti-oxidative response of individuals participants of the NUTRAOLEUM trial. We determined the oxidative markers iNOS, presence of Tyronitrated proteins and production of NO, as well as the anti-inflammatory biomarkers IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL12, IL-17, INF- γ , and TNF- α by using a panel of experimental methods. This study strongly confirms the first level of evidence already obtained *in vivo* regarding the health benefits of olive oil triterpenes (oleanolic and maslinic acids) in healthy humans, now in a inflammatory and oxidative scenario induced *ex vivo*. Moreover, an additional number of biomarkers were assayed. As discussed, the experimental system also provides an excellent tool to dissect the effects of individual components present in the oil in a individual manner.

Keywords: olive oil; virgin olive oil; triterpenes; phenolic compounds; cardiovascular diseases; maslinic acid; oleanolic acid; oxidative stress; 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine; TNF-alpha; interleukin-8

1. Introduction

Europe concentrates around 73% of the World olive production, with Spain being the country displaying the higher production within Europe (63%), which represents 46% of the whole global production. Spain can be therefore considered as a power regarding olive agroindustry [1]. Within Spain, Andalusia is the region with the higher oil production, which reaches a 81 % of total Spanish production [2]. Mean oil production of the Spanish oil factories along the last 5 years reaches 1.200.000 Tm of olive oil per year, which also represents the generation of a large volume of byproducts, due to the fact that only 20-25% of the olive weight is transformed into virgin/extra virgin olive oil (VOO/EVOO) [3].

Mediterranean diet, with the olive oil as the main source of fat, has shown to represent a potential preventive factor against several pathologies (cardiovascular disease, low-degree inflammatory processes, oxidative damages, cancer, etc.), mainly as the result of its high content in bioactive components, majoritarily its phenolic fraction (oleuropein, oleocanthal, hidroxytyrosol, tyrosol...), which is characterized by their antioxidant properties [4]. The fractions of the olive fruit and the different byproducts obtained (peel, mesocarp, stone, pomace,) contain differential amounts and type of these minor components. Thus, pomace oil extracted from peels and seeds is highly enriched in triterpenic acids, which have shown anti-inflammatory and vasodilator in both animal and cellular models [5]. Based on these premises, enrichment of an optimized olive virgin

oil (AOVO) through a process enhancing its biological value by increasing the proportion of bioactive components obtained from the olive seed, peel or other fractions, would be able to generate a functional olive oil of high biological potential. The olive oil, in spite of being recognized as a healthy ingredient, can not be consumed in high amounts, due to its high caloric content. Therefore, enrichment of their bioactive components would represent an alternative manner of enhancing its healthy properties, yet maintaining fat intake [6,7].

NUTRAOLEUM trial [8] (registered in ClinicalTrials.gov ID: NCT02520739A) was designed to analyze the *in vivo* health benefits of olive oil triterpenes (oleanolic and maslinic acids) in healthy humans. The trial involves the raw supplementation (30 mL per day during three weeks) of an optimized VOO (OVOO, 490 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes), and a functional olive oil (FOO, 487 ppm of phenolic compounds and enriched with 389 ppm of triterpenes) in comparison to a standard VOO (124 ppm of phenolic compounds and 86 ppm of triterpenes). This randomized, crossover, and controlled study included fifty-one healthy adults. Health benefits based on this trial have been recently determined and described on antioxidant, inflammatory, metabolic syndrome and endothelial function biomarkers, mainly *in vivo* [9,10].

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

The study design, sample size, and the characteristics of the healthy adults were described in detail previously [8]. The flow chart, aspects of their diet during interventions, compliance of the study, and the nutritional composition of the experimental oils administered were also previously published [8]. In brief, 58 intention-to-treat subjects aged from 20 to 50 years were eligible from the general population of Granada, but only 53 subjects (27 men and 26 women) accepted to participate. They were then enrolled in the study from February 2014 to July 2014 and were assigned into groups. Two subjects did not complete the study. After the first intervention, one subject refused to continue for personal reasons, and the other did not follow the protocol correctly. Fifty-one of them completed the study. The inclusion criteria were as follows: People in good health on the basis of a physical examination and basic biochemical and hematological analyses, and willingness to provide written informed consent. The exclusion criteria were as follows: Smoking, intake of antioxidant supplements, aspirin, or any other drug with established antioxidant properties, hyperlipidemia, obesity (body mass index (BMI) > 30 kg/m²), diabetes, hypertension, celiac disease, or other intestinal disease, any condition limiting mobility, life-threatening diseases, or any other disease or condition that would impair compliance. The local institutional review board (Ethics Committee Research Center of Granada), approved the protocol (13/11 C38). The trial was registered in [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) ID: NCT02520739. All subjects provided written informed consent according to the principles of the Declaration of Helsinki.

2.2. Study Design

The NUTRAOLEUM study was a randomized, crossover, controlled, and double-blind study over three weeks of intervention with three different oils and two weeks of washout between the three interventions. The trial was conducted in Virgen de las Nieves and San Cecilio General Hospitals of Granada, Spain. We randomly assigned subjects, paired by gender and age, consecutively to one of three sequences of olive oil administration, using random numbers generated by a computerized generator using the block-randomization

method of a software program for sequence generation by an independent statistician. The randomization list was concealed in a lightproof sealed envelope. The sealed envelope was kept by the independent statistician of the study. Participants, investigators, and outcome assessors were blind to the treatment allocation throughout the course of the study.

Each group of subjects ($n = 18$) received a daily dose of 30 mL (28 g) of one olive oil with different amounts of bioactive compounds: (1) An optimized VOO (OVOO) high in phenolic compounds (490 ppm of phenolic compounds, and 86 ppm of triterpenes) produced from Picual olives; (2) A functional olive oil (FOO), that was the same OVOO high in phenolic compounds (487 ppm) and enriched with triterpenes (389 ppm) from olive exocarp, providing 4.7 mg of oleanolic acid and 6 mg of maslinic acid per day (after 30 mL of olive oil); and (3) A VOO obtained from the OVOO after washing to eliminate the majority of phenolic compounds (124 ppm of phenolic compounds, and 86 ppm of triterpenes) [8-10]. San Francisco de Asís Cooperative provided the olive oils used in the present study (Andalucía, Spain). In addition, subjects were instructed to consume the corresponding oil in replacement of other raw fats during the period of intervention. In the two-week washout period prior to interventions, subjects were requested to avoid olives and olive oil consumption and were provided with sunflower oil for cooking and raw purposes. Subjects were requested to avoid the intake of foods containing high amounts of antioxidants. A nutritionist personally advised subjects for replacing all types of regularly consumed raw fats using only the assigned oil.

2.3. Evaluation of Dietary Intake

Subjects completed a three-day dietary record at baseline and during each intervention period [9,10]. Energy consumption and dietary intakes of macro and micronutrients data were processed by using a CSG software (General ASDE) and the Spanish Food Composition Database [9,10].

2.4. Blood Sample Collection

Fasting venous blood samples were collected at the beginning of the study (baseline) and before (pre-intervention, after the washout period) and at the end (post-intervention) of each olive oil intervention period using EDTA-coated tubes. Blood samples were centrifuged (4 °C, 10 min at 1750× g), and aliquots of plasma were immediately frozen and stored at -80 °C until analysis. Twenty-four hours urine was also collected, homogenized, frozen, and stored at -80 °C until analysis.

2.5. *Ex vivo* Whole Blood Cultures

An aliquot of blood samples (as indicated above) were collected using lithium-heparin tubes (BD Vacutainer System, Heidelberg, Germany) from a subsample of 36 subjects. Blood was diluted 1:3 with Dulbecco's modified Eagle's medium and agitated gently in 3-mL tubes (Greiner Bio-one, Solingen, Germany) within 3 h after collection. One-milliliter aliquots were seeded in each well of 24-well plates (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Germany) and cultured for 24 h at 37 °C under an atmosphere of 5% CO₂. From each blood drawing, we performed triplicate incubations in parallel with positive and negative controls, separate cultures that included phytohaemagglutinin (PHA, 10 µg/mL), *E. coli* lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL) and phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin (PMA, 25 ng/mL + IO, 1 µg/mL). The same lots of PHA, LPS, PMA + IO and phosphate buffered saline were used in all experiments. Blood cultures were removed from each well and centrifuged at 700× g for 5 min at 20 °C. The resulting supernatants (plasma) were aliquoted and pooled from eight subjects from each of the

three assigned orders of administration of olive oil and stored at -20°C until further analysis.

2.6. Determination of viability

50 μl of whole blood cells (before and after all different treatments) were brought into suspension using 50 μl of trypsin/EDTA and were resuspended in a volume of PBS at least equivalent to the volume of trypsin. Under sterile conditions a 10-20 μl of cell suspension were removed. An equal volume of Trypan Blue (dilution factor =2) and was added and mixed by gentle pipetting. 10 μl of the cell suspension were placed in a hemacytometer chamber (both sides of the chamber). The cells were viewed using an inverted phase contrast microscope at x20 magnification. Number of viable (seen as bright cells) and non-viable cells (stained blue) were counted. Ideally >100 cells should be counted in order to increase the accuracy of the cell counting. Cell viability was calculated as: a) viable cell count (live cells per ml)= N° of viable cells counted/number of large corner cells counted x dilution factor (in our case x 10,000), b) non-viable cell count (live cells per ml)= N° of dead cells counted/number of large corner cells counted x dilution factor (in our case x 10,000) and c), percentage of viability= n° of viable cells/ n° of dead cells x 100.

2.7. Nitric oxide detection

The total amount of NO production including nitrite/nitrate contents from cultured blood supernatants of control subjects and T2D patients was measured following the recommended protocol using a commercial assay kit ab65328 (Abcam, Cambridge, UK). Briefly, supernatants were collected and centrifuged to remove cell debris. Plasma from all experimental groups was deproteinized according to the manufacturer's instructions. An equal amount (30 μl) of samples and standards were loaded into 96-well microtiter plates. A volume of nitrate reductase, enzyme cofactor, and assay buffer was added, followed by 1 h incubation at room temperature by Enhancer, Griess Reagent R1 and Griess Reagent R2. Immediately after incubation, absorbance at 540 nm was detected with a microplate reader (iMark Biorad), and the value of the blank control (medium without cells) was subtracted. Total nitrite/nitrate concentrations were calculated with the calibrated standard curve.

2.8. Quantitative immunoblotting

The analyses were performed on culture supernatants obtained from whole blood culture. Total protein concentration was determined for each sample with the Bradford assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as a standard. Aliquots corresponding to 20 μg of total proteins were heated to 95°C for 5 min with an equivalent volume of sample buffer, containing 2% SDS and 5% mercaptoethanol, bromophenol blue and 20% glycerol, and loaded onto 10% and 12% polyacrylamide gels for protein separation. Proteins separated by SDS-PAGE were electrotransferred to PVDF membranes and probed with appropriate antibodies. Membranes were blocked for 1 h at 37°C in a blocking solution containing 3% BSA, 0.05% Tween-20, and PBS (pH 7.4) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies in the blocking solution. These primary antibodies consisted of anti-iNOS (130 kDa) and anti-nitrotyrosine purchased from Abcam. Membranes were rinsed three times with washing solution (0.05% Tween-20 in PBS) for 10 min each, followed by incubation for 1 h at room temperature in a 1:5000 dilution of goat anti-rabbit IgG-HRP, purchased from Santa Cruz Biotechnology, with 3% BSA in PBS. The membranes were then washed three times for 10 min each in the same washing solution. Chemiluminiscent detection was carried out with the Immun-StarTM WesternCTM

Chemiluminescence Kit (cat# 170–5070; Bio-Rad) according to the manufacturer’s instructions. Visualization and documentation of the results was performed with a C-DiGit blot scanner (LI-COR, USA). Quantitative (densitometry) analysis of protein bands was performed using ImageJ v1.47 (Bio-Rad).

2.9. ELISA assays for cytokines, INF- γ and TNF-quantification

The analyses were performed on culture supernatants obtained from whole blood culture. After centrifugation, the supernatant was collected and diluted to a 1:4 ratio for the ELISA sets for IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL12, IL-17, INF- γ , and TNF- α (Diacclone) following the manufacturer’s instructions. Data were statistically analyzed using the t-test.

3. Results

3.1. NO determinations in plasma

Table 1 shows the levels of NO in the plasma samples, determined by the spectrophotometric assay, assessed before and after the three interventions in healthy adults, with the data corresponding to the non-induced blood cultures, and after PHA, LPS and PMA + IO induction.

PHA, LPS or PMA + IO inductions produced a potent increase in the NO concentration in the pooled blood cultures in all cases. After the intervention with VOO, NO showed in most cases light, non-significant changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect), with the exception of the cultures challenged with LPS, which were statistically significant. However, in the interventions with OVOO and FOO, the opposite situation was detected: statistically significant changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect) were detected in most cases, with the exception of the non-induced, which showed non-significant differences pre- vs. post-intervention.

When analyzing the intertreatment effects, levels of NO tended to be lower after the intervention with the FOO than after the VOO, except along the induction with PHA, which showed the opposite tendency. The presence of NO after the intervention with the OVOO resulted in intermediate values between those of VOO and FOO across LPS and PMA + IO inductions.

		VOO	OVOO	FOO
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM
NO_no induction	Pre	0.15 \pm 0.04	0.13 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
	Post	0.16 \pm 0.01 ^a	0.13 \pm 0.02 ^b	0.11 \pm 0.02 ^{*c}
NO_PHA	Pre	1.16 \pm 0.13	0.85 \pm 0.08	0.7 \pm 0.08
	Post	1.01 \pm 0.06 ^a	0.81 \pm 0.09 ^{*b}	0.46 \pm 0.08 ^{*c}
NO_LPS	Pre	0.98 \pm 0.05	0.8 \pm 0.01	0.53 \pm 0.06
	Post	1.36 \pm 0.12 ^{*a}	0.74 \pm 0.07 ^{*b}	0.46 \pm 0.08 ^{*c}
NO_PMA_IO	Pre	1.1 \pm 0.1	0.78 \pm 0.06	0.57 \pm 0.09
	Post	1.06 \pm 0.09 ^a	0.7 \pm 0.05 ^{*b}	0.35 \pm 0.05 ^{*c}

Table 1: concentrations (pg/mL) of NO pre- and post- intervention with VOO, OVOO and FOO under the different *ex vivo* culture induction scenarios (this is: induction with PHA, LPS, PMA + IO and without induction). Data are expressed as mean \pm SEM. Statistically significant differences between pre- and post-intervention ($p < 0.05$) levels are labelled with an asterisk. Statistically significant differences between interventions are labelled with different letters (a,b,c).

Such differences are better appreciated in Figure 1, which illustrates the supernatant concentrations changes of NO (post-intervention minus pre-intervention data) of whole blood cultures from the subjects after the VOO, OVOO and OVOO interventions. The graph clearly displays differential aspects of the induction with the three inducers used, as well as the significant inter-intervention differences.

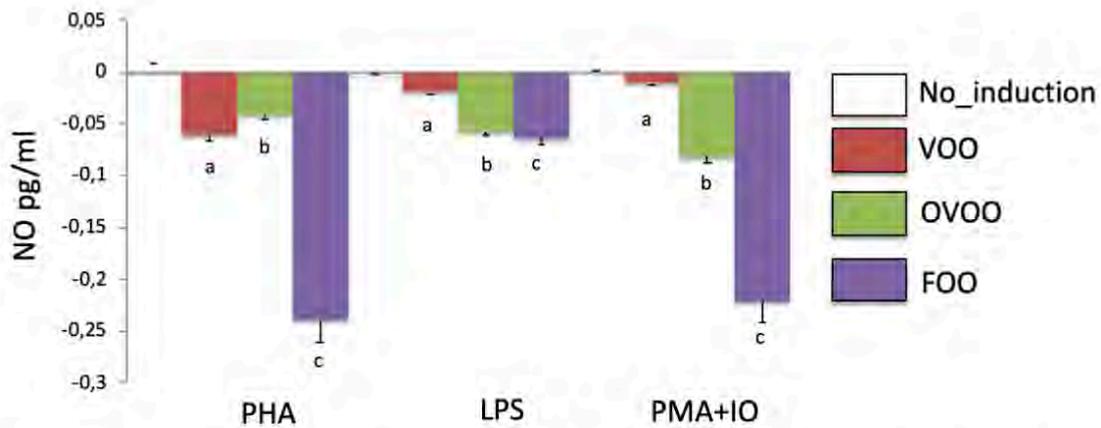


Figure 1. Plasma NO *ex vivo* changes (post-intervention minus pre-intervention data) when stimulated with PHA, LPS or PMA + IO in whole blood cultures from healthy adults. Values are expressed as the means \pm SEMs. ANOVA was used to compare differences between interventions and induction treatments. The Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among groups. $p < 0.05$ was considered significant and therefore a, b and c groups are shown. FOO, functional olive oil; IO, ionomycin; OVOO, optimized virgin olive oil; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; VOO, virgin olive oil.

3.2. iNOS determinations in plasma

Western blot analysis of iNOS in plasma is represented in Figure 2. A prominent band of c.a. 130 kDa was observed after detection using the anti-iNOS antibody with changing intensities depending on the treatment applied.

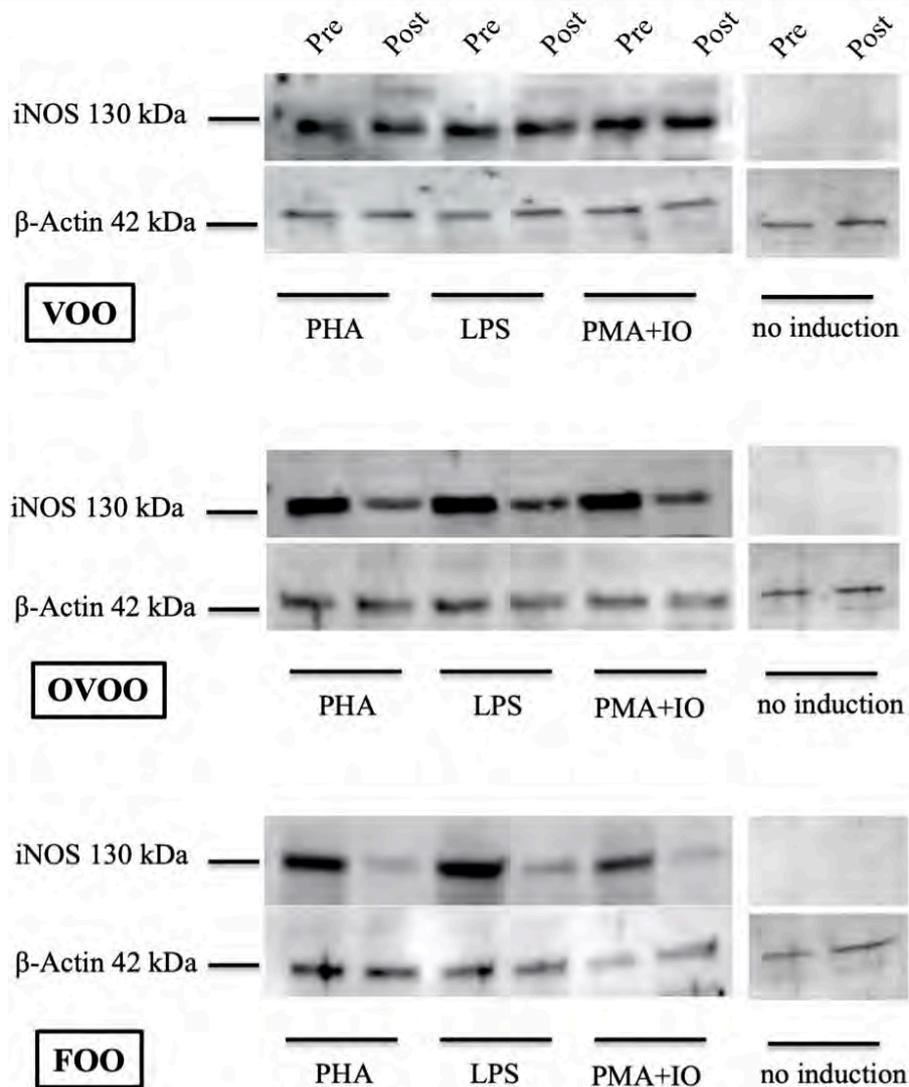


Figure 2: Western blot analysis of iNOS in plasma samples pre- and post- intervention with VOO (upper panel), OVOO (central panel) and FOO (lower panel) under the different *ex vivo* culture induction scenarios (this is: induction with PHA, LPS, PMA + IO and without induction). A prominent band of approximately 130 kDa cross-reacted with the antibody. Control loading was performed using the house keeping gene product beta-actin (42 kDa band).

The levels of iNOS in the plasma, determined by densitometry of Western blots, and assessed before and after the three interventions in healthy adults, with the data corresponding to the non-induced blood cultures, and after PHA, LPS and PMA + IO induction are presented in Table 2.

Induction with PHA, LPS or PMA + IO produced a potent increase in the iNOS concentration in the pooled blood cultures. After the intervention with VOO, iNOS showed in most cases significant changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect), with the exception of the non-challenged cultures, which didn't displayed a statistically significant difference. In the interventions with OVOO and FOO, statistically significant changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect) were detected in all cases.

When analyzing the intertreatment effects, the whole levels of iNOS tended to be lower after the intervention with the FOO than after the VOO. However, levels of iNOS after the intervention with the OVOO resulted in intermediate values between those of VOO

and FOO for PHA and LPS inductions but was even higher than that of FOO in the case of PMA + IO induction.

		VOO	OVOO	FOO
		Mean ± SEM	Mean ± SEM	Mean ± SEM
iNOS_no induction	Pre	100.00 ± 1.08	116.66 ± 0.53	99.73 ± 0.02
	Post	99.27 ± 0.41 ^a	100.00 ± 0.44 ^{*b}	99.30 ± 0.10 ^{*c}
iNOS_PHA	Pre	247.59 ± 0.34	259.87 ± 0.51	339.00 ± 0.30
	Post	229.18 ± 0.43 ^{*a}	149.21 ± 0.46 ^{*b}	93.18 ± 0.27 ^{*c}
iNOS_LPS	Pre	265.43 ± 0.33	325.14 ± 0.23	463.04 ± 31.05
	Post	278.75 ± 0.46 ^{*a}	134.20 ± 0.30 ^{*b}	93.93 ± 0.43 ^{*c}
iNOS_PMA_IO	Pre	284.14 ± 0.56	375.33 ± 0.14	392.05 ± 0.53
	Post	246.58 ± 0.31 ^{*a}	90.03 ± 0.03 ^{*b}	139.09 ± 0.65 ^{*c}

Table 2: Relative presence of iNOS pre- and post- intervention with VOO, OVOO and FOO under the different *ex vivo* culture induction scenarios (this is: induction with PHA, LPS, PMA + IO and without induction). Data are expressed as mean ± SEM in percentages. Statistically significant differences between pre- and post-intervention ($p < 0.05$) levels are labelled with an asterisk. Statistically significant differences between interventions are labelled with different letters (a,b,c).

These differences are better observed in Figure 3, which illustrates the supernatant concentrations changes of iNOS (post-intervention minus pre-intervention data) of whole blood cultures from the subjects after the VOO, OVOO and OVOO interventions. The graph clearly displays differential aspects of the induction with the three inducers, as well as the significant inter-intervention differences. The whole levels of iNOS tended to be lower after the intervention with the FOO than after the VOO. However, levels of iNOS after the intervention with the OVOO resulted in intermediate values between those of VOO and FOO for PHA and LPS inductions but was even higher than that of FOO in the case of PMA + IO induction.

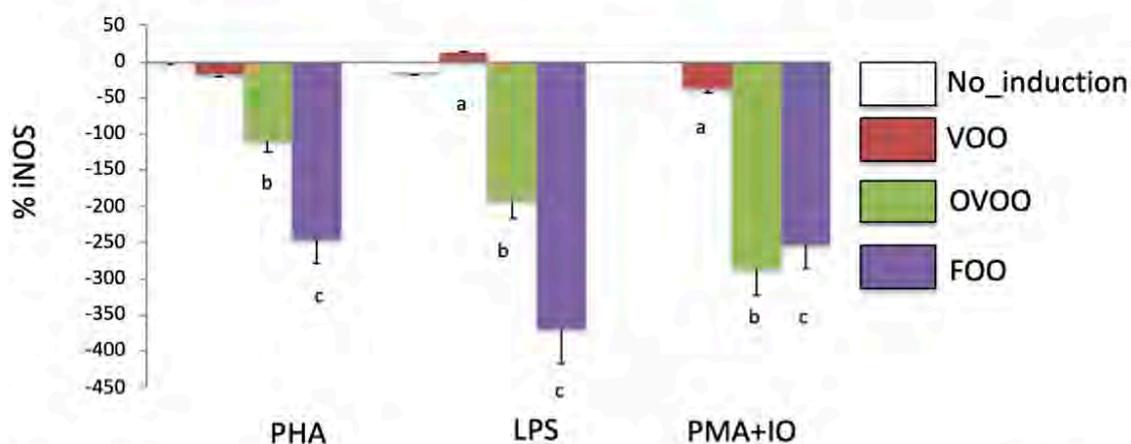


Figure 3. Plasma iNOS *ex vivo* changes (post-intervention minus pre-intervention data) when stimulated with PHA, LPS or PMA + IO in whole blood cultures from healthy adults. Values are expressed as the means ± SEMs. ANOVA was used to compare differences between interventions and induction treatments. The Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among groups. $p < 0.05$ was considered significant and therefore a, b and c groups are shown. FOO, functional olive oil; IO, ionomycin; OVOO, optimized virgin olive oil; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; VOO, virgin olive oil.

3.3. Tyr-nitration profiles of plasma proteins.

Western blot analysis of 3 N-Tyr (nitrated protein profiles) in plasma is represented in Figure 4. Complex profiles of nitrated proteins were observed after detection using the anti-eN-Tyr antibody, with changing distributions and intensities of the bands depending on the treatment applied. Among the complex profiles, several bands seem to be repetitive, as those corresponding to the Mw labeled in Figure 4.

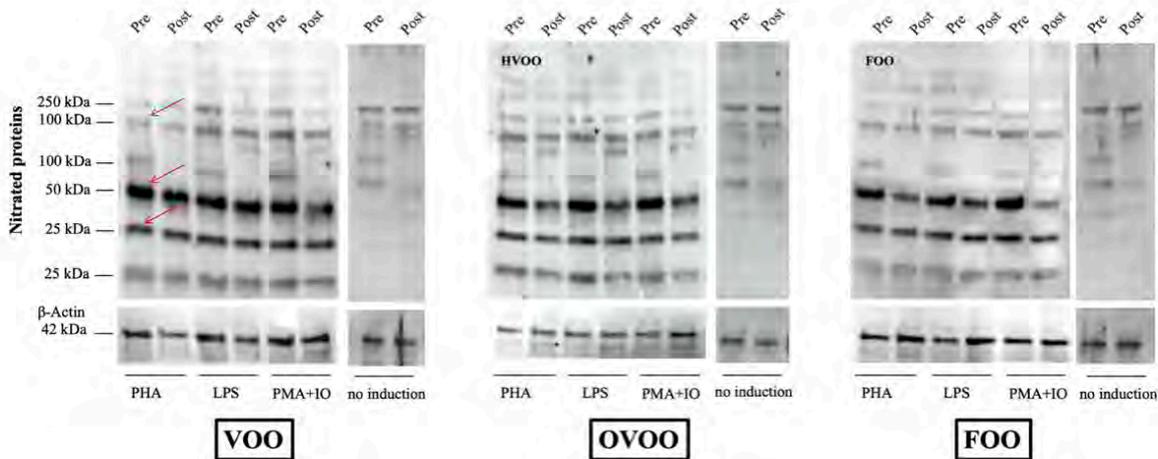


Figure 4: Western blot analysis of nitrated protein profiles in plasma samples pre- and post-intervention with VOO (left panel), OVOO (central panel) and FOO (right panel) under the different *ex vivo* culture induction scenarios (this is: induction with PHA, LPS, PMA + IO and without induction). Complex profiles of nitrated proteins were observed in all samples. Examples of major bands of *ca.* 100, 50 and 25 kDa are pointed by red arrows. Control loading was performed using the house keeping gene product beta-actin (42 kDa band).

The whole levels of nitrated proteins in the plasma were determined by densitometry of the Western blots, and assessed before and after the three interventions in healthy adults, with the data corresponding to the uninduced blood cultures, and after PHA, LPS and PMA + IO induction, as detailed in Table 3. In this particular case, induction with PHA, LPS or PMA + IO did not always induced a potent increase in the whole levels of nitrated proteins in the pooled blood cultures, and the changes identified varied from moderate increase to a large increase in these protein forms, and even a diminishment of such whole levels of nitrated proteins.

Whole density corresponding to Tyr nitration after the intervention with VOO, showed non-significant changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect) for the non-challenged samples and those challenged with PMA + IO, whereas such changes were significant for the PHA and LPS inductions. In the interventions with OVOO and FOO, statistically significant changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect) were detected in all cases.

When analyzing the intertreatment effects, there is not clear trend regarding the effects of the three oils on the whole levels of nitrated proteins

		VOO	OVOO	FOO
		Mean ± SEM	Mean ± SEM	Mean ± SEM
3 N-Tyr_no induction	Pre	100.00 ± 0.31	112.08 ± 1.55	109.54 ± 0.19
	Post	97.96 ± 0.67 ^a	100.00 ± 0.05 ^{*b}	99.87 ± 0.26 ^{*c}
3 N-Tyr_PHA	Pre	97.76 ± 0.55	96.97 ± 1.16	149.88 ± 0.28
	Post	86.73 ± 1.30 ^{*a}	90.61 ± 0.20 ^{*b}	75.76 ± 0.19 ^{*c}
3 N-Tyr_LPS	Pre	94.71 ± 0.39	102.68 ± 0.10	104.16 ± 0.10
	Post	104.31 ± 0.30 ^{*a}	84.00 ± 0.45 ^{*b}	79.23 ± 0.13 ^{*c}
3 N-Tyr_PMA_IO	Pre	89.59 ± 2.86	97.47 ± 0.32	99.29 ± 0.32
	Post	88.18 ± 0.2 ^a	77.77 ± 0.04 ^{*b}	69.38 ± 0.04 ^{*c}

Table 3: Relative presence of 3 N-Tyr pre- and post-intervention with VOO, OVOO and FOO under the different *ex vivo* culture induction scenarios (this is: induction with PHA, LPS, PMA + IO and without induction). Data are expressed as mean ± SEM in relative percentages. Statistically significant differences between pre- and post-intervention ($p < 0.05$) levels are labelled with an asterisk. Statistically significant differences between interventions are labelled with different letters (a,b,c).

This is better observed in Figure 5, which shows the supernatant concentrations changes in the whole level of 3 N-Tyr conjugated proteins (post-intervention minus pre-intervention data) of whole blood cultures from the subjects after the VOO, OVOO and OVOO interventions. In this case, and as mentioned before, comparative performance of the interventions with the different oils was changing depending on the type of induction used.

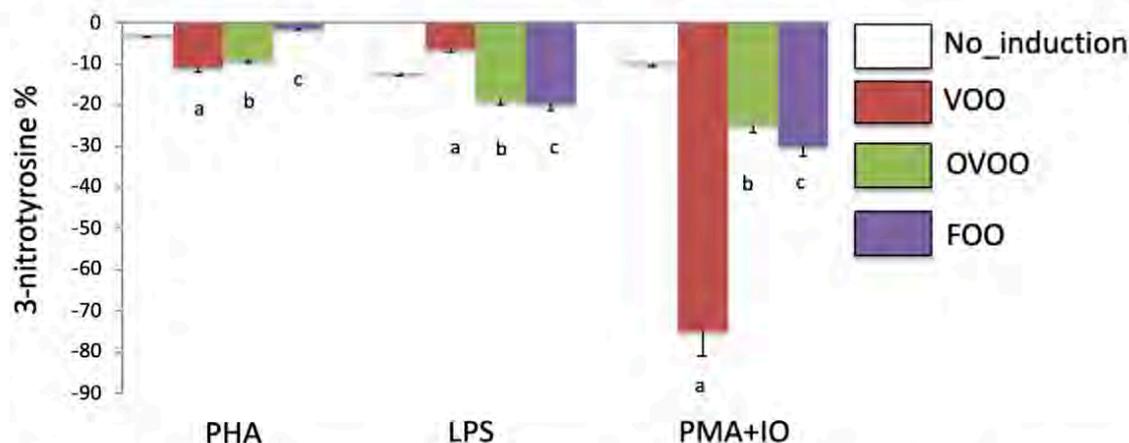


Figure 5. Plasma 3 N-Tyr *ex vivo* changes (post-intervention minus pre-intervention data) when stimulated with PHA, LPS or PMA + IO in whole blood cultures from healthy adults. Values are expressed as the means ± SEMs. ANOVA was used to compare differences between interventions and induction treatments. The Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among groups. $p < 0.05$ was considered significant and therefore a, b and c groups are shown. FOO, functional olive oil; IO, ionomycin; OVOO, optimized virgin olive oil; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; VOO, virgin olive oil.

3.4. Plasma inflammatory biomarkers

Table 4 shows the levels of the different plasma inflammatory biomarkers (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-27, TNF- α and MPO) assessed before and after the three interventions in healthy adults, with the data corresponding to the uninduced blood cultures, and after PHA, LPS and PMA + IO induction.

Induction with PHA, LPS or PMA + IO produced a potent increase in the concentration of all inflammatory biomarkers assayed in the pooled blood cultures. Such changes pre- vs. post-intervention (intra-treatment effect) were statistically significant for all inducers and interventions assayed.

When analyzing the intertreatment effects, the levels of the different biomarkers tended to be lower after the intervention with the FOO than after the VOO, with a few exceptions. However, and as a rule of thumb, levels of the biomarkers after the intervention with the OVOO resulted in intermediate values between those of VOO and FOO, although exceptions can be observed depending on the type of induction and for particular markers.

		VOO	OVOO	FOO
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM	Mean \pm SEM
IL-1 β _no induction, pg/mL	Pre	27.81 \pm 0.01	29.06 \pm 0.01	26.43 \pm 0.05
	Post	27.65 \pm 0.05 ^{*a}	29.23 \pm 0.05 ^{*b}	23.43 \pm 0.01 ^{*c}
IL-1 β _PHA,pg/mL	Pre	180.63 \pm 0.12	155.02 \pm 0.05	172.83 \pm 0.05
	Post	180.80 \pm 0.06 ^{*a}	154.23 \pm 0.05 ^{*b}	102.73 \pm 0.01 ^{*c}
IL-1 β _LPS,pg/mL	Pre	211.13 \pm 0.01	184.87 \pm 0.05	185.46 \pm 0.05
	Post	210.87 \pm 0.02 ^{*a}	173.95 \pm 0.05 ^{*b}	122.19 \pm 0.05 ^{*c}
IL-1 β _PMA_IO,pg/mL	Pre	211.19 \pm 0.01	195.26 \pm 0.05	197.44 \pm 0.05
	Post	212.08 \pm 0.05 ^{*a}	193.63 \pm 0.05 ^{*b}	134.21 \pm 0.05 ^{*c}
IL-2_no induction, pg/mL	Pre	213,15 \pm 0.01	213,54 \pm 0.01	213,54 \pm 0.01
	Post	213,54 \pm 0.01 ^{*a}	213,53 \pm 0.02 ^{*b}	187,43 \pm 0.02 ^{*c}
IL-2_PHA,pg/mL	Pre	713,23 \pm 0.03	628,72 \pm 0.07	495,53 \pm 0.03
	Post	720,91 \pm 0.01 ^{*a}	608,23 \pm 0.02 ^{*b}	393,08 \pm 0.03 ^{*c}
IL-2_LPS,pg/mL	Pre	721,27 \pm 0.05	641,52 \pm 0.05	577,00 \pm 0.05
	Post	718,35 \pm 0.05 ^{*a}	603,11 \pm 0.03 ^{*b}	399,22 \pm 0.02 ^{*c}
IL-2_PMA_IO,pg/mL	Pre	728,59 \pm 0.01	662,01 \pm 0.02	495,54 \pm 0.02
	Post	728,48 \pm 0.07 ^{*a}	596,72 \pm 0.01 ^{*b}	396,92 \pm 0.02 ^{*c}
IL-6_no induction, pg/mL	Pre	1.15 \pm 0.01	1.13 \pm 0.05	1.12 \pm 0.03
	Post	1.06 \pm 0.03 ^{*a}	1.13 \pm 0.01 ^{*b}	1.01 \pm 0.03 ^{*c}
IL-6_PHA,pg/mL	Pre	11.63 \pm 0.05	5,02 \pm 0.05	2,83 \pm 0.02
	Post	11.80 \pm 0.03 ^{*a}	4,23 \pm 0.05 ^{*b}	2,73 \pm 0.02 ^{*c}
IL-6_LPS,pg/mL	Pre	11.13 \pm 0.03	4,87 \pm 0.01	3,46 \pm 0.05
	Post	11.87 \pm 0.01 ^{*a}	3,95 \pm 0.06 ^{*b}	2,19 \pm 0.05 ^{*c}
IL-6_PMA_IO,pg/mL	Pre	11.11 \pm 0.03	5,26 \pm 0.03	3,44 \pm 0.05
	Post	12.87 \pm 0.01 ^{*a}	3,63 \pm 0.03 ^{*b}	2,21 \pm 0.04 ^{*c}

Figure 6 shows the supernatant concentrations changes of the different inflammatory biomarkers (post-intervention minus pre-intervention data) of whole blood cultures from the subjects after the VOO, OVOO and FOO interventions. As indicated above, different trends can be detected depending on the inducer used and the type of intervention. Overall, intervention with FOO resulted in higher or sometimes similar reduction of the different biomarkers when compared with the VOO and OVOO interventions, with the exception of IL-12 and MPO under PMA + IO induction in which FOO intervention resulted lower reduction of these markers. The intervention with OVOO produced an intermediate reduction (or sometimes similar) in the levels of most biomarkers, compared to VOO and FOO.

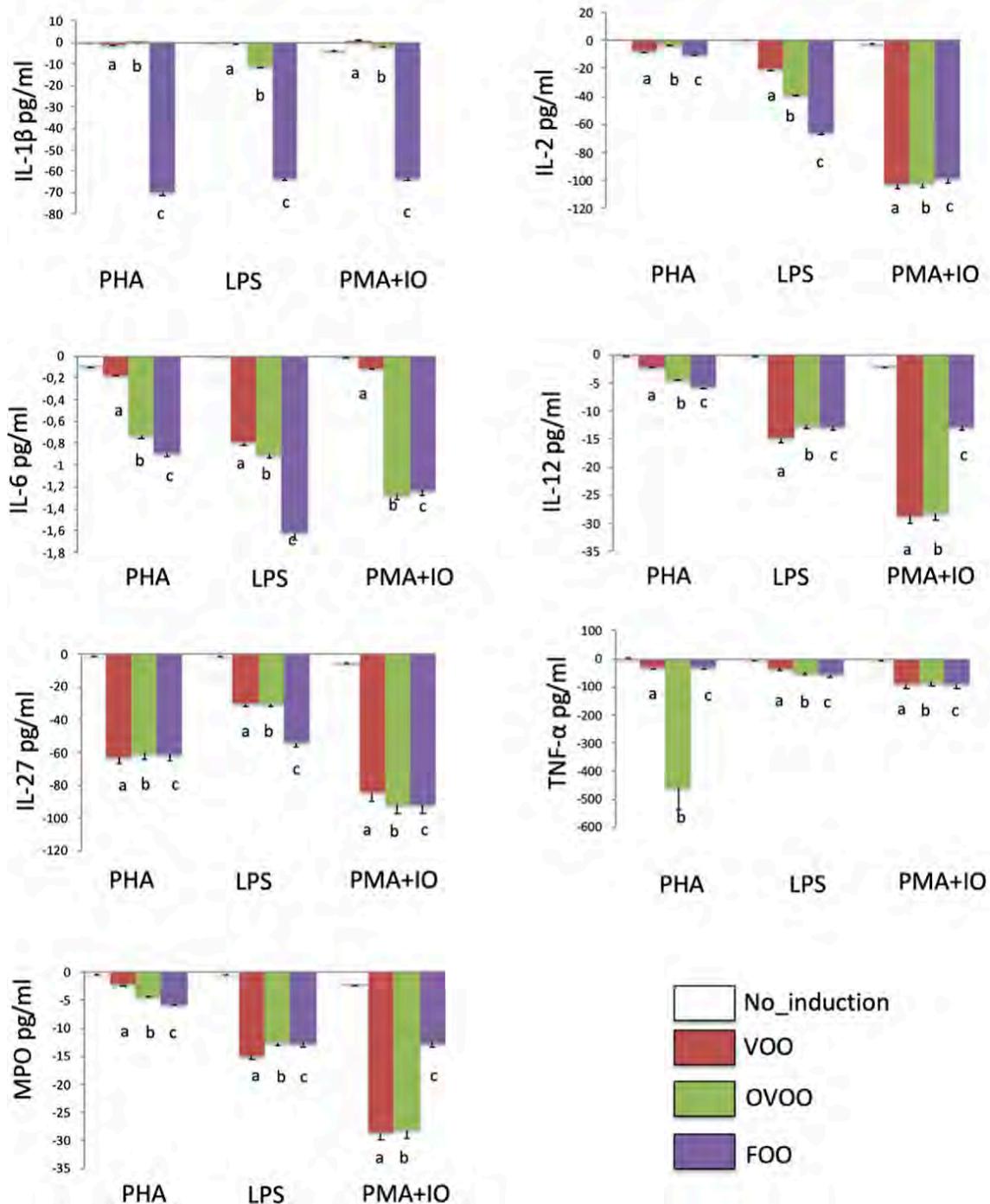


Figure 6. Plasma IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-27, TNF- α and MPO *ex vivo* changes (post-intervention minus pre-intervention data) when stimulated with PHA, LPS or PMA + IO in whole blood cultures from healthy adults. Values are expressed as the means \pm SEMs. ANOVA was used to compare differences between interventions and induction treatments. The Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among groups.

$p < 0.05$ was considered significant and therefore a, b and c groups are showed. FOO, functional olive oil; IO, ionomycin; OVOO, optimized virgin olive oil; PHA, phytohemagglutinin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; VOO, virgin olive oil.

4. Discussion

A recent study emerging from the NUTRAOLEUM trial [8] has been able to provide a first level of evidence on the *in vivo* health benefits of olive oil triterpenes (oleanolic and maslinic acids) in healthy humans, establishing that metabolic syndrome and endothelial function biomarkers (HDLc and endothelin-1, respectively) improved noticeably after intake of the three olive oils after *in vivo* and *ex vivo* analyses [10]. Moreover, an additional study has reported a decrease in both DNA oxidation and the levels of plasma inflammatory biomarkers like IL-8 and TNF- α after olive oil consumption [9]. The present study provides additional evidence of such potential benefits by analyzing an additional panel of numerous oxidation and inflammation biomarkers.

Differently from the above-mentioned analyses, an *ex vivo* approach was selected in the present one, which included the artificial induction of an inflammatory state in the blood collected from the patients of the NUTRAOLEUM trial. Such immune challenge was performed through the addition of different chemicals to the *ex vivo* blood culture. In the first case, we used the phytohemagglutinin (PHA) from *Phaseolus vulgaris* (red kidney bean), which is well-known as a selective T cell mitogen [11]. The interaction mechanisms between PHA and T-cell are still poorly known, although several authors suggest the involvement of activating signals via the CD2 receptor [12-14] or similarly to other lectins, through Ca²⁺ influx via different calcium channels than those utilized by CD3-specific signaling pathways [15].

Lipopolysaccharide (LPS) administration is commonly used as a model of inflammation in different cell systems [16-18], which is accompanied by the production and release of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) among others. The LPS model was originally developed to mirror certain aspects of septic shock in humans. Nevertheless, this model may be an effective first-line general inflammation model and may be used to determine the anti-inflammatory potential of test compounds. LPS stimulates monocytes/macrophages through TLR4, resulting in the activation of a series of signaling events that potentiate the production of inflammatory mediators [19].

The third induction method used here consisted in the combination of PMA + IO. PMA is a small organic compound which diffuses through the cell membrane into the cytoplasm, directly activating protein kinase-C (PKC), therefore overlapping the stimulation of surface receptors. It is commonly used in combination with the calcium ionophore ionomycin, which is able to induce the release of calcium needed for the activity of nuclear factor of activated T-cells (NFAT) transcription factors, that are present in most immune cells and regulate immune response for example by triggering the expression of IL-2.

The results showed here reveal that the three methods were able to elicit a pro-inflammatory response of the *ex vivo* cultured blood, with differential characteristics due to the nature and the molecular mechanisms involved in the induction. Overall, most

inductions resulted in increased levels of NO in the plasma samples, enhanced presence of iNOS, differential patterns of Tyr-nitration in the protein extracts and higher levels of the numerous biomarkers analyzed and quantified in the plasma as well. Such important changes did not alter significantly the viability of the blood cells, as determined experimentally by means of Trypan blue staining. Independently of the induction method used, no significant differences were detected neither between treatments, nor between induced and non-induced cultures, with viabilities always higher than 78% in all cases (results not shown). Such a high viability clearly indicated that the inductions were carried out within physiological ranges and along a reasonable period of time. The expression and the levels of the markers analyzed were noticeably modulated by the nutritional interventions designed in NUTRAOLEUM, with a pronounced decrease of the pro-inflammatory response of the cultures.

One of the main advantages of the use of the *ex vivo* induction methods described here consists in the enhanced immunoresponse derived from the inductions, which magnify the levels of the biomarkers analyzed bringing to light potential differences between the interventions, which otherwise would remain hidden, particularly in healthy subjects as those taking part of the NUTRAOLEUM trial.

In the present work we have selected a number of indicative markers involving the extension and characteristics of inflammatory processes. Thus, NO is considered the most important reactive nitrogen species, playing a key role in the pathogenesis of inflammation [20]. Whereas promoting anti-inflammatory effects under physiological conditions, overproduction of NO is considered as a pro-inflammatory mediator in pathological situations, and is released in vast amounts by cytokine-activated macrophages in immune responses. The undesired effects of NO overproduction, including vasoconstriction, inflammation and tissue damage can be reduced/modulated by different means, including the use of inhibitors of NO biosynthesis, synthetic arginine analogues, or by reducing the activation of macrophages by pro-inflammatory cytokines. As we can see in the present work, there is a good correlation between the levels of NO in the different samples and the presence of inflammatory cytokines, which are in all cases lowered by the food interventions carried out in this assay.

Production of NO requires nitric oxide synthase (NOS), which catalyzes the oxidation of L-arginine to L-citrulline. Three different isoforms of NOS have been described in mammals, including the constitutively expressed endothelial (eNOS), and neuronal (nNOS) forms, together with an inducible (iNOS) form [21]. Expression of iNOS has been described after the generation of inflammatory stimuli in various cell types such as macrophages, dendritic cells, neutrophils, epithelial cells in the gut and lung mucosa, smooth muscle cells, and stromal cells of secondary lymphoid organs (reviewed by [22]). In the present work, we describe the presence of the enzyme in the different inflammatory scenarios. iNOs is clearly increased after activation of blood samples with the different chemicals, whereas its presence is clearly lowered in a significant way by the different interventions analyzed here, which concomitantly decrease the presence of NO in the samples in a parallel manner.

Superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and NO are known to bind to form peroxynitrite. Peroxynitrite and/or peroxynitrite-derived intermediates can induce free nitrate or protein-bound tyrosine residues to form 3-nitro-tyrosine. The detection of protein-bound 3-nitrotyrosine is often used as a marker for both inflammation and NO production. The present work demonstrated that increased NO production does not necessarily elicit an increase in the quantitative presence of 3-Tyr-nitrated proteins but to changes in the profiles of proteins modified this way, which are likely indicative of the fine tuning mediated through NO-signaling events.

The present work also analyzes the expression of a broad panel of pro-inflammatory cytokines. Cytokines are small molecular weight proteins or peptides secreted by many cell types (particularly immune system cells) that regulate the duration and intensity of the immune response [23]. They have been described in multiple physiological processes, and particularly in the regulation of immune and inflammatory responses. Significant changes in their optimal concentrations may alter normal physiology, contributing to the development of pathological events in several diseases. Particularly relevant for immune response are cytokines released by CD4+ T cells [24].

[23] review the optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment, in a similar way to that described here. These authors also used different inflammatory inducers, and analyzed the production of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, RANTES and TGF- β cytokines in rat whole blood cultures, observing a rapid increase in the secretion of IL-2, IFN- γ , TNF- α , RANTES and TGF- β shortly after PMA and ionomycin induction. Such results are highly coincident with those showed in the present work as regard to IL-2 and TNF- α , and have been extended here to other relevant cytokines like IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-27 and MPO. All cytokines assayed here showed a highly noticeable increase after the induction of blood, and their presence was in most cases lowered by the interventions with oils. [23] also assessed the use of immunosuppressants like cyclosporine A (CsA) and azathioprine (AZP) in the whole blood cultures, which are known immunotoxic activity. In this case, the chemicals drastically inhibited the production of several cytokines, indicating the presence of toxicity in the immune system. Such reduction is not comparable to the moderate decrease in the levels of cytokines produced by the different oils assayed here, which thus can be attributed to an anti-inflammatory activity and not to a toxic effect. Such conclusion is also supported by the high viability of the blood cells determined before and after the assays.

The present work increases our knowledge regarding the beneficial effects of olive oil intake on the prevention of inflammatory events in humans, particularly in reference to its content in bioactive components like triterpenes (oleanolic and maslinic acids). In this case, we have demonstrated the positive effect of olive oil consumption on the maintenance of adequate levels of many inflammatory and oxidative markers, thus confirming early observations carried out by [9,10] using a limited number of biomarkers and mainly *in vivo*. Important information has been also obtained regarding the involvement of NO-signaling events in the changes observed. Enhanced sensitivity of induction methods might help to identify minute changes for example, between genders or between very similar interventions.

Using different induction methods as carried out here in combination with multiple biomarkers may also help to dissect the specific mechanisms involving inflammation, which are modulated by the different interventions. Also, they can provide additional information regarding the involvement of the different cells of the immune system, as are the T-cells in the anti-inflammatory response. Even in healthy patients, such methods may help to assess the inflammatory susceptibility of patients and/or the performance of the different anti-inflammatory mechanisms. Moreover, the use of *ex vivo* cultures and their induction also open a number of research alternatives for future research, including the analysis of pathological samples and the co-culture with different modulators of the immunoresponse including different fractions of oils, purified components (i.e polyphenols and triterpens), modified fatty-acids, and many others. The small volume of blood needed represents an advantage for multiple, comparative assays. Understanding the cellular and molecular mechanisms through which oil and oil components improve

anti-inflammatory responses could help to design better strategies for the clinical and nutritional management of inflammation-derived diseases.

Author Contributions: J.A.E.-C., B.G.-E., R.d.I.T., M.F., M.I.C., J.D.A., E.M.d.V., A.G., and M.D.M. designed the research. E.L., V.A., E.S.-R., S.B.-G., J.R.F.-N., M.A.C., and J.D.A. M.D.M. conducted the research. P.V. carried out prior olive oil analyses and helped with the discussion. E.L., J.C.J., F.J.G. and V.A. carried out biochemical analyses. E.L., V.A., J.D.A., E.M.d.V., and M.D.M. analyzed the data and performed the statistical analysis. E.L., V.A. and J.D.A. wrote the paper. E.L., V.A., E.S.-R., E.M.d.V., A.G. and M.D.M. had primary responsibility for the final content. All authors read and approved the final manuscript. This paper contains results included in the doctoral thesis of Víctor Alché, which was written within the context of Clinical Medicine and Public Health at the University of Granada.

Funding: The “NUTRAOLEUM Study” has been supported by the grant ITC-20131031 from the I+D FEDER-INTERCONNECTA (CDTI) and Junta de Andalucía, Spain. The present work was funded by research projects P2010-AGR6274 P2011-CVI-7487, CA8313, P18-RT-1577 (Junta de Andalucía, Spain), RTC-2015-4181-2; RTC-2016-4824-2; RTC-2017-6654-2 (Spanish Program “Retos-Colaboración”); 201540E065/09021200008 (“Proyecto intramural”/Research agreement CSIC, Spain), BFU-2016-77243-P (“Plan Nacional I+D”, Spain), all of them co-funded by EU ERDF funding. Part of the research corresponds to the development of a European MARIE CURIE (FP7-PEOPLE-24 2011-IOF) Project, through the grants PEOF-GA-2011-301550 awarded to José Carlos Jiménez López, Karam B Singh and Juan de Dios Alché, and RYC-2014-16536 (“Programa de Investigación Ramón y Cajal”, MINECO, Spain) awarded to J.C Jiménez López.

We thank ACER CAMPESTRES S.L., SAN FRANCISCO DE ASIS Coop. And., and AGROINSUR S.L., for the funding provided. We appreciate the support received from the workers of the clinical trials unit of the “Virgen de las Nieves” and “San Cecilio” hospitals by finding subjects for the study and for their involvement in the intervention; we thank Laura Campaña Martín, Maria Victoria Martín Laguna, M^a Cruz Rico Prados and Diana Fuensanta Nicolás, who carried out technical work, sample preparation and biomarker analyses, and Antonio Jesús Castro and Llenalia Garcia Fernández, who supervised the statistical analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Omar, S. H. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.* 2010, 18,111–121.
2. Loizzo, M. R.; Lecce, G. D.; Boselli, E. Menichini, F. and Frega, N. G. Inhibitory activity of phenolic compounds from extra virgin olive oils on the enzymes involved in diabetes, obesity and hypertension. *J. Food Biochem.* 2011, 35, 2, 381–399, 2011.
3. Cicerale, S.; Lucas, L. J. and Keast, R. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Op. in Biotec.* 2012. 23, 2, 129–135.
4. Covas, M.I.; de la Torre, R. and Fitó, M. Virgin olive oil: a key food for cardiovascular protection. *Br. J. Nutr.* 2015, 113, S19–28.

5. Lozano-Mena, G.; Sánchez-González, M. and Planas, J.M. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives--a promising nutraceutical. *Molecules*. 2014, 19(8), 11538–11559.
6. Valls, R.N.; Farrás, M.; Suárez, M.; Fernández-Castillejo, S.; Fitó, M.; Konstantinidou, V. et al. Effects of functional olive oil enriched with its own phenolic compounds on endothelial function in hypertensive patients. A randomised controlled trial. *Food Chem*. 2015, 167, 30–35.
7. Fernández-Castillero, S.; Valls, R.M.; Castañer, O.; Rubio, L.; Catalán, U.; Pedret, A. et al. Polyphenol Rich Olive Oils improve Lipoprotein Particle Atherogenic Ratios and Subclasses Profile: A Randomized, Crossover, Controlled Trial. *Mol. Nutr. Food Res*. 2016, 15, 8, 114-116.
8. Biel, S.; Mesa, M.D.; de la Torre, R.; Espejo, J.A.; Fernández-Navarro, J.R.; Fitó, M.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rosa, C.; Marchal, R.; Alche, J.D.; Expósito, M.; Brenes, M.; Gandul, B.; Calleja, M.A. and Covas M.I. NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils BMC Complement. Altern. Med. 2016, 16(1), 404.
9. Sánchez-Rodríguez, E.; Biel-Glesson, S.; Fernandez-Navarro, J.R.; Calleja, M.A.; Espejo-Calvo, J.A.; Gil-Extremuera, B.; de la Torre, R.; Fito, M.; Covas, M.I.; Vilchez, P. ; Alché, J.D.; Martínez de Victoria, E.; Gil, A. Mesa, M.D. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients*. 2019 Mar 6, 11(3):561.
10. Sánchez-Rodríguez, E.; Lima-Cabello, E.; Biel-Glesson, S.; Fernandez-Navarro J.R.; Calleja, M.A.; Roca, M.; Espejo-Calvo, J.A.; Gil-Extremuera, B.; Soria-Florido, M.; de la Torre, R.; Fito, M.; Covas, M.I.; Alché, J.D.; Martínez de Victoria, E.; Gil, A. and Mesa, M.D. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Metabolic Syndrome and Endothelial Functional Risk Biomarkers in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients*. 2018, 16, 10(5):626.
11. Movafagh, A.; Heydary, H.; Mortazavi-Tabatabaei, S.A. and Azargashb, E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J. Pharm. Res*. 2011, 10, 895–903.
12. O'flynn, K.; Russul-saib, M. and Linch, D.C. Different pathways of human T-cell activation revealed by PHA-P and PHA- M. *Immunology*. 1985, 57, 55-60.
13. Tiefenthaler, G. and Hünig, T. The role of CD2/LFA-3 interaction in antigen- and mitogen-induced activation of human T cells. *Int. Immunol*. 1989, 1(2), 169-75.
14. Hünig, T.; Wallny, H.J.; Hartley, J.K.; Lawetzky, A. and Tiefenthaler, G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1989, 169, 73–86.
15. Pang, B.; Shin D.H.; Park, K.S. and Kim, S.J. Differential pathways for calcium influx activated by concanavalin A and CD3 stimulation in Jurkat T cells. *Pflugers Arch*. 2012, 463(2), 309-318.
16. Ho, Y.H.; Lin, Y.T.; Wu, C.W.; Chao, Y.M.; Chang, A.Y. and Chan, J.Y. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *J. Biomed. Sci*. 2015, 22, 46

17. Krishna, S.; Dodd, C. A. and Filipov, N. M. Behavioral and monoamine perturbations in adult male mice with chronic inflammation induced by repeated peripheral lipopolysaccharide administration. *Behav. Brain. Res.* 2016, 302, 279–290
18. Zakaria, R.; Wan Yaacob, W.M.; Othman, Z.; Long, I.; Ahmad, A.H. and Al-Rahbi, B. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer' s disease. *Physiol. Res.* 2017, 65, 553–565
19. Fang, H.; Pengal, R.A.; Cao, X.; Ganesan, L.P.; Wewers, M.D.; Marsh, C.B. and Tridandapani, S. Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Inflammatory Response Is Regulated by SHIP. *J. of Immunol.* 2004, 173(1), 360-366
20. Sharma, J.N., Al-Omran, A. and Parvathy, S.S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol.* 2007, 15, 252–259
21. Fukuto, J.M. and Chaudhuri, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995, 35, 165–94
22. Sonar, S.A. and Lal, G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front. in Immunol.* 2019, 10, 710
23. Ai, W.; Li, H.; Song, N.; Li, L. and Chen, H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int. J. Environm. Res. Public Health.* 2013, 10(9), 3834–3842.
24. Van der Meide, P.H. and Schellekens, H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy.* 1996, 8, 243–249

4.2 Las harinas purificadas de semillas de olivo poseen efectos antiinflamatorios en sangre completa de pacientes diabéticos cultivada ex vitro y en cultivos in vitro de células pancreáticas.

4.2.1 Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos.

Para este estudio se seleccionaron 6/8 pacientes diabéticos de tipo 2 y controles no diabéticos del área de cobertura del área básica "Pedro Martínez" (A.G.S. noreste Granada, España), según los criterios de clasificación de la Organización Mundial de la Salud, y el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión establecidos. Los parámetros clínicos del grupo de sujetos que participaron en el estudio están recogidos en la siguiente tabla (Tabla 3). Los sujetos controles y los pacientes con DT2 no mostraron diferencias significativas en los parámetros de edad. Sí que se observaron diferencias significativas en relación al índice de masa corporal (IMC). Existen también diferencias significativas en los niveles de glucemia ($P < 0,001$), presión sanguínea ($P < 0,001$), frecuencia cardíaca ($P < 0,001$) así como hemoglobina glucosilada (HbA1c) ($P < 0,001$).

	Sujetos Control	DT2	P-valor
Hombres	6	8	
Edad	50 (40,53)	48 (45,58)	0.007
Glucemia (mg/dL)	83 (80, 91)	165 (132, 198)	<0.001
Presión Sanguínea (mmHg)	12/7 (11/7, 12/7)	15/8 (14/8, 15/7)	<0.001
IMC (kg/m ²)	24.8 (23, 26.6)	33.3 (27.5, 46.7)	<0.001
Frecuencia Cardíaca (bpm)	64 (65, 76)	84 (96, 80)	<0.001
HbA1c %	5.5 (5.4, 5.7)	6.7 (6.0, 7.4)	<0.001

Tabla 3. Características del grupo de estudio. La comparación de medias entre los diferentes parámetros fue realizada a través de un ANOVA. El nivel de significación estadística fue asumido como $p < 0,01$ (representado en negrita).

Tras la extracción de sangre periférica y realizar las correspondientes inducciones con lipopolisacárido (LPS), fitohemoaglutinina (PHA), y forbol-12-miristato-13-acetato junto con ionomicina (PMA+IO) y someter los cultivos a co-cultivo con distintas concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas como se describe en el apartado de material y métodos se procedió a la determinación de diversos biomarcadores en el plasma aislado. Como se puede apreciar en la Figura 14, la producción de estos marcadores por parte de individuos sanos y en ausencia de estímulos fue insignificante. El tratamiento tanto con LPS, PHA, como con PMA+IO estimuló significativamente tanto la producción de IL-1 β (Figura 14 A) como de iNOS (Figura 14 B). Cuando se añadió al cultivo de sangre entera de forma concomitante tanto LPS, PHA, ó PMA+IO y la harina de semilla, se observó un claro descenso de estos dos marcadores, llegando al nivel basal (Figura 14 A, Figura 14 B, respectivamente). Para ver si esta harina de semilla tenía algún efecto sobre estos dos marcadores, dicha harina fue añadida de forma aisladamente, en ausencia de inducción, no observándose ningún cambio con respecto al control (Figura 14 A, Figura 14 B). A la vista de estos resultados podemos concluir que esta proteína podría tener propiedades antiinflamatorias.

Cuando se realizaron experimentos paralelos en pacientes diabéticos, observamos niveles elevados de los marcadores IL-1 β (Figura 15 A) e iNOS (Figura 15 B) aún en muestras no inducidas (Figura 15, muestras DT2), lo que refleja la existencia de fenómenos inflamatorios basales con respecto a sujetos sanos (Figura 15, muestras C). Las muestras de pacientes diabéticos en cultivos de sangre completa también fueron hipersensibles a la inflamación inducida por PHA, LPS y PMA + IO, como se demuestra por la presencia de ligeros aumentos de los niveles de IL-1 β y e iNOS en plasma (Figura 15 A, Figura 15 B, respectivamente). La adición de extractos de harina de semilla de oliva produce signos inequívocos de reducción de la respuesta inflamatoria, probablemente consistentes en la modificación del complejo de reacción inflamatoria subclínica de los pacientes diabéticos mediante la reducción de los niveles y/o la actividad biológica de IL-1 β , iNOS (Figura 15 A, Figura 15 B, respectivamente).

Podríamos concluir que los componentes específicos de la harina de semilla de oliva son en última instancia responsables de estos efectos antiinflamatorios. Dichos componentes están aún por ser caracterizados de forma precisa. Tal caracterización ayudará a diseñar nuevos enfoques terapéuticos para estos pacientes.

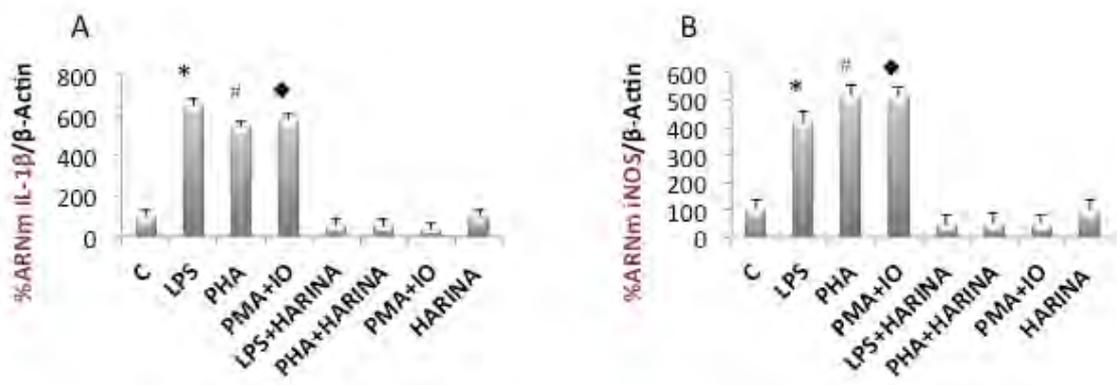


Figura 14; La sangre completa de sujetos sanos fue incubada con LPS, PHA, PMA+IO de manera individual, y de manera concomitante con LPS, PHA, PMA+IO y las harinas de semilla de olivo. Las barras representan la IL-1 β (figura A) y la iNOS (figura B) respectivamente en sujetos sanos. C: muestras no inducidas.

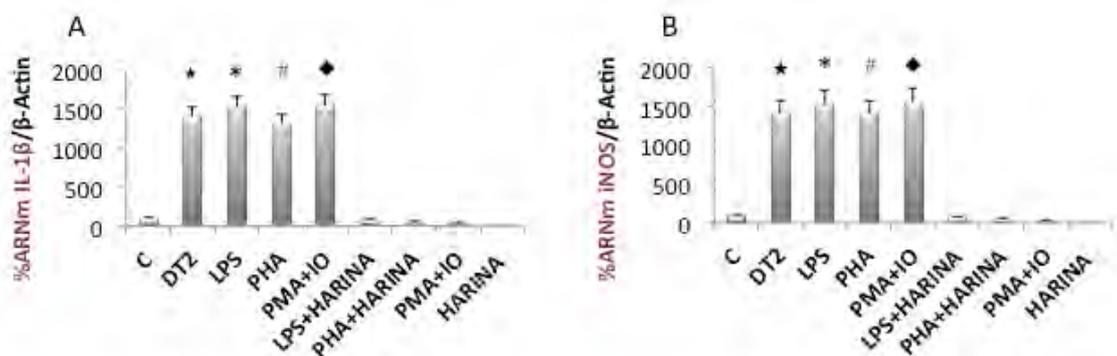


Figura 15; La sangre completa de pacientes diabéticos (DT2) fue incubada con LPS, PHA, PMA+IO de manera individual, y de manera concomitante con LPS, PHA, PMA+IO y las harinas de semilla de olivo. Las barras representan la IL-1 β (figura A) y la iNOS (figura B) respectivamente en DT2. C: muestra sin inducir de sujeto sano.

OLIVECOM-SAL-6.

EFFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DE HARINAS PURIFICADAS DE SEMILLAS DE OLIVO EN CULTIVOS CELULARES PANCREÁTICOS.

Elena Lima-Cabello¹, Víctor Alché², Jose C. Jimenez-Lopez¹, Juan D. Alché^{1*}

1 – Grupo de Biología Reproductiva de Plantas; Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas; Estación Experimental del Zaidín; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada E-18008. España

2 – Servicio Andaluz de Salud (SAS), Granada, España

RESUMEN

El fraccionamiento de la aceituna de forma previa a su procesado en las almazaras es una fuente de nuevos y valiosos productos con alto valor añadido. Uno de estos productos son las harinas procedentes de la semilla del hueso, que están siendo valoradas por su alto contenido en componentes nutricionales y por sus emergentes capacidades nutraceuticas. Estudios previos realizados exclusivamente *ex vitro* mediante cultivos sanguíneos de sujetos controles sanos y con diabetes tipo 2, han permitido determinar que la adición de extractos de harina de semilla de oliva produce signos inequívocos de modificación del complejo de reacción inflamatoria subclínica de los pacientes diabéticos que cursa con una reducción de los niveles y/o la actividad biológica de ambos marcadores (IL-1 β e iNOS). En el presente trabajo reproducimos los experimentos en cultivos celulares de células pancreáticas inducidos con tres inductores diferenciales de inflamación, ensayando de forma adicional los efectos potenciales sobre marcadores relevantes de estrés oxidativo.

Palabras clave: células pancreáticas, harina, inflamación, oxidación, semilla,

INTRODUCCIÓN

La dieta mediterránea utiliza el aceite de oliva como fuente principal de grasa. El sector del aceite de oliva es uno de los de mayor relevancia socioeconómica en España, ya que nuestro país produce casi la mitad del aceite de oliva del mundo. El aceite de oliva, y especialmente el AOVE ha demostrado ser un protector potencial frente a diversas patologías (enfermedad cardiovascular, procesos inflamatorios de bajo grado, daños oxidativos, cáncer etc.), debido a que contiene numerosos compuestos bioactivos entre los que destaca su fracción fenólica, con propiedades antioxidantes bien caracterizadas entre otras [1,2]. En la actualidad se están desarrollando procedimientos de deconstrucción o fraccionamiento de la aceituna, destinados a proporcionar nuevos y valiosos productos que supongan nuevos aprovechamientos industriales. Las harinas de semillas de olivo son uno de estos productos novedosos, a partir de los cuales se están diseñando usos múltiples, aparte de los más obvios como puedan ser la alimentación animal. Varios trabajos han centrado su atención fundamentalmente en las harinas procedentes de la semilla del hueso y su posterior valoración como ingrediente nutraceutico con aplicaciones en el ámbito alimentario. Trabajos recientes han

demostrado la capacidad antiinflamatoria de harinas purificadas de semillas de olivo [3,4] en pacientes diabéticos, mediante cultivos sanguíneos *ex vitro* de sujetos controles sanos y con DT2 (diabetes tipo 2), que se sometieron a co-cultivo con dichas harinas como "challenge". En este trabajo se procedió posteriormente a la cuantificación de moléculas marcadoras de actividad anti inflamatoria: la interleuquina 1 β (IL-1 β) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y se concluyó que la adición de extractos de harina de semilla de oliva a los cultivos produce signos inequívocos de modificación del complejo de reacción inflamatoria subclínica de los pacientes diabéticos que cursa con una reducción de los niveles y/o la actividad biológica de ambos marcadores (IL-1 β e iNOS).

Los ensayos realizados en sangre completa permiten inferir conclusiones como las indicadas anteriormente. Sin embargo, es preciso además investigar los efectos potenciales de estos compuestos en otros escenarios fisiológicamente diferenciales, como puedan ser los efectos sobre tejidos u órganos completos. Una de las aproximaciones más valoradas, sin perjuicio de la potencial realización de futuros ensayos clínicos en pacientes es la utilización de cultivos de tejidos humanos *in vitro*. Hay un flujo continuo de nuevos resultados de investigaciones que evidencian que las especies de oxígeno reactivo (ROS) realizan una contribución significativa a la progresión de distintas enfermedades y situaciones patológicas y sus complicaciones. El término estrés oxidativo se refiere a la situación en la que se produce un desequilibrio a favor de la generación de especies oxidadas, entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, lo que puede conllevar a un daño potencial de los tejidos [5-7]. La actuación de las ROS puede inducir modificaciones sustanciales en muchas biomoléculas esenciales (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). Como consecuencia de este estado de inflamación, se pueden causar daños oxidativos en el páncreas, hígado y riñón [8]. Es por ello que la identificación de nuevos productos alimenticios que ayuden a controlar los niveles de ROS y la respuesta inflamatoria, puede permitir el diseño de estrategias de complementación de los tratamientos farmacológicos tradicionales.

El presente trabajo pretende evaluar el efecto antiinflamatorio potencial de las harinas de semilla de olivo en cultivos celulares pancreáticos, utilizando un marcador característico ya identificado como es la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Estos resultados pretenden confirmar los resultados previos obtenidos en sistemas de cultivo de sangre *ex vitro*, como forma previa de identificar los mecanismos específicos de interacción de este material en humanos, y por tanto generando información adicional con objeto de diseñar alimentos funcionales de utilidad dirigida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Para realizar los cultivos celulares se utilizó la línea celular PANC-1 (Centro de Instrumentación científica, Universidad de Granada) obtenida a partir de células epiteliales pancreáticas de humano caucásico. Las células PANC-1 fueron crecidas en frascos de 75 cm² revestidos de poli-L-lisina (~2.0–2.5 x 10⁶ células/ml) con DMEM (*Sigma*) suplementado con 2 mM de glutamina y un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con un 5% de CO²/95% aire a 37°C. El crecimiento celular fue en monocapas y se realizaron rutinariamente sub-cultivos utilizando la tripsinización como método de separación de las células adheridas cuando la confluencia de éstas alcanzaba el 90% de la superficie. Para ello, las células fueron lavadas un par de veces con PBS y tratadas con un 0.25%

de tripsina-EDTA (*Lonza*) en el incubador con un 5% de CO²/ 95% aire a 37°C durante 10 minutos. El efecto de la tripsina se neutralizó con la adición del doble de volumen de medio de cultivo. A continuación, las células fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos y lavadas con PBS para los ensayos de viabilidad. Tanto la viabilidad como el conteo celular fueron analizados con el contador de células automático *Countess II FL* (*Thermo Fisher*) al comienzo y al final de cada experimento. La viabilidad fue siempre superior al 95%.

Reactivos utilizados sobre la línea celular

Para la realización de los experimentos, las células fueron cultivadas hasta alcanzar el 80% de confluencia y luego fueron tratadas con LPS durante 24 horas. Además, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas (10,5 y 2.5 mg/ml). Como control se dejó un frasco sin estimular con fines comparativos. Tras el tratamiento, las células fueron usadas para los experimentos que se comentan a continuación.

Ensayo de viabilidad por MTT

Se utilizó el método colorimétrico del MTT ((Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol) para determinar el efecto citotóxico del LPS (1µg/ml) y de las diferentes concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas (10.5 y 2.5 mg/ml) sobre la línea celular. Para ello, las células PANC-1 fueron sembradas en placas de 96 pocillos en presencia de medio de cultivo (10³ células en 100 µL de medio por pocillo) y se incubaron toda la noche. Tras esta incubación las células fueron tratadas con LPS exclusivamente y también con LPS en combinación de extractos proteicos de harinas de semillas (10.5 y 2.5 mg/ml) respectivamente. Se realizaron dos réplicas para cada experimento.

Las células viables con un metabolismo activo son capaces de captar el MTT y reducirlo a cristales de formazán mediante la enzima mitocondrial succínico deshidrogenasa. El formazán es un compuesto de color violeta cuya máxima absorbancia se encuentra cerca de 570 nm. Las células muertas no son capaces de convertir el MTT en formazán por lo que la cuantificación de este compuesto coloreado es un marcador de células viables únicamente.

Para realizar este ensayo de viabilidad, se adicionaron 10 µL de MTT 12mM a las células de cada pocillo y el cultivo se mantuvo a 37°C durante 4 horas. A continuación se le añadió 100 µL de la solución SDS-HCl y posteriormente, se incubó la placa a 37°C durante 4 horas. Por último se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

PCR a tiempo real

Se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real para la determinación de la expresión del gen iNOS (óxido nítrico sintasa inducible). El ARN total fue aislado mediante la utilización del kit *RNeasy Tissue isolation kit* (*Quiagen*). La primera hebra de ADNc fue sintetizada utilizando el kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystem*). Para los ensayos de expresión, el ADNc fue amplificado utilizando el sistema de PCR cuantitativa *LightCycler 480* (*Roche*). La sonda utilizada fue aquella disponible por *TaqMan Gene Expression Assays: Hs01075529_m1* (*Applied Biosystems*). Los cambios en los niveles de expresión de este gen fueron determinados mediante el método 2- $\Delta\Delta C_t$ [9]. El número de ciclos a partir del cual el transcrito fue detectado (CT) fue normalizado con respecto al número de ciclos al cual se detecta el gen constitutivo

elegido (β -Actina) (Hs99999903_m1, *Applied Biosystems*) referido como Δ CT. La eficiencia de la PCR fue determinada por análisis basados en la curva estándar para la amplificación del gen elegido y del control endógeno, las cuales fueron altamente similares.

Análisis de datos

Los valores fueron expresados como media \pm S.E.M. de tres experimentos individuales. El significado estadístico de estos resultados se obtuvo utilizando el software SPSS mediante el análisis de la variación seguida del análisis Dunnet. Los valores con un valor $P \leq 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Valoración de la viabilidad celular

Los cultivos celulares PANC-1 se establecieron de forma adecuada sobre los frascos de cultivo, observándose un crecimiento relevante en monocapa (Figura 1).

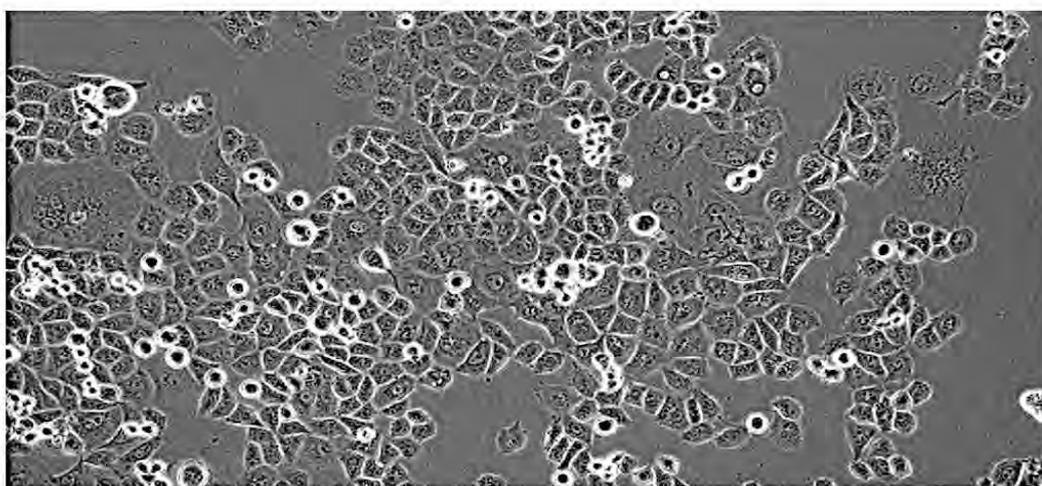


Figura 1. Crecimiento en monocapa de las células pancreáticas PANC-1 en cultivo.

Para evaluar el efecto de extractos proteicos de harinas de semillas sobre la línea celular PANC-1 se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando la técnica de MTT a diferentes concentraciones (Tabla 1). La incubación de las células con la harina procedente de semillas de olivo no produjo cambios significativos respecto al control con ninguna de las dos concentraciones ensayadas, manteniéndose viabilidades muy próximas al 100 % (Tabla 1).

Tratamiento	% Viabilidad*
Control	100
Harina (10.5mg/ml)	97.3 ± 1.6
Harina (2.5mg/ml)	98.6 ± 0.9

Tabla 2. Efecto de los distintos grupos de tratamiento sobre la viabilidad celular de células humanas PANC-1 durante 24h de incubación. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas sobre la línea celular PANC-1 a 10.5mg/ml y 2.5mg/ml respectivamente. La viabilidad celular* (%) fue determinada como el cociente entre la A₅₇₀ de los distintos tratamientos y la A₅₇₀ del grupo control. Los valores son medias ± SEM de un experimento típico por triplicado

De la misma manera se evaluó el efecto citotóxico del inductor LPS, sobre la línea celular PANC-1 a una concentración 1µg/ml. Esta concentración fue elegida sobre la base de estudios realizados anteriormente en el laboratorio (datos sin publicar). Finalmente, una vez fijadas las condiciones con las que se realizarían los ensayos de viabilidad, se evaluó el efecto de la incubación simultánea de las células en cultivo con extractos proteicos de harinas de semillas de concentraciones 10.5mg/ml y 2.5mg/ml y con el inductor (LPS) (Tabla 2). En ninguno de los casos reflejado en la tabla se vio comprometida la viabilidad celular, que se mantuvo significativamente en niveles próximos al 100 %.

Tratamiento	% Viabilidad*
Control	100
LPS (1µg/ml)	98.7 ± 1.8
LPS (1µg/ml)+ Harina (10.5mg/ml)	95.4 ± 1.2
LPS (1µg/ml)+ Harina (2.5mg/ml)	97.2 ± 2.2

Tabla 3. Efecto de los distintos grupos de tratamiento sobre la viabilidad celular de células humanas PANC-1 durante 24h de incubación. Las células fueron tratadas con el inductor, con el inductor y de manera conjunta con diferentes concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas con la concentración de 10.5mg/ml y 2.5mg/ml. La viabilidad celular* (%) fue determinada como el cociente entre la A₅₇₀ de los distintos tratamientos y la A₅₇₀ del grupo control. Los valores son medias ± SEM de un experimento típico por triplicado.

Efecto de los extractos proteicos de harinas de semillas sobre la expresión del gen *iNOS*

Como puede observarse en la Figura 2, en las células tratadas con el inductor LPS tiene lugar un aumento muy significativo en los niveles del ARNm de la *iNOS* frente al grupo control. Este incremento se vuelve menos acusado cuando de manera concomitante tratamos a las células con extractos proteicos de harinas de semillas, llegando a los

niveles del grupo control (Figura 2). Cuando tratamos a las células de manera aislada con extractos proteicos de harinas de semillas no existen cambios significativos en los niveles de *iNOS* con respecto al grupo de células sin tratar.

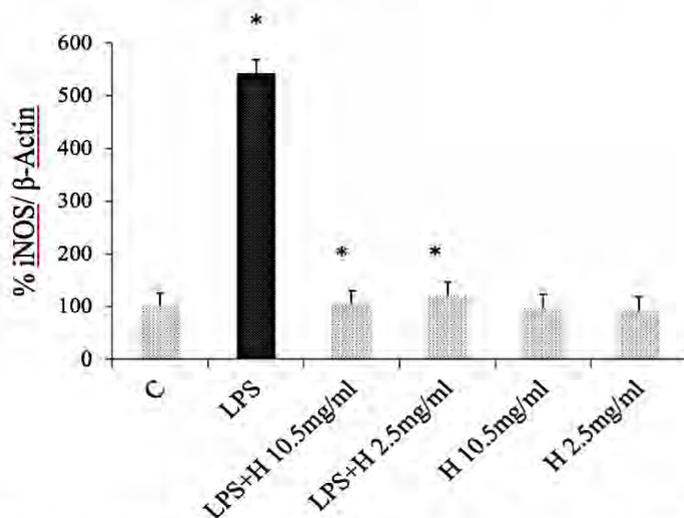


Figura 2. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión del gen *iNOS* en los diferentes grupos de células tratadas con el inductor, con el inductor y de manera simultánea con diferentes concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas (10.5mg/ml y 2.5mg/ml respectivamente) y con diferentes concentraciones de extractos proteicos de harinas de semillas (10.5mg/ml y 2.5mg/ml respectivamente) de manera aislada. Valores expresados como la media \pm SEM de un experimento típico por triplicado. * $p < 0,05$ LPS versus C, ** $p < 0,05$ LPS+H versus LPS

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran por una parte que es posible diseñar un escenario experimental de inducción de inflamación en células pancreáticas en cultivo *in vitro*, que cursa con un incremento de la producción de ciertos marcadores específicos (e.g. *iNOS* y otros no mostrados en el presente trabajo), sin afectar significativamente la viabilidad de las células del cultivo. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la adición de harinas de semillas de olivo a los cultivos no causa efectos deletéreos que disminuyan su viabilidad, siendo compatible esta adición con el análisis de distintos biomarcadores. La adición de la harina en varias concentraciones produce una clara disminución en la expresión de *iNOS*, compatible con una disminución del balance inflamatorio de estas células. Los resultados son análogos a los obtenidos en cultivos *ex vitro* [4], y por tanto confirman esta propiedad de las harinas de semillas de olivo a nivel potencialmente tisular *in vitro*. Numerosas cuestiones quedan abiertas, comenzando por la determinación precisa de los componentes antiinflamatorios de la semilla, que según descripciones presentes en la literatura así como resultados adicionales obtenidos en el grupo de investigación pueden ser múltiples. Como ejemplo, hemos descrito en trabajos anteriores la presencia de varios tipos de proteínas de almacenamiento de semillas (SSPs) de tipo β -conglutinas con efectos similares [10,11]. Formas heterólogas de estas β -conglutinas y otras SSPs están igualmente presentes en las semillas de olivo ([12] y resultados no mostrados). Aparte de los elementos proteicos, otros componentes de la semilla (e.g. polifenoles, triterpenos etc.) forman parte de la semilla completa y de las harinas derivadas, y muchos de estos componentes han sido descritos como antiinflamatorios en distintos sistemas. Futuros trabajos a desarrollar pretenden identificar estos compuestos de forma individualizada, ayudando a diseñar nuevos

enfoques terapéuticos para las diferentes enfermedades inflamatorias y el desarrollo de alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

Se ha generado un modelo celular para el estudio de la inducción de condiciones de “inflamación” *in vitro* en células pancreáticas PANC-1 que no afecta su viabilidad y que permite analizar la interacción con componentes agroalimentarios.

Las harinas de semillas de olivo no afectan la viabilidad de dicho sistema. Sin embargo, bajo condiciones de inducción, las harinas son capaces de modular un marcador bien consensuado de estado inflamatorio como es la iNOS, reduciendo sus niveles de expresión hasta cifras no diferentes de las condiciones control.

Es precisa una investigación más detallada para identificar los componentes precisos de la harina responsables de dicho efecto.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos BFU2016-77243-P, RTC-2015-4181-2, RTC-2016-4824-2 y 201540E065. JCJ-L agradece al MINECO la beca ref. RYC-2014-26 16536 (Programa “Ramón y Cajal”).

BIBLIOGRAFÍA

1. Covas MI, Ruiz-Gutiérrez V, de la Torres R, Kafatos A, Lamuela-Raventos RM. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutr Rev.* 2006; 64: 20-30.
2. Covas MI, Nysönen P, Poulse HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H. The EUROLIVE Study group, The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006; 145:333-341.
3. Lima E, Alché V, Zafra A, Benavente JM, Carmona S, Palma Y, Pan M, Pedrosa C, Sánchez-Rivas JP, Jiménez-López JC, Marco FM, Alché JD. Antiinflammatory effects of flours purified from olive seeds in diabetic patients. In: High school students for agricultural science research. 2015; 4:13-22 ISSN 2340-9746.
4. Lima-Cabello E, Alché V, Zafra A, Sánchez-Rivas JP, Jimenez-Lopez JC, Marco FM, Alché JD. Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos. En: El aceite de oliva. Actas Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2017, Fundación del olivar-EXPOLIVA (Eds.), Jaén (Spain), pp. SAL-05. ISBN: 987-84-46839-1-6
5. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiu E, Calle-Pascual A, Carmena R, Casamitjana R, Castano L, Castell C, Catala M, Delgado E, Franch J, Gaztambide S, Girbes J, Gomis R, Gutierrez G, Lopez-Alba A, Martinez-Larrad MT, Menendez E, Mora-Peces I, Ortega E, Pascual-Manich G, Rojo-Martinez G, Serrano-Rios M, Valdes S, Vazquez JA, Vendrell J. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia* 2012; 55(1):88-93.
6. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87(1):4-14.
7. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999; 104(6):787-794.
8. Calle MC, Fernandez ML: Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2012.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. 2001;25(4):402-8
10. Lima-Cabello E, Alché V, Foley RC, Andrikopoulos S, Morahan G, Singh KB, Alché JD, Jimenez-Lopez JC. Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.) β -Conglutin Proteins Modulate the Insulin

Signaling Pathway as Potential Type 2 Diabetes Treatment and Inflammatory-Related Disease Amelioration. *Molecular Nutrition and Food Research* 2017; 61(5). Feb 13.

11. Lima-Cabello E, Morales-Santana S, Foley RC, Melser S, Alché V, Siddique KHM, Singh KB, Alché JD, Jimenez-Lopez JC. Ex vivo and in vitro assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius*. *Journal of Functional Foods*. 2018; 40:510-519.

12. Zafra A, Jimenez-Lopez JC, Carmona R, Claros GM, Alché JD. Transcriptome-based identification of a seed olive legumin (11S globulin). Characterization of subunits, 3D modelling and molecular assessment of allergenicity. In: *Series: Lecture Notes in Computer Science Volume 9656 2016. Chapter: Bioinformatics and Biomedical Engineering*. Editors: Francisco Ortuño, Ignacio Rojas. Springer. ISBN: 978-3-319-31743-4

4.3 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* poseen actividad antiinflamatoria *ex vivo* e *in vitro*, y son capaces de modular la ruta de señalización de la insulina en cultivos pancreáticos resistentes esta hormona.

4.3.1 PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Alché, V.; Foley, R.C.; Andrikopoulos, S.; Morahan, G.; Singh, K.B.; Alché, J.D.; Jimenez-Lopez, J.C. (2017). Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.) β -Conglutin Proteins Modulate the Insulin Signaling Pathway as Potential Type 2 Diabetes Treatment and Inflammatory-Related Disease Amelioration. *Molecular Nutrition and Food Research* 61(5). Feb 13. doi: 10.1002/mnfr.201600819.

RESUMEN

Ámbito: Hemos investigado el uso potencial de las isoformas de las proteínas β -conglutinas del altramuz de hoja estrecha (*Lupinus angustifolius* L.) como un tratamiento frente a la diabetes.

Métodos y resultados: Producimos las proteínas recombinantes correspondientes a las conglutinas β 1, β 2, β 3, β 4, y β 6 y mostramos que β 1, β 3, y β 6 pueden unirse a insulina. Para evaluar el efecto modulador sobre las quinasas que median la activación de la insulina, incubamos cultivos de células mononucleares de sangre periférica obtenidos de pacientes con diabetes tipo 2 (TD2) y sujetos controles sanos con las proteínas de tipo conglutina. El tratamiento de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes TD2 con las proteínas β 1, β 3, y β 6 incrementó hasta 3 veces los niveles de mRNA y de proteína correspondientes a genes relevantes de las rutas de señalización de la insulina, en concreto el sustrato receptor de insulina 1/p85/AKT/transportador de glucosa tipo 4. Esto fue acompañado por una disminución comparable en los niveles de la expresión de genes pro-inflamatorios (iNOS y IL-1 β) y de dichas proteínas, en comparación con los controles sanos. Las isoformas β 2 y β 4 no tuvieron efecto sobre las rutas señalizadoras de la insulina. Sin embargo, dichas proteínas elicitaron efectos pro-inflamatorios puesto que incrementaron los niveles de mRNA y de proteína óxido nítrico sintetasa inducible y de IL-1 β .

Conclusión: Nuestros resultados plantean la posibilidad de usar esas proteínas β -conglutina particulares in la prevención y tratamiento de la diabetes, así como su potencial como moléculas anti-inflamatorias.

Running title: Narrow-leafed lupin β -conglutins modulate the insulin signalling pathway

Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β -conglutin proteins modulate the insulin signalling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration

Elena Lima-Cabello¹, Victor Alche², Rhonda C. Foley³, Sofianos Andrikopoulos⁴, Grant Morahan⁵, Karam B. Singh^{3,6}, Juan D. Alche¹, Jose C. Jimenez-Lopez^{1,6†}

1- Department of Biochemistry, Cell & Molecular Biology of Plants; Estacion Experimental del Zaidin; Spanish National Research Council (CSIC); 1 Profesor Albareda, Granada 18008, Spain.

2- Andalusian Health System; Health Center "Villanueva de las Torres", Granada 18530, Spain.

3- The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), CSIRO – Agriculture and Food, Centre for Environment and Life Sciences (CELS), 147 Underwood Ave, Floreat WA 6014, Australia.

4- Department of Medicine, Heidelberg Repatriation Hospital, The University of Melbourne, 300 Waterdale Road, Heidelberg West, VIC 3081 Australia.

5- Harry Perkins Institute of Medical Research, Centre for Diabetes Research, The University of Western Australia, 35 Stirling Highway, CRAWLEY, Perth WA 6009, Australia.

6- The UWA Institute of Agriculture, The University of Western Australia, 35 Stirling Highway CRAWLEY, Perth WA 6009, Australia.

† **Corresponding author:** Jose C. Jimenez-Lopez, PhD

1 Profesor Albareda Street, Granada 18008 Spain

josecarlos.jimenez@eez.csic.es / [jcyjimenez175@gmail.com](mailto:jcjimenez175@gmail.com)

Ph. +34 958181600, extension 137

ABSTRACT

Scope: We have investigated the potential use of β -conglutin protein isoforms from narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) as a diabetes treatment.

Methods and results: We produced purified recombinant β 1-, β 2-, β 3-, β 4-, and β 6-conglutin proteins and showed that β 1, β 3 and β 6 could bind to insulin. To assess β -conglutin proteins modulatory effect on insulin-activation mediated kinases, whole blood and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures from Type 2 diabetes (T2D) and healthy control subjects (C) were incubated with conglutin proteins. Treatment of PBMCs from T2D patients with β 1, β 3, and β 6 proteins increased mRNA and protein levels of genes important in insulin signalling pathways, namely IRS-1/p85 /AKT/GLUT-4. This was accompanied by a decrease in pro-inflammatory genes (iNOS and IL-1 β) mRNA and proteins compared to healthy controls. The β 2 and β 4 isoforms had no effect on the insulin signalling pathway. However, these β -conglutin proteins elicited pro-inflammatory effects since levels of mRNA and proteins of iNOS and IL-1 β were increased.

Conclusion: Our results raise the possibility of using these particular β -conglutin proteins in the prevention and treatment of diabetes, as well as their potential as anti-inflammatory molecules.

Keywords: Antioxidant; Anti-inflammatory; GLUT-4; IL-1 β ; Legumes; PI3-Kinase; Sweet lupins; Type 2 Diabetes; Vicilin.

INTRODUCTION

Recently, the health beneficial effects of plant-derived compounds have been increasingly investigated [1], including proteins from legume seeds [2], as food supplements [3]. These studies showed the biological activities of some legume proteins and proteins from other plant species as modulators of chronic diseases [4, 5]. However, most of these studies did not investigate the molecular mechanisms underlying these positive health effects. Furthermore, most studies used whole seeds, where thousands of compounds would be present, and thereby not defining the exact molecule(s) that promote particular health effects such as reduction of body weight, food intake [6], and a decrease in the LDL level in plasma [7].

Considerable interest has been focused towards legume seed proteins [8], especially those from lupins, a legume of the Fabaceae family. The seeds of the “Sweet Lupins” (*Lupinus angustifolius* or blue lupin; *Lupinus albus* or white lupin; and *Lupinus luteus* or yellow lupin) have low alkaloid content [9], and are attracting attention because of their nutritional attributes [10] and potential for disease improvement [11]. These properties are associated with the seeds’ high protein, dietary fiber content, which help reduce blood pressure and the risk of cardiovascular disease [12], as well as impacting on the prevention and treatment of Type 2 diabetes (T2D) [13]. The question that needs to be answered is which compound(s) among the lupin seed content mediates these effects.

Narrow-leafed lupin (NLL), *Lupinus angustifolius* (L.) seeds are rich in proteins, which belong to four main families: α , β , γ , and δ conglutins [14]. Of these, the β conglutins, a vicilin or 7S globulin, is the major seed storage protein in NLL and in *Lupinus* species [15], which belong to the Cupin superfamily [16], and mainly associated (as storage protein function) with plant physiological processes through the supply of aminoacids during seedling germination [17]. NLL seed storage proteins are getting increased awareness and international recognition as a potential food for humans as its protein-rich seeds contain a large quantity of dietary fibre, are low in fat and starch, are gluten-free and have a very low Glycaemia Index [18, 19]. Recently, seven genes coding for individual β -conglutins namely conglutin β 1 to conglutin β 7 have been identified in NLL [14, 15; (<http://www.lupinexpress.org>)]. The β -conglutins are the most highly expressed conglutin family in NLL, and constitute 56% of the total conglutin transcript content in NLL seeds [15]. Despite of that, nothing is known so far about the potential and alternative functions that individual NLL β -conglutin proteins may exhibit in relationship to health benefits.

At present, T2D is one of the main global health concerns with its ensuing deleterious complications such as retinopathy, neuropathy, heart attack and atherosclerotic vascular disease [20]. The aim of our study was to test the effects of different purified recombinant β -conglutin proteins on whole blood cultures from T2D patients and healthy control subjects.

MATERIAL AND METHODS

Construction of expression plasmids

The expression system used for bacterial expression was a modified variant of a pET28a vector (Novagen) containing an N-terminal polyhistidine (6xHis) Tag. A pUC57 vector containing a synthetic gene encoding for each conglutin protein GenBank accession number HQ670409 (β 1), HQ670410 (β 2), HQ670411 (β 3), HQ670412 (β 4), and HQ670414 (β 6), connected by restriction enzyme linkers consisting of ccatgg (NcoI) and ctcgag (XhoI) sequences were created synthetically by GenScript. The bacterial expression vectors pET28a(+)- β -conglutin - 6xHis-Tag for β 1, β 2, β 3, β 4, and β 6 were obtained via digestion of respective pUC57- β -conglutin construct using double NcoI and XhoI restriction enzymes digestion, followed by ligation of the β 1 to β 4 and β 6 fragments into the pET28a(+) vector.

Beta-conglutin protein variants over-expression

All β -conglutin proteins were expressed in Rosetta™ 2(DE3) pLysS Singles™ Competent Cells (Novagen). Proteins expression was performed by using the auto-induction method [21].

Briefly, a colony of *E. coli* containing the expression construct was isolated and grown for 20h in ZY-medium plus kanamycin at 50µg/ml at 37 °C and continuous shaking (200 rpm). The culture was diluted 1:150 in Studier medium and grown for a further 5h until cell density reached 0.7 OD 600nm, to subsequently inducing overexpression of the proteins by adjusting the temperature to 19 °C for another 16 h. Cells were collected by centrifugation at 5000xg at 4 °C. Bacterial cell pellet was rinsed two times with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5, removing the supernatant and the cell pellet was flash frozen using liquid nitrogen. The bacterial cell pellet was stored at -80 °C until further use.

Purification of recombinant conglutin β1, β2, β3, β4, and β6 proteins

Overall, protein purification from bacterial pellets was performed following company protocol recommendations (Qiagen) for His-tagged proteins. Briefly, the steps consisted in breaking cells, following by nickel affinity chromatography using Ni-NTA spin columns, and 6xHis-Tag at the C-terminal part of each β-conglutin protein. After elution of proteins from the column with an increasing imidazole concentration gradient (10 to 300mM), 2.5 ml fractions were collected. Fractions containing protein were analyzed using SDS-PAGE and fractions showing a single band corresponding to the expected molecular weight were pooled, aliquoted and flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80C until further uses. Purity of the protein samples resulted in >95%. Typical yields after nickel affinity chromatography were ~5-15 mg/ml.

β-conglutin antibody production

A peptide, Nt – VDEGEGNYELVGIR - Ct, specific for the seven NLL β-conglutin proteins variants was synthesised (Agrisera, Sweden). This peptide was used to immunize rabbits and to produce polyclonal antiserum. The rabbit immune serum was affinity-purified against the same synthetic peptides (Agrisera, Sweden).

Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitation (IP) was performed using the Thermo Scientific Pierce (Rockford, IL, USA) co-immunoprecipitation Kit 26149 following the manufacturer's protocol. Briefly, the monoclonal anti-6xHis-Tag antibody (Sigma-Aldrich) was first immobilized using AminoLink Plus coupling resin. The resin was then washed and incubated with individual purified conglutin β1, β2, β3, β4 and β6 recombinant protein and human recombinant insulin (Sigma) for 4h at 4°C. After incubation, the resin was washed and protein eluted using elution buffer. Negative controls were performed by immobilizing anti β-conglutin antibody (C1) or monoclonal anti-6xHis-Tag antibody (C2) to AminoLink Plus coupling resin, and using human recombinant insulin without adding any of the purified recombinant β-conglutins in the incubation, and further elution step.

Elution samples were analyzed by SDS-PAGE and stained with coomassie blue, as well as by Western blotting using rabbit monoclonal anti-insulin (Abcam, Cambridge UK), and a horseradish peroxidase-conjugated secondary goat-IgG anti rabbit antibody. Chemiluminiscent detection was carried out as described below (quantitative immunoblotting section). Results visualization and documentation were performed with a C-DiGit blot scanner (LI-COR, USA).

Participant' study

A total number of twenty seven healthy control subjects, and thirtyone diabetic patients were recruited for this study, and respective informed full consents were obtained from each participant. The subjects were unrelated and diagnosed at the coverage area of basic area “Pedro Martínez” (A.G.S. NorthEast Granada, Spain). Samples consisted of venous blood, which was collected from the cubital vein in 4-ml lithium-heparin tubes by well-trained authorized personal. All study procedures were performed in accordance with a protocol previously approved by the Ethics Committee of Basic Area “Pedro Martínez” (A.G.S. NorthEast Granada, Spain). All participant provided full written, and informed consents for the procedures.

All experiments were performed in agreement to “The Principles of Good Laboratory Practice”, developed in accordance with the OECD and adopted by the EU (Directive 2004/9/EC, and Directive 2004/10/EC).

All methods and experimental protocols included in the “Methods section” corresponding to the current study were approved by The Estación Experimental del Zaidín, Granada (Spain), the institution belonging to the Spanish National Research Council (CSIC), where all experimental procedures were performed. In addition, all methods and experimental protocols were also approved by the Research Ethics Committee of the Granada province, Andalusian Health System (Spain).

Whole blood Culture

Venous blood was drawn into lithium–heparin tubes (BD Vacutainer System, Heidelberg, Germany) in the morning. Participants were fasted for 12 hours before blood collection (Fasting consisted of no food or drink intake but water). Within 3 h, whole unseparated blood was diluted 1:3 with Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) and HEPES 4%; (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and agitated gently in 50-ml tubes (Greiner Bio-one, Solingen, Germany); 1ml aliquots were seeded per well of 24-well plates (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Germany) and cultured for 24 h at 37°C and a atmosphere of 5% CO₂. The whole blood assay procedure was established from pilot studies with blood from four healthy subjects. All parameters for each subject including blood withdrawal were measured in one assay on the same plates in order to ensure intra-individual cross-comparison of results. From each blood drawing, we performed triplicate incubations with negative controls, and the separate purified β -conglutinin (20 μ g/mL), or *E. coli* lipopolysaccharide (LPS, 5 μ g/ml) and each β -conglutinin protein in combination with LPS. Samples were incubated in triplicate with negative controls (PBS 25%; Sigma-Aldrich). The same lots of purified β -conglutinin (β 1, β 2, β 3, β 4, β 6 respectively), LPS and PBS were used for all experiments. Blood cultures were removed from each well to be centrifugate at 700xg for 5 min at 20°C, and supernatants were aliquoted and stored at -20°C until further analysis.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized blood by density-gradient centrifugation on Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO), washed three times in Hanks’ balanced salt solution (Life Technologies, Grand Island, NY), and resuspended in complete medium including RPMI 1640 (Sigma) supplemented with penicillin, streptomycin, and L-glutamine (100 U/ml, 100 μ g/ml, and 2 mM, respectively) (Sigma).

Relative mRNAs quantification of IRS, GLUT-4, iNOS and IL-1 β

Real time quantitative PCR technology was used to assay Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1), Glucose Transporter Type 4 (GLUT-4), Phosphoinositide 3-Kinase (PI 3-kinase), Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Interleukin 1 beta (IL-1 β) mRNAs expression on 25 samples from each experimental group.

Total messenger ribonucleic acid (mRNA) was isolated from culture supernatants by using the mRNeasy min kit (Qiagen, Netherlands) and Total mRNA was extracted from the cultured PBMCs with RNeasy mini kit 50 (Qiagen, Netherlands) according to the instructions of the manufacturer. First strand complementary DNA (cDNA) was synthesized using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). For gene expression assays, cDNA was amplified using 7500 Fast Real-Time polymerase chain reaction (PCR) System (Applied Biosystems). TaqMan primers and probes were derived from the commercially available TaqMan Gene Expression Assays (GenBank accession no: NM_005544.2, Assay ID: Hs00178563_m1; GenBank accession n°: NM_001042.2, Assay ID: Hs00168966_m1; GenBank accession n°: AF049656.1, Assay ID: Hs01075529_m1 and GenBank® accession no: NM_000576.2, Assay ID: Hs01555410_m1, Applied Biosystems respectively). Relative changes in gene expression levels were determined using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. The cycle number at which the transcripts were detectable (CT) was normalized to the cycle number of β -Actin (GenBank accession n°: NM_001101.3, Assay ID: Hs99999903_m1) detection, referred to as

Δ CT. PCR efficiency was determined by TaqMan analysis on a standard curve for targets and endogenous control amplifications, which were highly similar.

Quantitative immunoblotting

The analyses were performed on culture supernatants obtained from whole blood culture. Total protein concentration was determined for each sample with the Bradford assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as a standard. Aliquots corresponding to 20 μ g of total proteins were heated to 95°C for 5 min with an equivalent volume of sample buffer, containing 2% SDS and 5% mercaptoethanol, bromophenol blue and 20% glycerol, and loaded onto 10% and 12% polyacrylamide gels for protein separation. Proteins separated by SDS-PAGE were electrotransferred to PVDF membranes and probed with appropriate antibodies. Membranes were blocked for 1 h at 37°C in a blocking solution containing 3% BSA, 0.05% Tween-20, and PBS (pH 7.4) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies in the blocking solution. These primary antibodies consisted of anti- [IRS-1 (107-185 kDa), PI3-Kinase (p85) (85kDa), GLUT-4 (50-60kDa), Protein kinase B (AKT) (60kDa), respectively], which were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA.), and the antibody against iNOS (130 kDa) and IL-1 β (17kDa) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Membranes were rinsed three times with washing solution (0.05% Tween-20 in PBS) for 10 min each, followed by incubation for 1 h at room temperature in a 1:5000 dilution of goat anti-rabbit IgG-HRP, purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), with 3% BSA in PBS. The membranes were then washed three times for 10 min each in the same washing solution. Chemiluminiscent detection was carried out with the Immuno-Star™ Western™ Chemiluminescence Kit (Bio-Rad, cat# 170-5070) according to the manufacturer's instructions. Visualization and documentation of the results was performed with a C-DiGit blot scanner (LICOR, USA). Quantitative (densitometry) analysis of protein bands was performed using ImageJ v1.47 (Bio-Rad).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM of 6 patients for group. Two-tailed Student's t-test was used to compare between two groups. One-way ANOVA followed by Dunnett's test was used to compare among three or more study groups. $P < 0.05$ is regarded as statistically significant.

RESULTS

Purification of β -conglutin proteins and immune precipitation assay

The SDS-PAGE analyses indicated a single protein band of approximately 65 kDa (**Figure 1**). Recombinant β -conglutins-6xHis-Tagged were obtained at high purity level (>95%), and a concentration between 5-15 mg/mL (**Figure 1A**). Analysis by immunoblotting using anti- β -conglutin protein antibody produced in the current study confirmed the identity of the recombinant protein (**Figure 1B**).

We further investigated whether human recombinant insulin was able to interact with the β -conglutin proteins (β 1, β 2, β 3, β 4, or β 6) by immunoprecipitation experiments. Precipitated species were detected by coomassie staining (**Figure 2A**), and confirmation of the presence of insulin in the eluted samples was performed by immunoblotting using an anti-insulin antibody (Abcam, Cambridge UK) (**Figure 2B**). Insulin was found at relatively high quantity in the eluate samples when incubated with purified conglutin β 1, β 3, and β 6 (**Figure 2**), when compared to controls.

Participant information

The clinical parameters of the population studied are summarized in **Table 1**. Healthy control subjects and patients with T2D showed significant differences for age and body mass index (BMI), as expected. There were significant differences between study groups in the levels of

Fasting Glycaemia (P<0.001), Blood Pressure (P<0.03), Heart Rate (P<0.001) and HbA1c (P<0.001).

Challenging assays using PHA, LPS, PMA+IO exhibited comparable values

We investigated whether incubation with PHA, LPS, and PMA+IO, respectively, had potential effects on the release of cytokines from whole blood samples. Challenging with PHA, LPS, or PMA+IO induce a potent stimulus of spontaneous cytokine IL-1 β and iNOS production in whole blood cultures. The mean concentration values of IL-1 β in culture supernatants of healthy control subjects after 24 h after incubation with PHA, LPS, or PMA+IO are shown in Figure 3. We evaluated *ex vivo* IL-1 β production with these three stimuli. Due to that the patterns of production were similar in all subjects tested leading to similar concentrations of IL-1 β , a whole blood culture system with LPS appeared to be most suitable to assess in our study (see exemplary for IL-1 β , **Supporting information Figure S1**).

Differential expression of genes related to the insulin molecular signalling pathway

We assessed whether the effect of each purified β -conglutinin protein (β 1 to β 4, and β 6, respectively) on blood culture of T2D and controls (C) was related to the activation of the insulin signalling pathway. Expression levels of the IRS-1 (Insulin receptor substrate 1) gene were significantly lower in T2D patients [-75%, -75%, -81%, -91%, and -74% (**Figure 3A**)] when compared to C in all experimental groups. Interestingly, 24h after challenging using β 1, β 3 and β 6, mRNA levels of the IRS-1 gene in T2D patients experienced a significant increase [+244%, +347%, and +280% *versus* T2D patients (**Figure 3A**)]. No differences were observed using β 2 or β 4 conglutinin for challenge assays when compared to T2D (**Figure 3A**). After LPS challenge, we found significantly stimulated IRS-1 gene expression in T2D patients in all the experimental groups [+548%, +678%, +412%, +720%, and +710% *versus* T2D (**Figure 3A**)]. Challenge experiments using LPS+ β 2 and LPS+ β 4 enhanced mRNA expression of IRS-1 [+531%, and +620% *versus* T2D (**Figure 3A**)]. On the other hand, a significant reduction was found for challenges using LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 [+85%, +128%, and +146% *versus* T2D (**Figure 3A**)].

Interestingly, challenge assays using β 1, β 3, β 6, significantly stimulated the expression of the IRS-1 gene in C subjects [+111%, +238%, and +116% (**Figures 3B**)], and no significant differences were found in the expression levels of mRNA of the IRS-1 gene with β 2 and β 4 challenges *versus* C (**Figures 3B**). The mRNA expression levels of the IRS-1 gene were upregulated in LPS challenging assays [+497%, +333%, +601%, +636%, and +411%] in all experimental groups (**Figure 3B**). In addition, mRNA expression levels of the IRS-1 gene for challenges using LPS+ β 2 and LPS+ β 4 caused a significant induction [+326%, and +534% *versus* C (**Figure 3B**)] when compared to LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 [+63%, +20%, and +45%], in which mRNA levels also were partially increased when compared to control (**Figure 3B**).

Protein level of IRS-1 and p85 (Mitogen-activated protein kinase) in culture supernatants were significantly reduced in T2D (IRS-1: -55%, -74%, -67%, and -87%; and p85: -72%, -69%, -58%, -46%, and -70%) in comparison to C in all experimental groups (**Supporting Information Figures S2A and S3A**). Noteworthy, challenges using β 1, β 3 and β 6 showed that IRS-1 and p85 protein levels were significantly higher in plasma of diabetic patients [IRS-1: +187%, +299%, and +229%, respectively (**Supporting Information Figure S2A**); p85: +337%, +356%, and +417% (**Supporting Information Figure S3A**)] when compared to T2D. No significant changes were found with β 2 and β 4 when compared to T2D (**Supporting Information Figures S2A S3A**).

Furthermore, a significant increase in IRS-1 and p85 protein levels were found for all different experimental groups using LPS in T2D subjects [IRS-1: +498%, +427%, +366%, 364%, and +385% (**Supporting Information Figure S2A**) *versus* T2D; p85: +495%, +392%, +166%, +392%, and +334% (**Figure S2A**) *versus* T2D]. In addition, IRS-1 and p85 protein expression levels exhibited an increase in challenges using LPS+ β 2 and LPS+ β 4 [IRS-1: +517%, and

+412% (Figure S1A) *versus* T2D; p85: +412%, and +357% (**Supporting Information Figure S3A**) *versus* T2D] compared to LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 [IRS-1: +116%, +174%, and +187%; p85: +170%, +145%, and +105% *versus* T2D], in blood cultures of T2D subjects (**Supporting Information Figures S2A S3A**).

A statistically significant increase of plasma IRS-1 and p85 proteins was observed in challenge assays using LPS in controls for all experimental groups [IRS-1: +254%, +332%, +432%, +332%, and +443% *versus* C (**Supporting Information Figure S2B**); p85: +154%, +298%, +121%, +215%, and +254% *versus* C (**Supporting Information Figure S3B**)].

We also found an increase of IRS-1 and p85 proteins levels using β 1, β 3 and β 6 [IRS-1: +345%, +467%, and +413% (**Supporting Information Figure S2B**); and p85: +275%, +276%, and +312% (**Supporting Information Figure S3B**)] when compared to controls. No differences were found in the protein expression levels of IRS-1 and p85 when challenges were performed using β 2 and β 4 in control subjects (**Supporting Information Figures S2B and S3B**).

Beta conglutin challenges result in a differential expression of genes related to glucose transport pathway

We also examined whether challenges with particular β conglutinins proteins would trigger the activation of the glucose transport pathway, by quantification of the expression levels of GLUT-4 (Glucose transporter type 4) gene. T2D exhibited a significant reduction in the mRNA levels of GLUT-4 [-69%, -65%, -79%, -33%, and -80% (**Figure 3C**)] *versus* samples from healthy control subjects. The reduced expression of GLUT-4 in the T2D group was clearly restored under β 1, β 3 and β 6 challenges as illustrated in **Figure 3C** [+428%, +430%, and +230% *versus* C]. β 2 or β 4 caused no changes in the levels of mRNA of GLUT-4 when compared to T2D (**Figure 3C**). Stimulation with LPS exerted a significant increase in the expression of GLUT-4 in all the experimental groups [+428%, +182%, +428%, +430%, and +230% (**Figures 3C**)].

Furthermore, GLUT-4 mRNA expression levels were increased after using LPS+ β 2 and LPS+ β 4 in challenge assays [+243%, and +648% (**Figure 3C**)]. No significant changes were noticed using LPS+ β 1, LPS+ β 3 or LPS+ β 6 [+135%, +143%, and +101% *versus* T2D (**Figure 3C**)]. However, LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 showed recovery values of GLUT-4 mRNA expression levels when compared to LPS+ β 2 and LPS+ β 4 in challenge assays.

Protein expression levels of GLUT-4 and the insulin-dependent kinase AKT protein were decreased in T2D *versus* C group [GLUT-4: -77%, -57%, -88%, and -87% (**Supporting Information Figure S4A**); AKT: -82%, -75%, -73%, -63%, and -67% (**Supporting Information Figure S5A**)]. Interestingly, this effect was reversed using β 1, β 3 and β 6 in the challenge assays [GLUT-4: +342%, +386%, and +318% (**Supporting Information Figure S4A**) *versus* T2D; AKT: +396%, +385%, and +103% (**Supporting Information Figure S5A**) *versus* T2D]. No significant effect was found with β 2 or β 4 conglutinins when compared to C.

In addition, **Supporting Information Figures S4A and S5A** also showed a significant enhancement of GLUT-4 and AKT in LPS challenges for all the experimental groups [GLUT-4: +500%, +380%, +364%, +298%, and +341% *versus* T2D; AKT: +420%, +320%, +440%, +450%, and +445% *versus* T2D]. However, T2D group showed higher levels of GLUT-4 and AKT protein expression in challenges with LPS+ β 2 [+400%, and +394% *versus* T2D (**Supporting Information Figure S4A**)], and LPS+ β 4 [+264%, and +320% *versus* T2D (**Supporting Information Figure S5A**)] compared to LPS+ β 1, LPS+ β 3, and LPS+ β 6 [GLUT-4: +175%, +175%, and +173% (**Supporting Information Figure S4A**)]; IRS-1: +103%, +100%, and +83% (**Supporting Information Figure S5A**)]. In addition, challenge using LPS promoted significant increases in protein levels for GLUT-4 and AKT in control subjects [GLUT-4: +332%, +323%, +312%, +225%, and +276% (**Supporting Information Figure S4B**); AKT: +165%, +154%, +184%, +112%, and +121% (**Supporting Information Figure S5B**)], as well as in LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges [+174%, and +176% (**Supporting Information Figure S4B**) *versus* C; +134%, and +144% (**Supporting Information Figure S5B**) *versus* C]. A more moderate increase was found for challenges using LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6

[+54%, +54%, and +38% (**Supporting Information Figure S4B**); +65%, +75%, and +46% (**Supporting Information Figure S5B**)]. Blood culture of control subjects challenged with β 1, β 3 and β 6 significantly increased protein levels of GLUT-4 and AKT [GLUT: +365%, +326%, and +323% (**Supporting Information Figure S4B**) versus C; AKT: +294%, +299%, and +298% (**Supporting Information Figure S5B**) versus C]. No changes were found when using β 2 and β 4 in challenge assays.

Variation in genes expression related to the insulin pathway in PBMCs isolated from blood of T2D subjects

IRS-1 and GLUT-4 were significantly reduced in T2D subjects when compared to control [IRS-1: -85%, -90% -77%, -69%, and -69% (**Figure 5A**); GLUT-4: -75%, -80% -67%, -99%, and -89% (**Figure 5C**)].

Therefore, challenge assays using β 1, β 3 and β 6 raised the levels of IRS-1 and GLUT-4 mRNA in PBMC of T2D subjects [IRS-1: +230%, +210%, and +238% (**Figure 5A**); GLUT-4: +301%, +298%, and +259% (**Figure 5C**)].

Beta conglutins affect the expression levels of inflammation related genes important in T2D subjects

T2D is characterized by impaired insulin secretion and/or insulin sensitivity [22], and sustained by chronic subclinical inflammation. In order to investigate the possible potential antiinflammatory effects of purified β -conglutinin proteins, we assessed the expression levels of iNOS (Inducible nitric oxide synthase) and the pro-inflammatory cytokine IL-1 β (Interleukin 1 beta).

iNOS mRNA and protein levels were substantially increased in T2D in all experimental groups when compared to control [+642%, +603%, +735% +779%, and +855% (**Figure 4A**)]. β 1, β 3 and β 6 significantly suppressed iNOS mRNA expression and protein levels in T2D [-610%, -735%, -713% (**Figure 4A**) *versus* T2D]. In contrast, iNOS mRNA and protein levels remained significantly high [+284%, and +130% (**Supporting Information Figure S6A**) *versus* T2D] when β 2 and β 4 were used in challenge assays. We also found iNOS mRNA and protein levels significantly increased in LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges [+230%, and +260 (Figure 4A) *versus* T2D; +87%, and +15% (**Supporting Information Figure S6A**) *versus* T2D], while LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 challenges resulted in a substantial reduction in the mRNA and proteins levels [-512%, -625%, and -641% (**Figure 4A**) *versus* C; -510%, -548%, and -409% (**Supporting Information Figure S6A**) *versus* C] when compared with LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges.

β 1, β 3, β 6 did not alter mRNA and protein expression levels of iNOS in control subjects (**Figure 4C**). However, mRNA and protein levels of iNOS were significantly increased using β 2 [+734%, and +265% (**Figure 4C**) *versus* C], and β 4 [+938%, and +206% (**Figure 4C**) *versus* C].

In this regard, gene expression and protein levels of IL-1 β showed a similar pattern to iNOS (**Figure 4C, 4D**; and **Supporting Information Figures S7A and S7B**).

Figure 4B shows a significant increase of mRNA expression and protein levels of IL-1 β in T2D subjects in all the experimental groups [+642%,+603%, +735% +776%, and +755% (**Figure 4B**); and +338%,+245%, +237% +227%, and +320% (**Supporting Information Figure S7A**)]. Interestingly, this effect was reduced after 24h of incubation with β 1, β 3 and β 6 [-610%, -735%, and -713% (**Figures 4B**) *versus* T2D; -310%, -202%, and -67% (**Supporting Information Figure S7A**) *versus* T2D]. In addition, the mRNA expression level and protein quantity of IL-1 β were significantly induced in LPS challenge assays in all experimental groups [+1252%, +1174%, +1134%, +1222%, and +1134% (**Figure 4D**) *versus* C], and [+238%, +245%, +367%, +387%, and +390% (**Supporting Information Figure S7B**) *versus* C]. LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges significantly increased the IL-1 β levels of both, mRNA and protein [+817% and +554%, respectively *versus* C (**Figure 4D**); +265% and +376 (**Supporting Information Figure S7B**) *versus* C]. No differences in IL-1 β cytokine levels were found when challenges were performed with LPS+ β 2 and LPS+ β 4 in comparison to the LPS group or the T2D group.

Nevertheless, a moderate induction was found after LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 challenge assays when compared to LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges in the T2D subject groups.

Inflammation related genes response in PBMCs of T2D patients

Levels of iNOS and proinflammatory cytokine IL-1 β mRNA were significantly higher in PBMC isolated from T2D [iNOS: +389%, +567%, +428%, +711%, and +698% (**Figure 5B**); IL-1 β : +438%, +693%, +740% +850%, and +439% (**Figure 5D**)] when compared to C. This induction was notably suppressed after 24h of challenge with β 1, β 3 and β 6 [-391%, -390%, and -377% (**Figures 5B**); and -475%, -480%, and -467% (**Figures 5D**)], whereas levels of iNOS and proinflammatory mediator IL-1 β remained significantly high after β 2 and β 4 challenges in PBMC from T2D subjects (**Figure 5B and 5D**).

Beta conglutin pool affects the expression levels of insulin pathway and inflammation related genes in PBMCs of T2D patients

In order to prove the effects of all purified β -conglutins proteins in our study, challenging assays were performed using all individual β -conglutin isoform proteins together (β 1 + β 3 + β 6 + β 2 + β 4) in T2D patients and measured variations of IRS-1, GLUT-4, iNOS and IL-1 β levels through qRT-PCR. IRS-1 and GLUT-4 were significantly reduced in T2D patients when compared to C [-71% (**Supporting Information Figure 8A**); and -82% (**Supporting Information Figure 8B**), respectively]. Furthermore, challenging assays using β -conglutin pool caused the activation of mRNA synthesis levels of IRS-1 and GLUT-4 in stimulated PBMC of T2D [+398%, (**Supporting Information Figure 8A**); and +438 (**Supporting Information Figure 8B**), respectively].

iNOS and IL-1 β mRNA levels were significantly high in PBMC from T2D [+689% (**Supporting Information Figure 8C**); and +711% (**Supporting Information Figure 8D**), respectively] when compared to C. Interestingly, challenge using β -conglutin pool suppressed the induction levels of iNOS and proinflammatory mediator IL-1 β in T2D patients [-748% (**Supporting Information Figure 8C**); and -739% (**Supporting Information Figure 8D**), respectively].

DISCUSSION

Finding an effective and natural alternative anti-diabetic agent would be of enormous interest and importance for the prevention, and treatment of type 2 diabetes world-wide [23].

Various bioactive (nutraceutical) properties of *L. albus* or white lupin seed compounds have been reported such lowering plasma cholesterol, and triacylglycerol concentrations in hypercholesterolemic animal models [24].

Post-prandial experiments have shown that healthy subjects that have consumed bread added with lupin flour [25; 26] or kernel fibre [27], had decreased levels of glucose, insulin, and satiety responses compared with those control subjects consuming regular white bread. Therefore, when lupin was compared to soy, post-prandial glycaemic lowering response for bread consumption was more efficient for lupin than soy in diabetic subject [28]. In addition, a basic globulin protein (gamma conglutin family) isolated from *L. albus* seeds have shown that it reduces the plasma glucose levels in rats in a dose dependent manner [29], as well as glucose and insulin blood in rats treated with a hyperglycaemic diet [30].

In the present study, we have investigated the role of the *lupinus angustifolius* major seed protein, β -conglutin/vicilin proteins family, as a diabetes treatment. We have evaluated through challenge assays whether purified β -conglutin proteins of NLL are able to activate the intrinsic tyrosine kinases, triggering cell-signalling responses, commonly shared among the insulin signalling molecular cascade, i.e. IRS-1 pathway. Tyrosine phosphorylation of the IRS-1 protein allows its functional interaction with the regulatory subunit of PI3-K protein. This in turn activates PI3-K to a functional protein, necessary for insulin signalling for glucose transport [31].

Outcomes showed that whole blood culture challenges using purified β 1, β 3 and β 6 promote the

activation of the intracellular IRS-1/PI3-kinase pathway eventually involved in glucose homeostasis and protein synthesis stimulation in T2D patients in comparison to control T2D subjects. Moreover, purified β 1, β 3 and β 6 proteins were able to stimulate IRS-1 (**Figures 3 and Supporting Information Figure S2**) and P85 (**Supporting Information Figure S3**) increasing their protein levels in control (healthy) subjects.

The mechanism by which activation of PI3-K through tyr-residue phosphorylation [31, 32] induces GLUT-4 translocation and increases glucose uptake by the cells has not been defined. A downstream effector of PI3-K protein (serine-threonine kinase - AKT) may also play a fundamental role in insulin's effects and glucose transport [33]; however the role of this kinase in glucose transport is controversial [34]. In this regard, 24h of challenge assays using β 1, β 3 and β 6 resulted in the up-regulation of mRNA and an increase in protein levels of GLUT-4 and AKT in plasma of T2D subjects. In contrast, GLUT-4 and AKT remained unaltered when β 2 or β 4 were used in the challenge assays. Since recombinant human insulin has been shown in the current study to have a preference for binding to β 1, β 3, and β 6, these proteins may be involved somehow in the variations of mRNA and protein levels of some of the above markers of the insulin pathway.

Taking all these results into consideration, and to the best of our knowledge, we propose for the first time that β 1, β 3 and β 6 proteins have the ability to regulate the level of mRNA and protein synthesis of crucial genes involved in the insulin molecular signalling pathway, thereby modulating the activation and response of these regulatory genes leading to variation in insulin-mediated, plasma glucose levels.

The administration of LPS has been previously applied as an experimental model to mimic some of the clinical findings of human T2D [35]. The kind of vicious stimulus, at the same time, leads to severe metabolic disorder [36]. Thus, endotoxemia would induce acute insulin resistance and adipose inflammation, characteristic of that observed chronically in metabolic syndrome and diabetes.

LPS triggers inflammation, which is associated with marked changes in glucose metabolism; thus, LPS-induced glucose metabolism disorder is recently getting more attention as a prominent pathological problem [37]. Indeed, LPS challenge assays performed in the current study resulted in a significant activation of protein levels and gene transcriptional expression of kinases, IRS-1 and GLUT-4 in all different experimental groups. Mediators of the inflammatory response have been shown to impair insulin signalling to muscles and blood flow [38]. However, little work has been done in order to examine functional interaction among these particular factors. Fan et al. [36] found that LPS leads to whole body insulin resistance in rats and impaired insulin signalling. A recent *in vivo* study using a hyperinsulinemic-euglycemic clamp in mice was unable to detect impairment in insulin action following an LPS injection [39]. Therefore, it is unclear how much of the impairments are signalling mediated.

While a number of factors can contribute to inhibition of insulin-stimulated glucose uptake by cells in the presence of an LPS challenge, there is scarce information about the relationship between the LPS induced inflammatory response, insulin signalling, and decreased muscle glucose delivery [40].

Importantly, when LPS and purified β -conglutin proteins were jointly added to the challenge assays, we found that LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 significantly reduced the level of intracellular mRNA for these genes belonging to the intracellular insulin signalling molecular pathway, in comparison to LPS challenge in T2D and in control (healthy) subjects; conversely no effects were found in challenge assays using LPS+ β 2 and LPS+ β 4, results that might be associated with the antioxidant properties and anti-inflammatory effects of β 1, β 3 and β 6. To the best of our knowledge, this is the first time on the ability of specific NLL β -conglutin proteins to modulate the chronic subclinical inflammation caused by T2D.

At present, T2D is associated with oxidative stress and chronic inflammation by increasing the formation of reactive oxygen species and causing reduction in the antioxidant levels [41].

Therefore, inhibitors of the pro-inflammatory cytokines have been considered as candidates for anti-inflammatory drugs [42]. This type of activation is associated with an elevated production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), IL-6, and IL-1, ROS and nitrogen intermediates such as the inducible isoform of nitric oxide iNOS [43].

The increase in the incidence of inflammation related disorders has led to the search for active biopeptides derived from plant proteins with anti-inflammatory properties [1]. In the present study we investigated the potential anti-inflammatory activity of five purified NLL β -conglutin proteins. We observed a markedly pronounced activation of iNOS, an IL-1 β , in culture supernatants of T2D patients. Notably, IL-1 β and iNOS showed a significant inhibition after 24 h of incubation with either β 1, β 3 or β 6 conglutin proteins in T2D patients. Gene expression of IL-1 β and iNOS showed a similar pattern in PBMC in accordance to the results observed in blood culture supernatants of T2D patients.

Therefore, we analysed the effects of each purified β -conglutin protein in plasma, with the presence of stimuli of the innate immune system, (endotoxin LPS). In our study, LPS represents a strong immunostimulatory signal that induces a systemic inflammatory response with increases in proinflammatory cytokines such as IL-1 β and iNOS in all experimental groups (T2D and control) [44]. In parallel experiments, we also found that LPS+ β 1, LPS+ β 3 and LPS+ β 6 challenge assays strongly reduced the mRNA expression of IL-1 β when compared to LPS alone in T2D subjects. On the other hand, no significant differences were observed between LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges when compared to LPS. Previous studies using dietary proteins from animal and plant sources have demonstrated specific effects going beyond merely nutrient supply [1]. However, our results indicate for the first time that β 1, β 3 and β 6 trigger the release of pro-inflammatory capacity of cells by diminishing IL-1 β and iNOS mRNA expression and protein levels, leading to amelioration of the inflammatory process associated with T2D in whole blood cultures.

Most importantly, our study provides novel and interesting information, particularly on how β 1, β 3 and β 6 proteins from NLL have a completely different phenotype at the gene expression level of T2D patients in comparison to β 2 and β 4, through their ability to modulate the intracellular IRS-1/PI3-Kinase/AKT7-GLUT-4 signalling pathway, that are eventually involved in protein synthesis stimulation, as well as their antioxidant and anti-inflammatory nature.

An initial study has showed the structural differences of the seven β -conglutin proteins modelled structures [45], where the sequences identity ranged from 73-99% (**Supporting information Figure S9**). This relatively high level of protein sequence polymorphism might be reflected in functional differences at the physiological level in plant developmental processes [46, 46], but also differential roles as potential bioactive peptides [48]. Thus, we can not rule out that β -conglutin proteins sequence variability may be, at least partially, responsible of differential activities concerning genes transcriptional and proteins translational estimulatory effects in the insulin signalling pathway.

In conclusion, and to the best of our knowledge, this is the first report using this experimental *ex-vivo* system to challenge human blood samples of T2D and C patients with purified NLL conglutin proteins, and in combination with LPS. β 1, β 3, and β 6 triggered increasing expression levels of IRS-1, p85, AKT and GLUT-4 genes in T2D and C subjects, and attenuated expression levels of IL-1 β and iNOS, with potential amelioration of the inflammatory state caused by T2D. Furthermore, this study showed for the first time the interaction of recombinant human insulin with various NLL β -conglutin proteins, particularly with β 1, β 3 and β 6, which might be a possible mechanism to alter the expression levels of genes in the insulin pathway.

These results highlight the potential use of β 1-, β 3-, β 6-conglutin proteins as food ingredients and as alternative approaches for T2D prevention, management and/or treatment. Chronic inflammation is a hallmark of several pathologies, such as Type 2 Diabetes rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, atherosclerosis and cancer. Our work and its future applications can help to develop novel as well as culturally relevant plant-based therapeutic approaches

against inflammation attenuation, and at the same time can serve as quality control tools to foster reliable and effective plant-based treatments. Moreover, this methodological approach offers an interesting opportunity to identify potential new bioactive plant peptides and metabolites with anti-diabetic activity, and opens the gate for possible plant-based therapeutic approaches to prevent inflammatory disorders, since the potential role of NLL β 1, β 3 and β 6 having antioxidant and potential anti-inflammatory effects.

Finally, implementation of breeding programs using this experimental knowledge as molecular tools would be helpful in terms of NLL seeds uses in food-derived products with positive human health benefits by producing lupin plants with increased expression and storage of particular β -conglutin isoforms with known effects in T2D and related-inflammatory diseases.

REFERENCES

- [1] Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008, 47, 171–182.
- [2] Arnoldi, A. Nutraceutical properties of white and narrow-leaved lupin. Lupins for health and wealth Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia, 14-18 September 452-454 (2008).
- [3] Henning, S.M., Zhang, Y., Rontoyanni, V.G., Huang, J., Lee, R.-P., Trang, A., et al. Variability in the Antioxidant Activity of Dietary Supplements from Pomegranate, Milk Thistle, Green Tea, Grape Seed, Goji, and Acai: Effects of in Vitro Digestion. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 4313–4321.
- [4] Duranti, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 2006, 77, 67–82.
- [5] Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., Petroni, K. Plants, diet, and health. *Annu Rev Plant Biol.* 2013, 64, 19-46.
- [6] Lee, Y.P., Mori, T.A., Sipsas, S., Barden, A., Puddey, I.B., et al. Lupin-enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84, 975-980.
- [7] Arnoldi, A., Zanoni, C., Lammi, C., Boschini, G. The role of grain legumes in the prevention of hypercholesterolemia and hypertension. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2015, 34, 144–168.
- [8] Lucas, M.M., Stoddard, F.L., Annicchiarico, P., Frías, J., Martínez-Villaluenga, C., et al. The future of lupin as a protein crop in Europe. *Front. Plant Sci.* 2015, 6, 705.
- [9] Yeheyis, L., Kijora, C., Van Santen, E., Wink, M., Danier, J., Peters, K.J. Crude protein, amino acid and alkaloid contents of annual sweet lupin (*Lupinus spp.*) forages and seeds grown in ethiopia. *Expl. Agric.* 2012, 48(3), 414–427.
- [10] Villarinoa, C.B.J., Jayasena, V., Cooreya, R., Chakrabarti-Bellc, S., Foley, R., et al. The effects of lupin (*Lupinus angustifolius*) addition to wheat bread on its nutritional, phytochemical and bioactive composition and protein quality. *Food Res. Int.* 2015, 76(1), 58–65.
- [11] Kouris-Blazos, A., Belski, R. Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2016, 25(1), 1-17.
- [12]. Belski, R., Mori, T.A., Puddey, I.B., Sipsas, S., Woodman, R.J., et al. Effects of lupin-enriched foods on body composition and cardiovascular disease risk factors: a 12-month randomized controlled weight loss trial. *Int. J. Obes.* 2010, 35, 810-819.
- [13] Dove, E.R., Mori, T.A., Chew, G.T., Barden, A.E., Woodman, R.J. et al. Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.* 2011, 106(7), 1045-1051.
- [14] Foley, R. C., Gao, L. L., Spriggs, A., Soo, L. Y., Goggin, et al. Identification and characterisation of seed storage protein transcripts from *Lupinus angustifolius*. *BMC Plant Biol.* 2011, 11, 59.
- [15] Foley, R. C., Jimenez-Lopez, J. C., Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Melsner, S., Singh, K. B. Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. *BMC Plant Biol.* 2015, 15, 106.
- [16] Dunwell, J.M. Cupins: a new superfamily of functionally-diverse proteins that include germins and plant seed storage proteins. *Biotechnology Genet. Engineering Rev.* 1998, 15, 1–32.

- [17] Monteiro, S., Freitas, R., Rajasekhar, B.T., Teixeira, A.R., Ferreira, R.B. The Unique Biosynthetic Route from Lupinus β -Conglutin Gene to Blad. *PLoS ONE* 2010, 5(1), e8542.
- [18] Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., Scarafoni, A. The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends Food Sci. Tech.* 2008, 19(12), 624-633.
- [19] Arnoldi A. Nutraceutical properties of white and narrow-leaved lupin. Lupins for health and wealth Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia, 2008, 452-454.
- [20] Diabetes. Fact sheet, World Health Organization (WHO), 2016 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>)
- [21] Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005, 41, 207-234.
- [22] Rains, J.L., Jain, S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 50, 567-575
- [23] Patel, D.K., Prasad, S.K., Kumar, R., Hemalatha, S. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2012, 2(4), 320-330.
- [24] Marchesi, M., Parolini, C., Diani, E., Rigamonti, E. Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in a rabbit model. *Br. J. Nutr.* 2008, 100, 707-710.
- [25] Hall, R.S., Thomas, S.J. and Johnson, S.K. Australian sweet lupin flour addition reduced the glycaemic index of a white bread breakfast without affecting palatability in healthy human volunteers. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2005, 14, 91-97.
- [26] Keogh, J., Atkinson, F., Eisenhauer, B., Inamdar, A., Brand-Miller, J. (2011). Food intake, postprandial glucose, insulin and subjective satiety responses to three different bread-based test meals. *Appetite* 2011, 57, 707-710
- [27] Lee, Y.P., Mori, T.A., Sipsas, S., Barden, A., Puddey, I.B., Burke, V., Hall, R.S. and Hodgson, J.M. Lupin-enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84, 975-980.
- [28] Dove, E.R., Mori, T.A., Chew, G.T., Barden, A.E., Woodman, R.J., et al. Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *Br. J. Nutr.* 2011, 106(7), 1045-1051.
- [29] Magni, C., Sessa, F., Accardo, E., Vanoni, M., Morazzoni, P., et al. Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *J. Nutritional Biochem.* 2004, 15(11), 646-650.
- [30] Lovati, M.R., Manzoni, C., Castiglioni, S., Parolari, A., Magni, C., Duranti, M. Lupin seed γ -conglutin lowers blood glucose in hyperglycaemic rats and increases glucose consumption of HepG2 cells. *Br. J. Nutr.* 2012, 107(1), 67-73.
- [31] Fröjdö, S., Vidal, H., Pirola, L. Alterations of insulin signalling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 1792(2), 83-92.
- [32] Terruzzi, I., Senesi, P., Magni, C., Montesano, A., Scarafoni, A., et al. Insulin-mimetic action of conglutin- γ , a lupin seed protein, in mouse myoblasts. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2011, 21, 197-205.
- [33] Capraro, J., Magni, C., Scarafoni, A., Duranti, M. Susceptibility of lupin γ -conglutin, the plasma glucose-lowering protein of lupin seeds, to proteolytic enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 8612-8616.
- [34] Capraro, J., Clemente, A., Rubio, L.A., Magnia, C., Scarafonia, A., et al. Assessment of the lupin seed glucose-lowering protein intestinal absorption by using *in vitro* and *ex vivo* models. *Food Chem.* 2011, 125, 1279-1283.
- [35] Saia, R.S., Bertozzi, G., Mestriner, F.L., Antunes-Rodrigues, J., Queiróz Cunha, F., et al. Cardiovascular and inflammatory response to cholecystinin during endotoxemic shock. *Shock* 2013, 39, 104-113.
- [36] Wasserman, D.H., Kang, L., Ayala, J.E., Fueger, P.T., Lee-Young, R.S. The physiological regulation of glucose flux into muscle *in vivo*. *J. Exp. Biol.* 2011, 214: 254-262.

- [37] Fan, J., Li, Y.H., Wojnar, M.M., Lang, C.H. Endotoxin-induced alterations in insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor, IRS-1, and MAP kinase in skeletal muscle. *Shock* 1996, 6, 164–170.
- [38] Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., Cabling, D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* 2000, 345, 437–443.
- [39] Kimberly, X., Morris, R.T., Otero, Y.F., Wasserman, D.H., McGuinness, O.P. Disassociation of Muscle Insulin Signaling and Insulin-Stimulated Glucose Uptake during Endotoxemia. *PLoS One* 2012, 7, e30160.
- [40] Bedard, S., Marcotte, B., Marette, A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 1997, 325, 487–493.
- [41] Donath, M. Y., Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev.* 2011, 11, 98–107.
- [42] Evans, J.L. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance?. *Ind. J. Med. Res.* 2007, 125, 355-372.
- [43] Calder, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 83, 1505S–1519S.
- [44] Olefsky, J.M., Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Ann. Rev. Physiol.* 2010, 72, 219–246.
- [45] Jimenez-Lopez, J.C., Lima-Cabello, E., Melsner, S., Foley, R.C., Singh, K.B., et al. Lupin allergy: uncovering structural features and epitopes of β -conglutin proteins in *Lupinus angustifolius* L. with a focus on cross-allergenic reactivity to peanut and other legumes. *Lect. Notes Comput. Sci.* 2015, 9043, 96-107.
- [46] Jimenez-Lopez, J. C., Zienkiewicz, A., Zienkiewicz, K., Alche, J. D., Rodríguez-García, M. I. Biogenesis of protein bodies during legumin accumulation in *Olea europaea* L. seed development and differentiation. *Protoplasma* 2016, 253, 517-530.
- [47] Zienkiewicz, A., Jimenez-Lopez, J. C., Zienkiewicz, K., Alché, J. D., Rodríguez-García, M. I. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) in vitro seed germination and seedling growth. *Protoplasma* 2011, 248, 751-765.
- [48] Elliott, A.G., Delay, C., Liu, H., Phua, Z., Rosengren, K.J., et al. Evolutionary Origins of a Bioactive Peptide Buried within Preproalbumin. *Plant Cell* 2014, 26, 981–995.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been funded by the European Research Program MARIE CURIE (FP7-PEOPLE-2011-IOF), under the grant ref. number PEOF-GA-2011-301550 to JCJ-L, KBS and JDA; JCJ-L thanks to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for the grant ref. number RYC-2014-16536 (Ramon y Cajal Research Program).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JCJ-L and EL-C conceived and designed the study. JCJ-L and EL-C performed the study. JCJ-L, EL-C, GM, KBS, RCF, SA, and JDA, analyzed, discussed, and assessed the resulting data. JCJ-L, JDA, KBS, and VA contributed reagents/materials/analysis tools. JCJ-L, EL-C, GM, KBS, RCF, SA and JDA wrote the paper. All authors have read the final manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors have declared that no competing interests exist.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Purification of conglutin β 1, β 2, β 3, β 4, and β 6.

(a) The Coomassie-stained shows the 5 purified β -conglutin proteins. (b) Immunoblotting shows the 5 purified β -conglutin proteins identified by the anti- β -conglutin antibody. MW =

molecular weight standard, kDa.

Figure 2. Insulin preferentially interacts with conglutin β 1, β 3, and β 6.

The Coomassie-stained SDS-PAGE (a) shows the eluate fractions. Insulin was mainly found in samples corresponding to β 1, β 3, and β 6 incubations. Negative controls (lane 2: anti- β -conglutin + insulin, and absence of any purified β -conglutin; and lane 3: anti His-Tag + insulin and absence of any purified β -conglutin) showed no presence of insulin in these assays. Immunoblotting showed the presence of insulin mayoritaritly in β 1, β 3, and β 6 lanes (b).

Figure 3. mRNA levels of IRS-1 and GLUT-4 gene in culture supernatants of Type 2 Diabetic and healthy control groups.

Whole blood cells were incubated for 24h in the presence of LPS, LPS + β 1, β 3, β 6, β 2, β 4, individually, or β 1, β 3 β 6, β 2, β 4 alone. Bar graph shows IRS-1 and GLUT-4 culture supernadants from T2D (a, c), and C (b, d).

$p^* < 0.05$ T2D versus C; $p^{**} < 0.05$ LPS + β -conglutin versus T2D; $p^{***} < 0.05$ β -conglutin versus T2D; $p \# < 0.05$ LPS versus T2D.

Figure 4. mRNA levels of the iNOS and IL-1 β genes in culture supernatants of Type 2 Diabetic and healthy control groups.

Whole blood cells were incubated for 24h in the presence of LPS, LPS + β 1, β 3 β 6, β 2, β 4, individually, or β 1, β 3, β 6, β 2, β 4 alone. Bar graph shows iNOS and IL-1 β culture supernatants from T2D (a, c) and C (b, d) groups.

$p^* < 0.05$ T2D versus C; $p^{**} < 0.05$ LPS + β -conglutin versus T2D; $p^{***} < 0.05$ β -conglutin versus T2D; $p \# < 0.05$ LPS versus T2D.

Figure 5. mRNA levels of IRS-1, GLUT-4, iNOS, and IL-1 β in peripheral mononuclear cell culture of Type 2 Diabetic and healthy control groups.

Whole blood cells were incubated for 24h with each individual purified β -conglutin protein (β 1, β 3, β 6, β 2, β 4, respectively). Bar graph shows IRS-1 (a), GLUT-4 (c), iNOS (b), and IL-1 β (d) mRNA levels of PBMCs from T2D and control groups.

$p \# < 0.05$ β -conglutin versus C; $p^* < 0.05$ T2D versus C; $p^{**} < 0.05$ β -conglutin versus T2D.

Table 1. Characteristics of the study groups.

Values represent the median (25th percentile, 75th percentile); to detect differences between groups we used analysis of variance (ANOVA). Significant P-values (<0.01) are highlited with an asterisk. **BMI**: Body-mass Index; **HbA1c**: Glycosylated haemoglobin 1c; **BPM**: beats per minute; **T2D**: Type 2 Diabetes.

	Healthy Control Subjects	Type 2 Diabetes	P-value
Male	27	31	
Age	50 (40,53)	48 (45,58)	0.007*
Fasting Glycaemia (mg/dL)	83 (80, 91)	165 (132, 198)	<0.001*
Blood Preasure (mmHg)	12/7 (11/7, 12/7)	15/8 (14/8, 15/7)	<0.001*
BMI (kg/m²)	24.8 (23, 26.6)	33.3 (27.5, 46.7)	<0.001*
Heart Rate (bpm)	64 (65, 76)	84 (96, 80)	<0.001*
HbA1c %	5.5 (5.4, 5.7)	6.7 (6.0, 7.4)	<0.001*

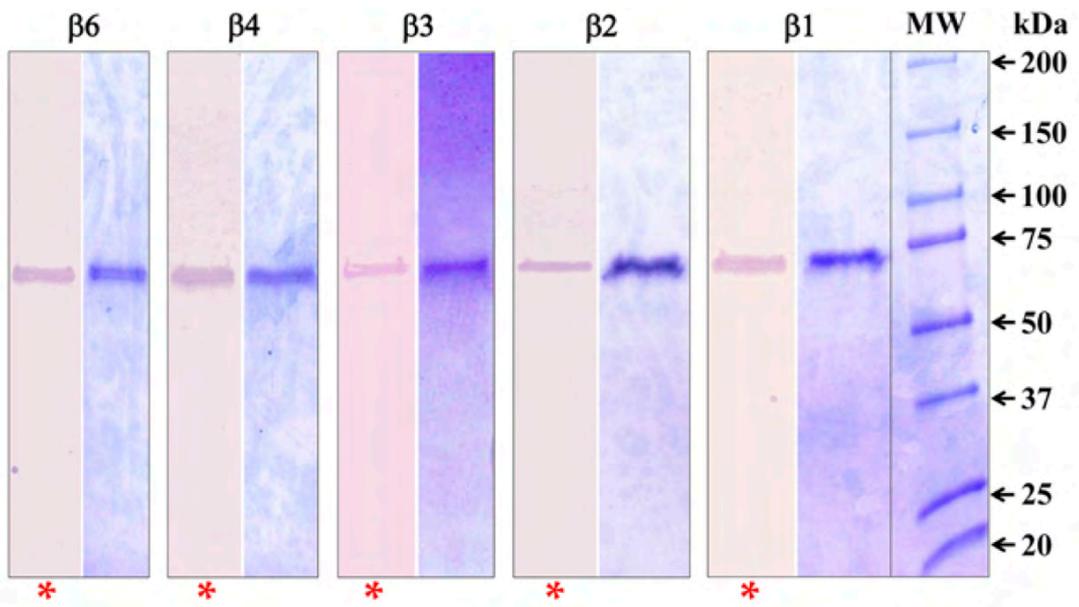


Figure 1.

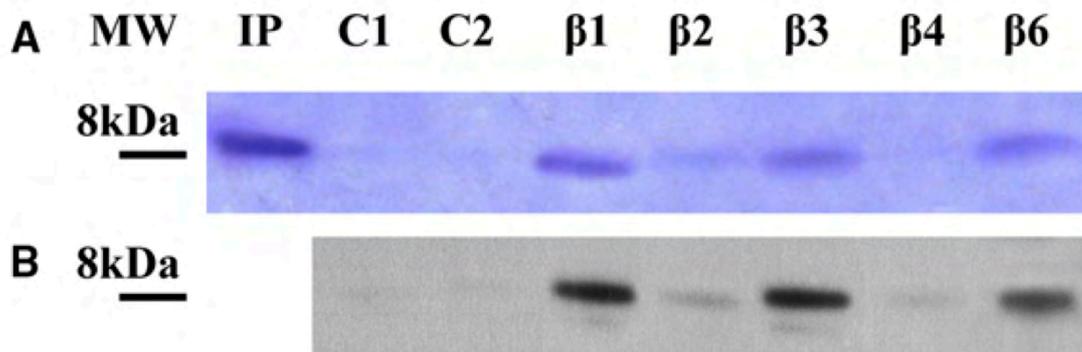


Figure 2.

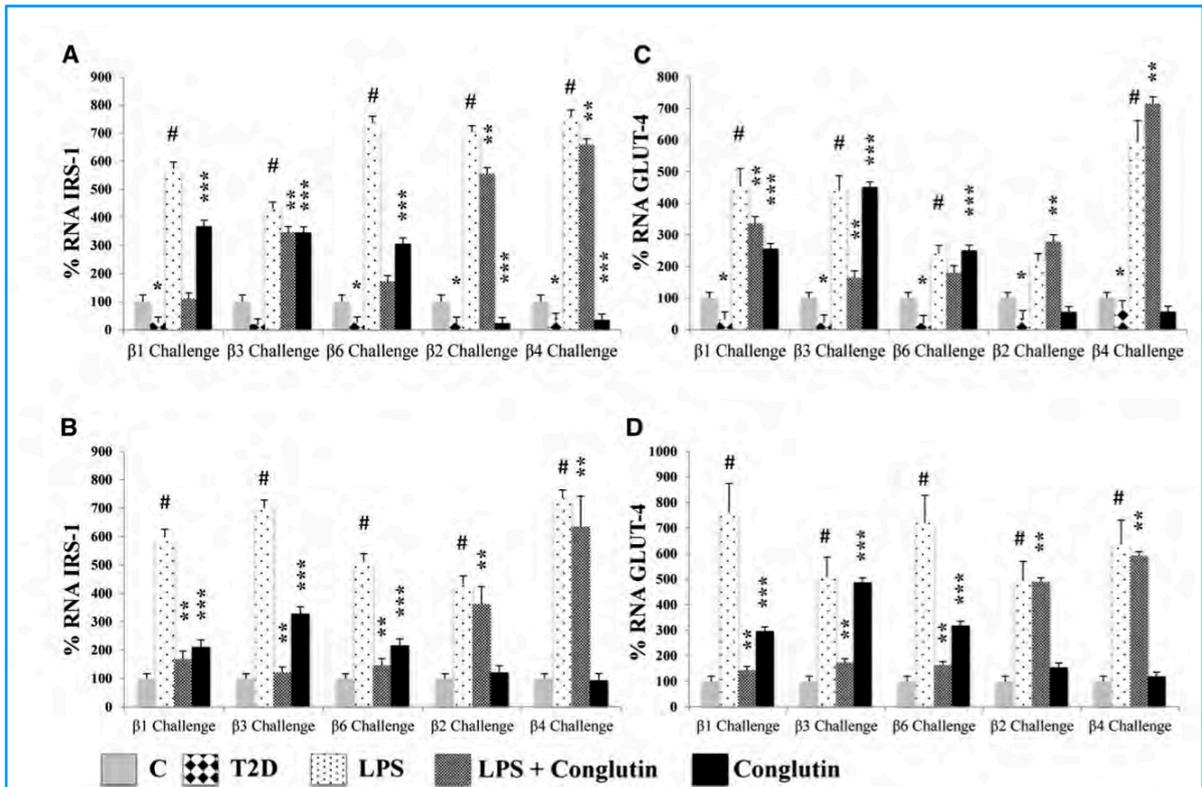


Figure 3.

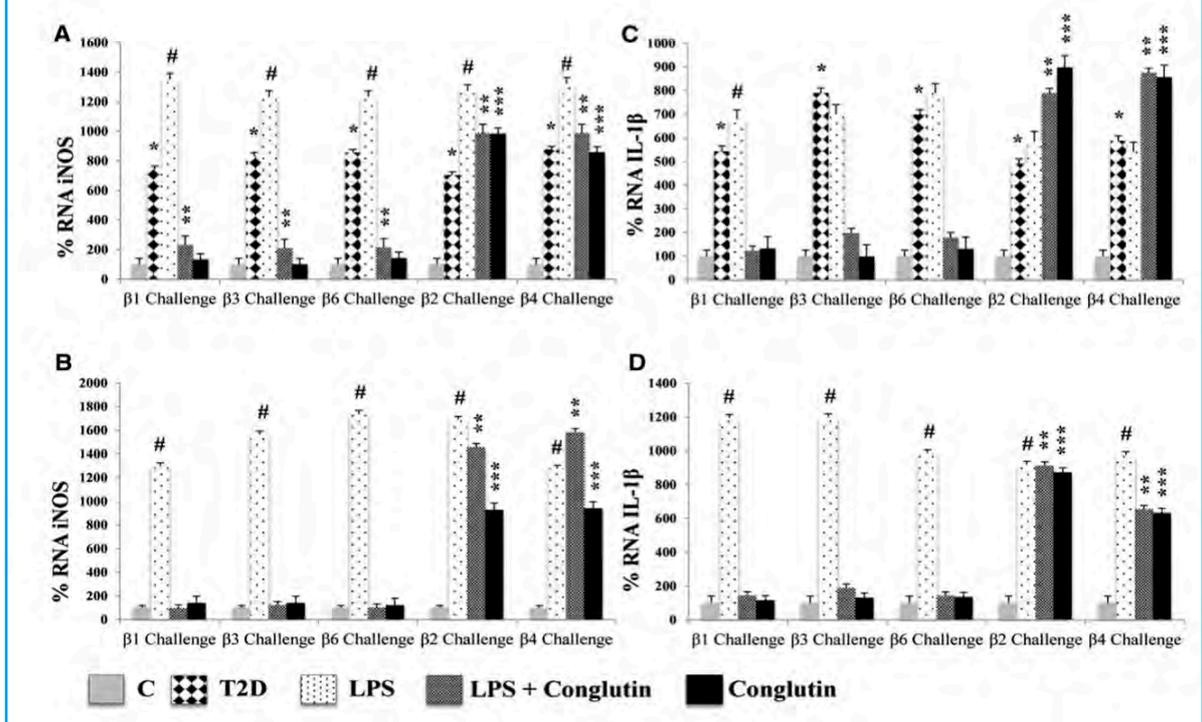


Figure 4.

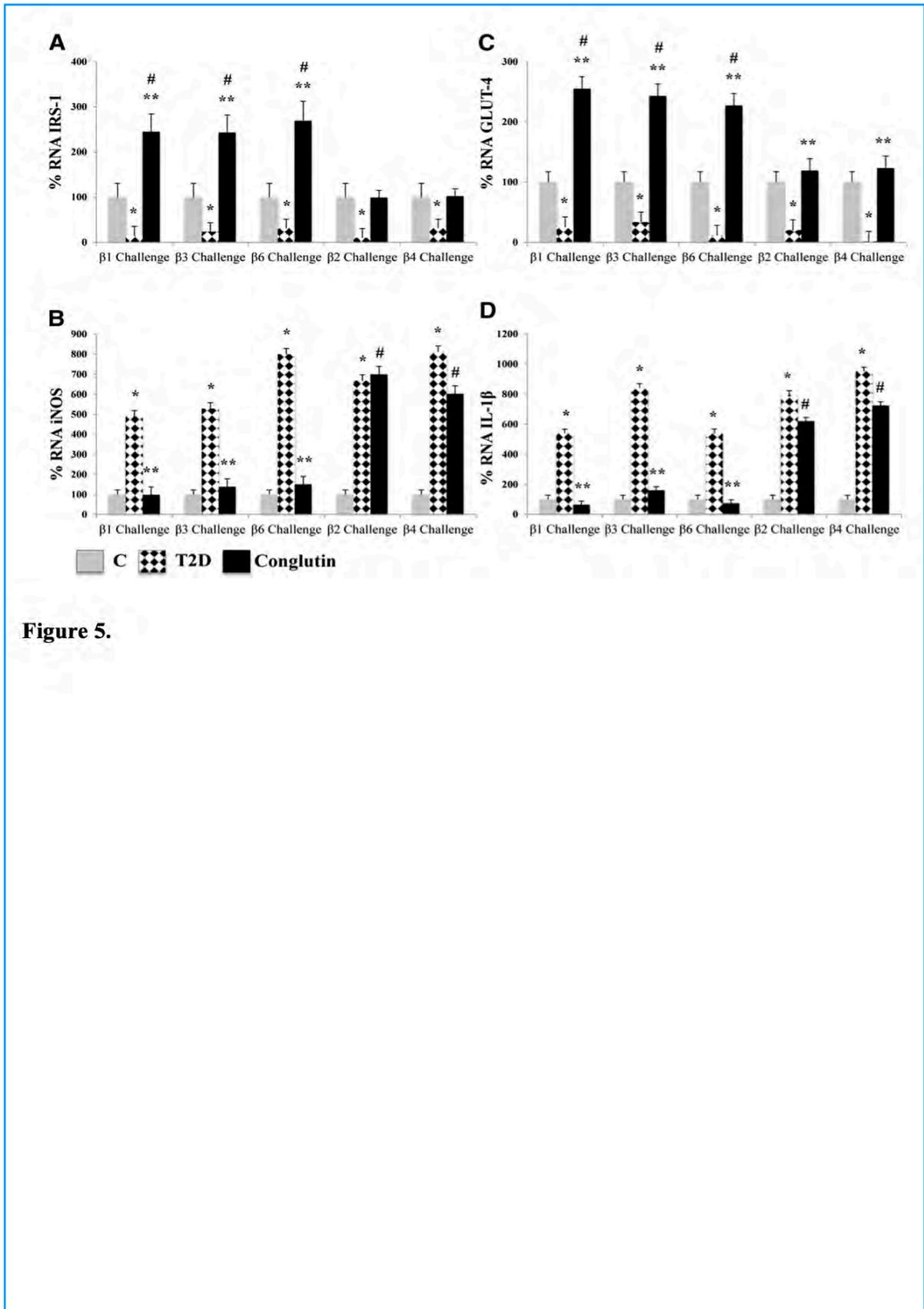


Figure 5.

4.3.2 PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Morales-Santana, S.; Foley, R.C.; Melser, S.; Alché, V.; Siddique, K.H.M.; Singh, K.B.; Alché, J.D.; Jimenez-Lopez, J.C. (2018). *Ex vivo and in vitro assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius**. *Journal of Functional Foods*. 40:510-519. doi: 10.1016/j.jff.2017.11.040.

RESUMEN

El desarrollo de ingredientes alimentarios funcionales usando proteínas de semillas de leguminosas tiene potencial para usos nutraceuticos.

Hemos purificado proteínas β -conglutinas recombinantes (r β 1 a r β 4, y r β 6) del altramuza de hoja estrecha usando cromatografía de afinidad, y hemos evaluado su actividad anti-inflamatoria usando sistemas *ex vivo* e *in vitro*. r β 1, r β 3, y r β 6 produjeron niveles menores de mediadores pro-inflamatorios como el óxido nítrico (alrededor de -34.0-veces en todos los casos), mRNA de la iNOS (-7.15, -7.97, -7.41-veces), interleucina 1 β (-12.05, -11.64, -12.16-veces), quimiocina CCL5 (-16.0, -18.0, -19.0-fold), y citoquinas entre las que se incluyen TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, y IL-12 (β 1: -28, -100, -8, -2, -49, -45, -127-veces; β 3: -22, -400, -9, -3, -33, -10, -2.54-veces; β 6: -72, -122, -11, -3, -2000, -13, -338-veces). Estos resultados sugieren que las conglutinas β 1, β 3, y β 6 tienen potencial como componentes de alimentos funcionales en nutraceuticos y que pueden constituir terapias alternativas para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios.

Ex vivo* and *in vitro* assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius

Elena Lima-Cabello¹, Sonia Morales-Santana^{2,3}, Rhonda C. Foley⁴, Su Melsers⁵, Victor Alché⁶, Kadambot H. M. Siddique⁷, Karam B. Singh^{4,7}, Juan D. Alché¹, Jose C. Jimenez-Lopez^{1,7*}

- 1 – Department of Biochemistry, Cell & Molecular Biology of Plants; Estacion Experimental del Zaidin; Spanish National Research Council (CSIC); Profesor Albareda 1, Granada E-18008, Spain.
- 2 – CIBER of Fragility and Healthy Aging (CIBERFES); Endocrinology Unit, Endocrinology Division; Biomedical Research Institute of Granada – “IBS.Granada” -; University Hospital San Cecilio; Dr Oloriz 15, Granada E-18012, Spain.
- 3 – Proteomic Research Service; Biomedical Research Institute of Granada – “IBS.Granada” –; University Hospital San Cecilio; Dr Oloriz 16, Granada E-18012, Spain.
- 4 – The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO); Agriculture and Food; Centre for Environment and Life Sciences (CELS), 147 Underwood Ave, Floreat WA 6014, Australia.
- 5 - INSERM U1215, NeuroCentre Magendie, Team - "Endocannabinoids and Neuroadaptation" -, Université de Bordeaux, 146 rue Léo-Saignat - 33076 Bordeaux Cedex, Bordeaux, France.
- 6 – Andalusian Health System, Health Center - "Villanueva de las Torres" -, San Blas, Granada E-18539, Spain.
- 7 – The UWA Institute of Agriculture and School of Agriculture and Environment; The University of Western Australia, 35 Stirling Highway, CRAWLEY, WA 6009, Australia.

*Corresponding author:

Jose C. Jimenez-Lopez, PhD
josecarlos.jimenez@eez.csic.es / [jcyjimenezl75@gmail.com](mailto:jcjimenezl75@gmail.com)

Abstract

The development of functional food ingredients using legume seed proteins has potential for nutraceutical use. We purified recombinant β -conglutin proteins (r β 1 to r β 4, and r β 6) from narrow-leaved lupin using affinity-chromatography, and evaluated their anti-inflammatory activity using *ex vivo* and *in vitro* systems. r β 1, r β 3, and r β 6 produced lower levels of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (about –34.0–fold in all cases), iNOS mRNA (–7.15, –7.97, –7.41–fold), interleukin 1 β (–12.05, –11.64, –12.16–fold), chemokine CCL5 (–16.0, –18.0, –19.0–fold), and cytokines including TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, and IL-12 (β 1: –28, –100, –8, –2, –49, –45, –127–fold; β 3: –22, –400, –9, –3, –33, –10, –2.54–fold; β 6: –72, –122, –11, –3, –2000, –13, –338–fold).

These results suggest that the β 1, β 3, and β 6 conglutins have potential as functional food components in nutraceuticals and that can provide alternative therapies for the prevention and treatment of inflammatory-related diseases.

Key words: Anti-inflammatory proteins; β -conglutins; chemokine CCL5; IL-1 β ; iNOS; *Lupinus angustifolius*; vicilin.

1. Introduction

There is an increasing demand for plant-derived proteins as components of functional foods in the nutraceutical industry and as an alternative to the environmentally expensive production of animal protein. In this regard, legumes are an economical dietary source of good quality protein and higher in protein than most other plant foods. In addition, legumes, particularly lupin proteins and peptides, have positive health effects (Arnoldi et al., 2015). Epidemiological studies on lupins, especially species from the 'sweet lupin' group, have shown that the consumption of seed proteins may provide preventive and protective effects for several chronic diseases such as cardiovascular disease, cancer, familial hypercholesterolemia, obesity and diabetes, hypertension (blood pressure-lowering), and control glycaemia (Villarino et al., 2016). Recently, the molecular basis for type 2 diabetes (T2D) prevention and treatment (Lima-Cabello et al., 2017), or cholesterol reduction (Lammi et al., 2016) has been elucidated, where bioactive peptides from the main seed storage protein family in narrow-leaved lupin (NLL; *Lupinus angustifolius*), the β -conglutins are important players in the promotion of these health benefits.

Chronic inflammation is involved in the onset and progress of T2D, and pancreatic tissue is an important target for this progression. Different factors or stressors promote the mechanisms underlying defective insulin secretion and responses, as well as insulin resistance in T2D. Among these, the most frequent are glucotoxicity, lipotoxicity, oxidative stress, misfolded proteins triggering endoplasmic reticulum (ER) stress, and alterations in gut microbiota that increase lipopolysaccharides (LPS) in blood or form amyloid deposits in pancreatic islets that stimulate immune-response-mediated inflammation (Montane et al., 2014). Continued and excessive inflammation promoted by the uncontrolled production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF- α), interferon gamma (INF γ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 (IL-1), chemokines (i.e. CCL2, CCL5), reactive oxygen species (ROS), adhesion molecules (i.e. ICAM-1, VCAM-1), and the overproduction of nitric oxide (NO) and nitrogen intermediates might elicit a characteristic situation of T2D progression (Turner et al., 2014). Thus, reducing the production and/or activity of pro-inflammatory mediators has potential as an anti-inflammatory treatment that can also result in reducing T2D progression.

The search for natural compounds with anti-inflammatory properties has increased as the incidence of inflammation-related diseases has soared. The health-promoting properties of phenolic compounds in legumes have been well-studied. Phenolic acids and flavonoids are abundant in legume seeds and have potential anti-inflammatory properties among other health benefits (Boudjou et al., 2013).

Few studies have reported on the anti-inflammatory properties of bioactive polypeptides and protein hydrolysates. Interestingly, the enzymatic plant protein hydrolysates in field pea seeds have shown anti-inflammatory properties throughout inhibition of mediators production such as NO, TNF- α , IL-1 β , and IL-6, without affecting cell viability (Ndiaye et al., 2012), and a few small and specific peptides have been isolated from them. Lunasin, a plant 2S-albumin-derived peptide found in soybean, barley, wheat, rye, and triticale has been studied for its benefits for cancer, cholesterol lowering, and cardiovascular disease (Malaguti et al., 2014). In soybean, the anti-inflammatory properties of this peptide were related to its capacity to suppress the NF- κ B pathway, an effect that is mediated by a lunasin- α V β 3 integrin interaction through the Arg-Gly-Asp (RGD) motif (Cam and de Mejia, 2012).

Blue lupine seed protein hydrolysates have potential anti-inflammatory properties due to the inhibition of enzymes involved in the inflammation pathway (phospholipase A2 and cyclooxygenase-2) (Millán-Linares et al., 2014). Bioactive peptides generated after two food-grade proteases also modulated the expression of pro- and anti-inflammatory mediators and attenuated the cell migratory response. The sequence of one of these peptides was characterized as GPETAFLR (Millán-Linares et al., 2015), which identifies 100% with *Glycine max* lectin-

the beginning and end of each experiment using representative wells. Viability was always >95%.

Cells were cultured to 80% confluence and then treated with LPS (1 µg/ml) for 24 h. The cells were treated with β1, β2, β3 β4, or β6 purified proteins for 24 h alone or in combination with LPS. Aliquots of β1, β2, β3 β4, and β6 were stored at –20°C in PBS. The purified congenitins were thawed just before use and diluted in DMEM to desired concentrations. 20 µg of each purified congenitin was added to cultures. After the treatments, cells were harvested for further analyses.

2.5. MTT assay for cell viability

Cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Riss et al., 2016). Briefly, PANC-1 cells were seeded in 96-well plates in the normal culture medium: 1×10^3 cells in 100 µL of medium per well in 200 µL of DMEM with FBS and antibiotics. After overnight incubation, cells were treated with LPS alone, or each of the β1, β2, β3 β4, and β6 purified protein as a combination of all five proteins at indicated doses in two replicates. After the treatments, the cells were thoroughly washed with PBS (at least three times) to avoid any interference of the phenolic compounds with the MTT. Next, 200 µL of free red-phenol DMEM containing 1 mg/mL of MTT was added, and the cells incubated for 3 h. Viable cells with active metabolism convert MTT into formazone crystals (purple color), which was solubilized with 200µL of DMSO, and the absorbance measured at test (570 nm) and reference (690 nm) wavelengths using a microplate reader (iMark microplate reader, BioRad).

2.6. Participant information

Fourteen healthy control subjects and fourteen type 2 diabetic patients were recruited for this study. The subjects were unrelated and diagnosed from the coverage area of the ‘Pedro Martínez’ hospital (A.G.S. North East Granada, Spain). All study procedures were performed using a protocol previously approved by the ethics committee of ‘Pedro Martínez’ hospital (A.G.S. North East Granada, Spain). All participants provided full written and informed consent for the procedures.

T2D group includes patients that were screened and diagnosed according to the American Diabetes Association guidelines (American Diabetes Association, 2017). Furthermore, anthropometric data were collected; i) Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters; ii) Blood pressure and heart rate were measured in a standardized manner. After subjects remained resting for a period of time at least of 5 min, blood pressure and heart rate were measured twice using a standard mercury sphygmomanometer and a heart rate monitor with a wrist receiver, respectively. In both cases, the mean of the two values was used for analysis; iii) We obtained samples of venous blood collected from the cubital vein in 4 ml lithium–heparin tubes; iv) Biochemical parameters were obtained. Fasting plasma glucose was measured by standard biochemical methods, where fasting can be defined as no caloric intake for at least 12 h; v) Glycated hemoglobin (HbA1c) was measured using standard automated laboratory techniques, by high-performance liquid chromatography.

When calling patients diagnosed with T2D for blood samples extraction, these receiving treatment for T2D, e.g. metformin, sulfonylureas, thiazolidinedione or other medications that might affect inflammation process were excluded from this study.

2.7. Whole blood culture

Venous blood was drawn into lithium–heparin tubes (BD Vacutainer System, Heidelberg, Germany) in the morning. Participants fasted for 12 h before blood collection (water only, no

food intake). Within 3 h, whole unseparated blood was diluted 1:3 with DMEM and HEPES 2.4% (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), and agitated gently in 50 ml tubes (Greiner Bio-one, Solingen, Germany); 1 ml aliquots were seeded in 24-well plates (Nunc, VWR International GmbH, Langenfeld, Germany) and cultured for 24 h at 37°C and 5% CO₂. From each blood draw, we performed triplicate incubations in parallel with positive and negative controls — separate cultures that included each purified β -conglutin (20 μ g). The same lots of purified β -conglutin (β 1, β 2, β 3, β 4, β 6), LPS and PBS were used for all experiments. Blood cultures were removed from each well and centrifuged at 700 g for 5 min at 20°C. The supernatants were aliquoted and stored at -20°C until further analysis (Lima-Cabello et al., 2017).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood by density-gradient centrifugation on Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO), washed three times in Hanks' balanced salt solution (Life Technologies, Grand Island, NY), and resuspended in complete medium consisting of RPMI 1640 (Sigma) supplemented with penicillin, streptomycin, and L-glutamine (100 U/ml, 100 μ g/ml, and 2 mM, respectively) (Sigma).

2.8. Polymerase chain reaction (PCR) array for diabetes-inflammatory response

Total RNA was extracted from isolated PBMC of type 2 diabetic patients using an RNeasy Mini Kit (Qiagen). 2 μ g total RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using an RT² First-Strand kit (Qiagen). The resulting cDNA was mixed with RT² SYBR Green qPCR (Qiagen) and aliquoted into a commercially available diabetes-obesity and inflammation pathway-specific real-time RT² Profiler PCR Array (PAHS-023Z, Qiagen), including the analysis of CCL5, CCR2, ICAM-1, IFN- γ , IL-6, IL-12, TNF- α , and NF- κ B1 (p50). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using a Light Cycler[®] 480 (Roche), where samples were run as duplicates for 40 cycles: 1 cycle of 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, and 40 cycles of 60°C for 1 min. Cycle thresholds were measured, and the relative expression of genes was calculated by comparing Ct values. The difference in gene expression was evaluated by calculating the fold-change in expression levels based on at least a 2-fold up or down change in comparison to the gene expression levels of the control group. All gene expression levels were normalized to the housekeeping genes - Actin beta, hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1, beta-2-microglobulin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase — which did not vary significantly between the study groups.

2.9. Quantitative real-time PCR

Real-time quantitative PCR technology was used to assay IL-1 β , iNOS, and TNF- α mRNA expression from each experimental group. Total RNA was isolated from PANC-1 cells using the RNeasy Tissue RNA isolation kit (Qiagen). First-strand cDNA was synthesized using a High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). For gene expression assays, cDNA was prepared, diluted and subjected to real-time PCR, and amplified using TaqMan technology (LightCycler 480 quantitative PCR System, Roche). Primers and probes were used from the commercially available TaqMan Gene Expression Assays (Hs01555410_m1, Hs01075529_m1, Hs00174128_m1, respectively, Applied Biosystems). Relative changes in gene expression levels were determined using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. The cycle number that detected the transcripts (CT) was normalized to the cycle number for β -Actin (Hs99999903_m1, Applied Biosystems, used as the housekeeping gene) detection, referred to as Δ CT, where the relative mRNA levels were presented as unit values of 2^[CT (β -Actin)-CT (gene of interest)], having CT as the threshold cycle value defined as the fractional cycle number at which the fluorescent target signal passes a fixed threshold above the baseline. PCR efficiency was determined by TaqMan analysis on a standard curve for targets and endogenous control amplifications, which were highly similar.

2.10. ELISA assays for cytokines, INF- γ and TNF- α quantification

After cell culture, the cells were counted and plated in six well plates (106 cells per well), with two wells per group. All experiments were made in duplicate to confirm data and reduce variation among samples.

After 24 h incubation, the treated culture media was removed and cells washed with 4°C PBS. During protein extraction, the plates were kept on ice to avoid denaturation of cytokines. Each well was filled with 100 μ L of buffer (150 mM sodium chloride, 1.0% NP-40, 50 mM Tris pH 8), supplemented with 1 μ L of protease inhibitor (Sigma), and remained in contact with the cells for 15 s. The cells were then vigorously scraped from the bottom of the wells and transferred to a micro centrifuge tube. The tubes were centrifuged in a refrigerated centrifuge (4°C) at 12,500 \times g for 15 min. After centrifugation, the supernatant was collected and diluted to a 1:4 ratio for the ELISA sets for IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL12, IL-17, INF- γ , and TNF- α (Diacclone) following the manufacturer's instructions. Data were statistically analyzed using the t-test.

2.11. Nitric oxide detection

The total amount of NO production including nitrite/nitrate contents from cultured blood supernatants of control subjects and T2D patients was measured following the recommended protocol using a commercial assay kit ab65328 (Abcam, Cambridge, UK). Briefly, supernatants were collected and centrifuged to remove cell debris. Plasma from all experimental groups was deproteinized according to the manufacturer's instructions. An equal amount (30 μ l) of samples and standards were loaded into 96-well microtiter plates. A volume of nitrate reductase, enzyme cofactor, and assay buffer was added, followed by 1 h incubation at room temperature by Enhancer, Griess Reagent R1 and Griess Reagent R2. Immediately after incubation, absorbance at 540 nm was detected with a microplate reader (iMark Biorad), and the value of the blank control (medium without cells) was subtracted. Total nitrite/nitrate concentrations were calculated with the calibrated standard curve.

2.12. Statistical analysis

Values shown are expressed as means \pm S.E.M. of the three individual experiments. Statistical significance of the data was assessed using SPSS software by analysis of variance followed by Dunnett analysis. P-values \leq 0.05 were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Purification of anti-inflammatory proteins

Purification of β -conglutins was performed according to the set-up methodology of Jimenez-Lopez et al. (2016). Elution was performed with the linear gradient of imidazole (0–250 mM). The SDS-PAGE analyses of the eluted fractions showed a single protein band of approximately 68 kDa (Fig. 1), where recombinant β -conglutins exhibited a level of purity >95%, and a concentration of 10-25mg/mL. Analysis by immunoblotting using the anti- β -conglutin protein antibody confirmed the identity of the recombinant protein (Fig. 1).

3.2. Beta-conglutins do not affect the cellular viability of PANC-1 pancreatic cells

Before assessing anti-inflammatory activity, we evaluated cell viability and the potential cytotoxicity of the β -conglutins. To investigate whether LPS and β -conglutin isoforms have a cytotoxic effect, an MTT assay was performed on PANC-1-pancreatic cells after separately adding LPS plus each β -conglutin, as well as a mix of the five β -conglutins at increasing concentrations to condition DMEM with FBS and antibiotic culture medium for 24 h. The LPS plus individual β -conglutins had no significant effects on cell viability, nor did the mix of β -conglutins (Table 1, Supplementary Table 1), when compared to the untreated control group. For all samples, even though a degree of proliferative activity was observed, which was not

significant, the cells remained in the quiescent phase for longer. The addition of 10% FBS was used as a positive control.

To complete the feasibility studies of the β -conglutins, cell viability was assayed using trypan blue exclusion in PANC-1-pancreatic cells treated with increasing concentrations of LPS and each β -conglutin, and the mix of conglutins, for 24 h. As expected, there were no differences in cell viability after 24h of incubation in the presence of higher concentrations of each β -conglutin, or in the mix of β -conglutins, which ranged from 10–20 μ g when compared to the control (Table 1, Supplementary Table 1).

These results suggest that β -conglutins (individually or together) do not compromise the integrity of PANC-1 pancreatic cells. Moreover, cell viability did not differ significantly from the control assays upon exposure to higher concentrations of β -conglutins. Hence, β -conglutins did not affect membrane integrity in this cell model.

3.3. Participant information

The clinical parameters of the population studied are summarized in Table 2. As expected, the T2D patients showed classical parameters for BMI, and in the levels of fasting glycaemia ($p < 0.001$), blood pressure ($p < 0.03$), heart rate ($p < 0.001$), and HbA1c ($p < 0.001$), as expected compared to the control study group of healthy volunteers with no signs of T2D that were chosen as the control study group.

3.4. Effect of β -conglutin peptides on the inflammatory process

Different diseases, such as T2D, obesity, and metabolic syndrome, are associated with and chronically sustained by inflammation. Multiple mechanisms could be underlying inflammatory response diseases, where multiple stressor factors affect pancreatic islets function, and contributing to the pathology depending on aspects such as genetic background and environment (Halban et al., 2014). Diabetes is a chronic disease that occurs when pancreatic islets fail to produce sufficient insulin and/or the sensitivity of glucose-metabolizing tissues to insulin decreases.

During the establishment of T2D, chronic hyperglycemia may lead to organ damage. Pancreatic beta cells mediate tissue damage and promote inflammatory responses together with immune system cells by releasing pro-inflammatory mediators and other cell attractants as chemokines, establishing a feed-forward process that further increases immune system cell content and promotes a chronic inflammatory state (Donath and Shoelson, 2011).

Increased levels of cytokine IL-1 β or iNOS as a consequence of stressor factors are among the main contributors to inflammatory development since IL-1 β -mediated pancreatic β -cell dysfunction is involved in the pathogenesis of pancreatic β -cell dysfunction and establishment of T2D. For instance, sustained exposure of the pancreatic β -cell to IL-1 β activates the expression of iNOS resulting in excessive production of NO, which induces the expression of pro-inflammatory genes (Wang et al., 2010).

Therefore, we evaluated the ability of purified β -conglutins (β 1, β 2, β 3, β 4, and β 6) to modulate the expression levels of pro-inflammatory mediators (possible potential anti-inflammatory effects) as IL-1 β and iNOS mRNA in PANC-1-pancreatic cells (Fig. 2).

β 1+LPS, β 3+LPS, and β 6+LPS significantly suppressed iNOS mRNA expression in PANC-1 [−7.15, −7.97, and −7.41–fold, respectively, *versus* LPS treated culture cells] (Fig. 2A). In contrast, iNOS mRNA levels remained significantly high [+8.42, and + 6.93 - fold, respectively, *versus* LPS-treated culture cells] (Fig. 2A) when β 2+LPS and β 4+LPS were used in challenge assays. β 1, β 3, and β 6 did not alter mRNA levels of iNOS in PANC-1 cell culture (Fig. 2A). However, mRNA levels of iNOS significantly increased using β 2 [+8.08 - fold *versus* culture cells] and β 4 [+7.21–fold *versus* culture cells] (Fig. 2A).

In this regard, gene expression levels of IL-1 β followed a similar pattern to iNOS (Fig. 2). Figure 2B shows a significant reduction in mRNA expression levels of IL-1 β in PANC-1 cell when challenged with β 1+LPS, β 3+LPS, and β 6+LPS [–12.05, –11.64, and –12.16–fold (Fig. 2B), respectively, *versus* culture cells]. No differences in IL-1 β cytokine levels were observed when challenges were performed with β 1, β 3 and β 6 when compared to the control group (Fig. 2B). Nevertheless, a large induction of IL-1 β cytokine levels was observed after the LPS+ β 2 and LPS+ β 4 challenges [+6.42, and +6.93, respectively, *versus* culture cells] in comparison to LPS+ β 1, LPS+ β 3, and LPS+ β 6 challenge assays (Fig. 2B). In addition, the mRNA expression levels of IL-1 β remained significantly high when β 2 and β 4 were used in challenge assays [+7.64, and +7.65–fold (Fig. 2B), respectively, *versus* culture cells].

These results indicate that β -conglutins, particularly β 1, β 3 and β 6, reduce the pro-inflammatory capacity of pancreatic cells PANC-1 by diminishing iNOS and cytokine expression, thus assisting in the amelioration of the inflammatory process. It may be possible that this reduction of the pro-inflammatory capacity would be the result of exerting an antioxidant effect, which could reduce oxidative stress in T2D and other related diseases with high levels of oxidation (Bognar et al., 2013; Boudjou et al., 2013). Furthermore, these results on PANC-1 cell are in accordance with previous preliminary analysis showing comparative decreased expression levels of iNOS and IL-1 β mRNA in T2D blood culture using β -conglutins challenges (Lima-Cabello et al., 2017).

Challenge assays were also performed using a mix of β -conglutinin isoforms (β 1+ β 3+ β 6+ β 2+ β 4) in PANC-1 cell culture to measure variations of iNOS and IL-1 β levels using qRT-PCR. The β -conglutinin pool suppressed the induction levels of iNOS and the pro-inflammatory mediator IL-1 β in the β -conglutinin mix and LPS+ β -conglutinin mix treated cells [mix: –6.0, and –7.03–fold *versus* LPS–treated culture cells (Fig. 2A); LPS+mix: –5.02 and –5.27–fold *versus* LPS treated culture cells (Fig. 2B)].

It has been well established that local production and/or systemic IL-1 β play an important role in the progression of pancreatic tissue dysfunction, particularly β -cell apoptosis in T2D. This process is produced by a sustained inflammatory stage initiated and amplified by IL-1 β -mediated iNOS synthesis and NO production (Russell and Morgan, 2014). NLL β 1-, β 3-, and β 6-conglutinin proteins can reverse this state by diminishing the pro-inflammatory IL-1 β and iNOS mRNA levels.

3.5. β -conglutinin peptides inhibit the production of multiple cytokines and inflammation mediators

Cytokines are implicated in the regulation of pancreatic β -cell function. Besides plasma circulating cytokines, pancreatic β -cells produce various cytokines in response to different physiological and pathological stimuli, playing key roles in regulating β -cells function (Wang et al., 2002). Insulin resistance, increase the production of deleterious (pro-inflammatory) cytokines in β -cells and plasma. In a stage of T2D progression, this abnormal situation is characterized by an imbalance in the profile of pro-inflammatory cytokines and mediators that play an important role in triggering β -cell dysfunction and T2D since crosstalk among cytokines in pancreatic β -cells or other tissues may be strongly involved in regulation of β -cell function (Tanabe et al., 2017). Thus, restoring the balance in favor of protective cytokines in β -cells and plasma could prevent and treat β -cell dysfunction and T2D progression.

Biological activities of peptides from legume seeds have been observed. However, only a few studies have characterized the anti-inflammatory effects of plant-derived short peptides, which are usually mediated through the regulation of pro-inflammatory nitric oxide, cytokines (i.e., interleukins), TNF- α , and INF- γ . Bioactive peptides in soybean flour significantly inhibited inflammatory mediators including NO, iNOS, COX-2, and TNF- α in LPS-induced

macrophages (Ndiaye et al., 2012). Moreover, the peptide lunasin, a 43 amino acid peptide derived from the soybean 2S albumin seed protein, reduced the production of ROS in LPS-induced macrophages and inhibited the release of TNF- α and IL-6 (Millán-Linares et al., 2014; 2015).

We evaluated the potential anti-inflammatory effect of different β -conglutins (β 1, β 2, β 3, β 4, and β 6) and their capacity to modulate the concentration of pro-inflammatory mediators including TNF- α , INF- γ and cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-17 in PANC-1-pancreatic cells (Fig. 3, Supplementary Table 2, 3 and 4). The cytokines and other mediators were estimated under basal conditions, after cell treatment with LPS, by challenging the cell culture with β -conglutins after LPS and by adding LPS+ β -conglutinin together.

The production (protein levels) of cytokines TNF- α , INF- γ and interleukins IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-17 proteins significantly increased (several fold) in LPS + β 2 and LPS + β 4 challenges [LPS + β 2: +29, +6, +23, +6.2, +59, +12, +94, +33-fold *versus* C, respectively] and [LPS + β 4 :+29, +6, +28, +3.8, +59, +12, +62, +32-fold *versus* C, respectively] (Fig. 3A to H; supplementary Table 3); while the LPS+ β 1, LPS+ β 3, and LPS+ β 6 challenges resulted in a substantial reduction (several fold) in protein levels [LPS+ β 1: -28, -100, -8, -2, -49, -45, -127, -13-fold *versus* LPS treated cells, respectively; LPS+ β 3: -22, -400, -9, -3, -33, -10, -2.54, -2-fold *versus* LPS-treated cells, respectively; LPS+ β 6: -72, -122, -11, -3, -2000, -13, -338, -9-fold *versus* LPS treated cells, respectively] (Fig. 3A to H; Supplementary Table 4).

β 1, β 3, and β 6 did not alter protein levels of TNF- α , INF- γ , or all analyzed interleukins in PANC-1 cell culture (Fig. 3). However, protein levels of TNF- α , INF- γ , and interleukins IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-17 significantly increased in challenges performed using β 2 [+39, +70, +8.4, +24, +38, +6, +78, +12 - fold *versus* C], and β 4 [+19, +6, +21, +6, +39, +12, +70, +40 - fold *versus* C] (Fig. 3A to H; supplementary Table 3). This data is in accordance with the results obtained using RT-qPCR, where PANC-1-cells had reduced mRNA expression levels of the pro-inflammatory interleukin IL-1 β (Fig. 2).

Furthermore, to study the combinatorial effect of the purified β -conglutinin proteins on the protein levels of TNF- α , INF- γ , and interleukins IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-17, we performed assays in PANC-1 cell culture using a mix of the β -conglutinin isoforms (β 1+ β 3+ β 6+ β 2+ β 4). Challenges using the β -conglutinin mix + LPS strongly reduced the protein levels of all pro-inflammatory cytokines [-19, -4.8, -18, -5, -45, -108, -21, -10-fold *versus* LPS treated cultured cells, respectively] (Fig. 3A to H; supplementary Table 4) but no differences were observed using the β -conglutinin mix in PANC-1 cells.

We demonstrated that NLL β 1-, β 3-, and β 6-conglutinin proteins alone or by joint action decreased the production levels of pro-inflammatory mediators. This wide anti-inflammatory capacity may be able to cope with multiple situations that promote a feed-forward process in the establishment of a chronic inflammatory state that is advocated by T2D. Thus, β -conglutinins may be able to reverse the harmful effects of an inflammatory course of various cellular states as different levels as described below.

1) A sustained elevated level of fatty acids that induce the release of IL-1 β , IL-6 and IL-8. This continued exposure of pancreatic β -cells to these kinds of cytokines promotes excessive production and release of ROS and inhibits of insulin secretion, which resulted in the apoptosis of the pancreatic β -cells (Imai et al., 2013). In this regard, challenging T2D blood with β 1, β 3, and β 6 isoforms decreased the mRNA expression level of IL-6 in PBMC samples [-27.5, -28.0, -27.0-fold *versus* T2D, respectively] (Supplementary Table 2).

2) Pancreatic β -cell apoptosis induction by IL-1 β and IFN- γ is activated by ER stress (Gurzov et al., 2009).

3) Pancreatic islet apoptosis was induced by the synergistic action of TNF- α and IFN- γ through activation of Ca²⁺ channels, which promote NO synthesis and subsequently activate the ER

stress pathway (Ramadan et al., 2011), leading to mitochondrial dysfunction and caspases activation (Chang, 2004).

4) The synergistic combination of two (IL-1 β + IFN- γ) or three (IL-1 β + IFN- γ + TNF- α) cytokines in pancreatic tissues increased NO production by directly increasing iNOS protein synthesis, or indirectly affecting mRNA expression of iNOS islets, resulting in islet cell destruction (Sekine et al., 2000).

In the current study, the mRNA expression levels of two of the three main apoptosis-inducer factors (TNF- α and IFN- γ) were declined in PBMC isolated from T2D blood samples after treatment with β 1, β 3, and β 6-conglutin isoforms [TNF- α : -28, -32, -31-fold *versus* T2D, respectively; and INF- γ : -6.09, -1.07, -5.8-fold *versus* T2D, respectively] (Table 3), which may have a positive effect on pancreatic β -cell survival (Salim et al., 2016).

5) IFN- γ positively affects IL-12 mRNA levels, while IL-12 acts as a signaling molecule for increasing IFN- γ synthesis (Liu et al., 2010). The reduction in IL-12 mRNA levels in T2D blood cells after treatment with β 1, β 3, and β 6 [-25.7, -27.4, -27.0-fold *versus* T2D, respectively] (Supplementary Table 2), may reduce IFN- γ synthesis (and increase of IL-12 production) and its detrimental inflammatory effects.

6) Interleukin-17 (IL-17A) acts as a highly potent inflammatory cytokine and a potent T2D inducer via ROS production, playing an important role in insulin resistance resulting in tissue damage. In addition, IL-17 and IFN- γ have a synergistic collaboration to stabilize diabetes (Marwaha et al., 2014). IL-17 has pleiotropic activities including the induction of various inflammatory cytokines (e.g., IL-6 and TNF- α) and chemokines [e.g. monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1)] from a large variety of cells (Kawaguchi et al., 2004). Thus, the reduction in IL-17 protein levels (Fig. 3) may contribute to the reduced pro-inflammatory effects of IL-6 (Supplementary Table 2) and TNF- α (Fig. 3, Table 3), pancreatic islet cell apoptosis, and immune cell local recruitment to enhance the inflammation process in T2D progression.

7) The pro-inflammatory effects induced by IL-1 β through synthesis induction of IL-6, IL-8, TNF- α , and chemokines CCL2 production attracted macrophages and other immune cells to pancreatic tissues, which enhance the feed-forward inflammation progression in islets (Vanbervliet et al., 2002). This effect could be reduced by diminishing levels of IL-1 β production (Fig. 3) and IL-6 (Supplementary Table 2), IL-8, and TNF- α (Fig. 3, Table 3).

8) IL-2 and chemokine CCL5 induce the activation and proliferation of immune cells natural killer (NK), which enhances pro-inflammatory molecular processes (Wu et al., 2017). In the current study, the reduction in IL-2 and CCL5 mRNA levels (Figure 3, Table 3, Supplementary Table 2) by β 1, β 3, and β 6 conglutins may help to reduce this pro-inflammatory effect.

9) The nuclear factor NF- κ B is a key player in inflammatory diseases as it controls the global inflammatory response. NF- κ B regulates the expression of a plethora of pro-inflammatory genes in most metabolic tissues, including enzymes [e.g. cyclooxygenase (COX)-2, 5-lipoxygenase (LOX), iNOS], cytokines [e.g. interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, chemokines CCL2, CCL5, and TNF- α], and adhesion molecules (e.g. ICAM-1, VCAM-1, cell cycle regulatory molecules, and angiogenic factors) (Lawrence, 2009). The activation of NF- κ B, particularly in patients with a chronic inflammatory state, is critically associated with a wide variety of human diseases, including diabetes, asthma, atherosclerosis, and cancer. In the current study, the mRNA expression level of NF- κ B1 (p50), a dimeric component of the NF- κ B complex, was strongly inhibited by β 1, β 3, and β 6 [-20.6, -25.0, -26.3-fold *versus* T2D, respectively] (Table 3), which may contribute to a reduction in the formation and activation of the NF κ B complex. This reduction in NF- κ B mRNA expression level may also be indirectly facilitated by the reduction in TNF- α levels promoted by the same β -conglutin isoforms (Fig. 3, Table 3) since this cytokine is a potent inductor of NF- κ B expression (Lawrence, 2009).

The activation of NF- κ B expression also induces the production of adhesion (i.e., ICAM-1), and chemotaxis (i.e., CCL2, CCL5) molecules (Naamane et al., 2007). Thus, a reduction in NF- κ B levels prompted by β -conglutins (Table 3) may facilitate the same effect on ICAM-1, chemokine CCL5 and the CCR2 receptor expression (Table 3, Supplementary Table 2) and contribute to diminishing inflammation molecular processes, thus reducing immune cell recruitment.

3.6. Effect of β -conglutin isoforms on NO in T2D blood culture

Nitric oxide is a signaling molecule that plays a key role in the pathogenesis of inflammation. NO is considered a pro-inflammatory mediator that induces inflammation when over-produced in abnormal situations. The link between pancreatic β -cell stress and inflammation in T2D activates the expression of a variety of pro-inflammatory genes of cytokines and chemokines (e.g., TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2, CCL5, and other pro-inflammatory mediators such as NO), in addition to the excessive production of ROS. This pro-inflammatory cytokines expression would activate inflammatory signaling pathways and the attraction of immune cells that further aggravate local inflammation, causing β -cell apoptosis and T2D (McDaniel et al., 1996).

NO production by inducible NO synthase (iNOS) is a sign of inflammation progression. The over-production of NO is detrimental for the host, leading to the development of inflammatory-related diseases (Fujimoto et al., 2005).

In the current work, The effect on the NO production was determined in T2D blood cell culture challenged with individual β 1, β 2, β 3, β 4, β 6 isoforms, or β -conglutins mix after LPS treatment for 24h, and also adding at the same time LPS+ β -conglutin isoforms or LPS+mix. LPS added to blood cell culture significantly increased NO production, compared to the control group (Fig. 4). A range of β -conglutin treatments was tested to see if they could reverse the effects of LPS on NO production. The blood cultures of patients with T2D had significantly elevated levels of NO compared to blood cultures from normal donors (Fig. 4), adding β 1, β 3, or β 6 conglutins to the T2D blood cultures able to reduce NO production [-34, -34.2, -34-fold, respectively, *versus* T2D blood culture alone], but adding β 2 or β 4 conglutins had no effect. Interestingly, adding the β -conglutin mix (β 1+ β 2+ β 3+ β 4+ β 6) to T2D blood cultures also strongly suppressed NO production [-63-fold *versus* T2D blood culture alone] (Fig. 4).

Soybean lunasin, a short 2S-albumin-derived peptide, has anti-inflammatory effects by inhibiting NO production in macrophages (de Mejia and Dia, 2009). However, this is the first time that a legume protein belonging to *L. angustifolius* has suppressed NO production in blood culture cells from T2D patients, with potential anti-inflammatory effects.

3.7. β -conglutin proteins inhibit chemotaxis and cell adhesion capacity

The pathogenesis of pancreatic islet inflammation in T2D is a complex process that involves immune cell infiltration, cytokine production, β -cell apoptosis, islet amyloid peptide deposition and fibrosis (Montane et al., 2014). Inflammatory pathways contribute to impaired insulin-stimulated glucose uptake in adipose tissue due to TNF- α and chemokines inhibition in the liver, and skeletal muscle cells, as well as diminished pancreatic production of insulin and dysregulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis (McArdle et al., 2013). Expression levels of cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-18, and chemokines such as CCL2 (MCP-1) and CCL5 or RANTES, strongly contribute to localized inflammation and islet dysfunction in T2D by recruiting immune cells into adipose tissue and pancreatic islet, and driving insulin resistance and hyperglycemia. This recruitment of immune cells is enhanced by the vicious cycle of IL-1 β auto-stimulation, and amyloid peptide deposition that may interact with immune cells to promote IL-1 β synthesis (Turner et al., 2014).

We hypothesized that NLL β -conglutins might have a beneficial effect on the chemotaxis mechanism by modulating the CCR/CCL axis. To examine this, we evaluated the expression

of CCR2 and chemokine CCL5 in isolated PBMC of type 2 diabetic patients after 24 h of incubation with individual β -conglutin isoform proteins. It is clear that β -conglutins markedly modulated the CCR/CCL axis. CCR2 expression decreased dramatically in the β 1, β 3, and β 6 challenges [–33.6, –34.6, –27–fold *versus* T2D PBMC, respectively], but there was no effect in the β 2 and β 4 challenges compared to T2D PBMC (Supplementary Table 2). Similarly, the expression of the chemokine CCL5 declined in the β 1, β 3, and β 6 challenges [–16.0, –18.0, –19.0–fold *versus* T2D PBMC, respectively] (Table 3).

Thus, results indicate that treatment of T2D blood cultures with β 2 or β 4 conglutins increased the expression of both receptor CCR2 and chemokine CCL5 and, consequently, the capacity of chemotaxis to increase immune cell migration to inflammatory tissues. In contrast, treatment with β 1, β 3, or β 6 conglutins reduced CCR2 and CCL5 expression levels, which directly ameliorated the inflammatory state by inhibiting immune cell recruitment and migration, and reduced the levels of inflammatory mediators (iNOS, TNF- α , INF- γ), interleukins mRNA and protein production (Fig. 3, Table 3, Supplementary Table 2), and NO production (Fig. 4). The inhibition of CCR2 and chemokines CCL2 and CCL5 significantly improves pancreatic pathology by increasing the number of pancreatic islets and the near complete reversal of islet hypertrophy (Cardona et al., 2014). In addition, pancreatic functional recovery may be a reflection of the reduced severity of diabetes, as insulin decreased CCR2 levels, improved the systemic response, and increased hepatic glycogen content to ensure normalization.

It is well established that chronic inflammation plays a critical role in the pathogenesis of various diseases such as T2D via multiple mechanisms. One such mechanism is the activation and increased expression of vascular cell adhesion molecules (i.e. ICAM-1, VCAM-1) that facilitate the adhesion, transmigration and recruitment of immune cells, particularly monocytes and T-cells, with further induction and release of pro-inflammatory cytokines, macrophages migration, and lipid oxidation that promote and sustain feed-forward inflammatory responses (Muller, 2013). Our results showed that, in addition to reducing the capacity to recruit immune cells by decreasing the expression of CCR/CCL axis mediators, conglutin isoforms β 1, β 3, and β 6 have the capacity to reduce chemotaxis due to the strong reduction in the expression of the cell adhesion molecule ICAM-1 in T2D blood samples [–28.7, –22.1, –26.8–fold *versus* T2D PBMC, respectively] (Supplementary Table 2). Thus, joint modulation of chemotaxis and cell adhesion by lowering the expression of CCR/CCL axis and ICAM-1 molecules by β -conglutin proteins may reduce immune cell recruitment and hence ameliorate inflammatory progress. This effect would also facilitate the reduction in TNF- α levels in both, PANC-1 cell model and PBMC of type 2 diabetic patients (Fig 3, Table 3, Supplementary Table 2), since this cytokine can induce ICAM-1 expression (Thichanpiang et al., 2014).

4. Conclusions

Islet inflammation contributes to the loss of β -cell function with T2D development and progression. In this study, treatments with particular NLL β -conglutin protein isoforms (β 1, β 3, and β 6) to LPS-stimulated *ex vivo* (blood samples from T2D diagnosed patients), and in vitro (PANC-1 pancreatic) culture cells assays promoted the attenuation of mRNA expression in key pro-inflammatory mediators of β -cell damage in T2D including interleukin IL-1 β , chemokine CCL5 and chemokine receptor MCP-1, the adhesion factor ICAM-1, cytokines (TNF- α , INF- γ), and mediator NF- κ B1. In addition, protein production declined significantly for pro-inflammatory cytokine TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and IL-17. Moreover, conglutins β 1, β 3, and β 6 inhibited NO production and mRNA and protein levels of iNOS.

This study is the first to describe the anti-inflammatory effect of a legume protein family (β -conglutin), particularly NLL β 1-, β 3-, and β 6-conglutin proteins, with strong evidences suggesting that NLL β -conglutins might play a key role as functional food components with novel therapeutic options for the prevention and treatment of disease-related inflammation.

Further studies will be conducted to reveal the mechanisms underlying the NLL β -conglutins promoting these anti-inflammatory effects using *in vivo* experimental models through the lowering effects of β -conglutins on pro-inflammatory modulators, and the potential influence of the β -conglutin proteins digestibility for inflammatory stay amelioration in these T2D *in vivo* models.

5. Acknowledgement

This work was partially supported by the European Research Program MARIE CURIE (FP7-PEOPLE-24 2011-IOF) through the grant ref. number PEOF-GA-2011-301550 to JCJ-L, KBS and JDA. JCJ-L thanks the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness for the grant ref. RYC-2014-16536 (Ramon y Cajal Research Program), and the grant ref. BFU2016-77243-P.

6. Conflict of Interest Statement

The authors have declared that no competing interests exist.

7. Authors' Contribution

Conceived and designed the experiments: JCJ-L, EL-C. Performed the experiments: JCJ-L, EL-C. Analyzed the data: JCJ-L, EL-C, SM-S, SM, KHMS, KBS, JDA. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCJ-L, VA, JDA. Wrote the paper: all authors.

8. References

- American Diabetes Association. (2017). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 40(Suppl. 1), S11–S24.
- Arnoldi, A., Boschin, G., Zanoni, C., Lammi, C. (2015). The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins. *Journal of Functional Foods*, 18, 550-563.
- Bognar, E., Sarszegi, Z., Szabo, A., Debreceni, B., Kalman, N., Tucsek, Z., Sumegi, B., Gallyas, F. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264.7 macrophages of malvidin, a major red wine polyphenol. *PLoS One*, 8(6), e65355.
- Boudjou, S., Oomah, B. D., Zaidi, F., Hosseinian, F. (2013). Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1543-1550.
- Cam, A., de Mejia, E. G. (2012). RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- κ B activation in human macrophages through interaction with the α V β 3 integrin. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(10), 1569-1581.
- Cardona, S. M., Garcia, J. A., Cardona, A. E. (2013). The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation and homeostasis. *Methods in Molecular Biology*, 1013, 1–16.
- Chang, I., Cho, N., Kim, S., Kim, J. Y., Kim, E., Woo, J. E., Nam, J. H., Kim, S. J., Lee, M. S. (2004). Role of calcium in pancreatic islet cell death by IFN γ /TNF- α . *Journal of Immunology*, 1, 7008–7014.
- de Mejia, E. G., Dia, V. P. (2009). Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kappaB pathway in the macrophage. *Peptides*, 30(12), 2388-2398.
- Donath, M. Y., Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 11, 98-107.
- Foley, R. C., Jimenez-Lopez, J. C., Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Melsers, S., Singh, K. B. (2015). Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. *BMC Plant Biology*, 15, 106.

- Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A., Ueki, K., Kaneki, M. (2005). A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54(5), 1340-1348.
- Gurzov, E. N., Ortis, F., Cunha, D. A., Gosset, G., Li, M., Cardozo, A. K., Eizirik, D. L. (2009). Signaling by IL-1 β +IFN- γ and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Death Differ*, 16(11), 1539-1550.
- Halban, P. A., Polonsky, K. S., Bowden, D. W., Hawkins, M. A., Ling, C., Mather, K. J., Powers, A. C., Rhodes, C. J., Sussel, L., Weir, G. C. (2014). β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *Diabetes Care*, 37(6), 1751–1758.
- Imai, Y., Dobrian, A. D., Morris, M. A., Nadler, J. L. (2013). Islet inflammation: A unifying target for diabetes treatment?. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(7), 351–360.
- Jimenez-Lopez, J. C., Melser, S., DeBoer, K., Thatcher, L. F., Kamphuis, L. G., Foley, R. C., Singh, K. B. (2016). Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) β 1- and β 6-conglutin proteins exhibit antifungal activity, protecting plants against necrotrophic pathogen induced damage from *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phytophthora nicotianae*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1856.
- Kawaguchi, M., Adachi, M., Oda, N., Kokubu, F., Huang, S.-K. (2004). IL-17 cytokine family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6), 1265-1273.
- Lammi, C., Zanoni, C., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y., Arnoldi, A. (2016). Hypocholesterolaemic Activity of Lupin Peptides: Investigation on the Crosstalk between Human Enterocytes and Hepatocytes Using a Co-Culture System Including Caco-2 and HepG2 Cells. *Nutrients*, 8(7), E437.
- Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, 1(6), a001651.
- Lima-Cabello, E., Alche, V., Foley, R. C., Andrikopoulos, S., Morahan, G., Singh, K. B., Alché, J. D., Jimenez-Lopez, J. C. (2017). Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β -conglutin proteins modulate the insulin signaling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(5).
- Liu, J., Cao, S., Kim, S., Chung, E. I., Homma, Y., Guan, X., Jimenez, V., Ma, X. (2005). Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Current Immunology Reviews*, 1(2), 119–137.
- Malaguti, M., Dinelli, G., Leoncini, E., Bregola, V., Bosi, S., Cicero, A. F. G., Hrelia, S. (2014). Bioactive Peptides in Cereals and Legumes: Agronomical, Biochemical and Clinical Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 21120–21135.
- Marwaha, A. K., Tan, S., Dutz, J. P. (2014). Targeting the IL-17/IFN- γ axis as a potential new clinical therapy for type 1 diabetes. *Clinical Immunology*, 154(1), 84-89.
- McArdle, M. A., Finucane, O. M., Connaughton, R. M., McMorrow, A. M., Roche, H. M. (2013). Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 52.
- McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A., Corbett, J. A. (1996). Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 211(1), 24-32.
- Millán-Linares, M. C., Millán, F., Pedroche, J., Yust, M. M. (2015). GPETAFLR: A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 18, 358-367.

- Millán-Linares, M. C., Yust, M. M., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., Pedroche, J. (2014). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chemistry*, 151, 141-147.
- Montane, J., Cadavez, L., Novials, A. (2014). Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 25–34.
- Muller, W. A. (2013). Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Veterinary Pathology*, 50(1), 7–22.
- Naamane, N., van Helden, J., Eizirik, D. L. (2007). In silico identification of NF-kappaB-regulated genes in pancreatic beta-cells. *BMC Bioinformatics*, 8, 55.
- Ndiaye, F., Vuong, T., Duarte, J., Aluko, R. E., Matar, C. (2012). Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *European Journal of Nutrition*, 51(1), 29-37.
- Ramadan, J. W., Steiner, S. R., Christina, M., O'Neill, C., Nunemaker, S. (2011). The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. *Cell Calcium*, 50(6), 481–490.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 [Updated 2016 Jul 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual [Internet]*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
- Russell, M. A., Morgan, N. G. (2014). The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β -cell. *Islets* 6(3): e950547.
- Salim, T., Sershen, C. L., May, E. E. (2016). Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. *PLoS One*, 11(6), e0153289.
- Sekine, N., Ishikawa, T., Okazaki, T., Hayashi, M., Wollheim, C. B., Fujita, T. (2000). Synergistic activation of NF- κ B and inducible isoform of nitric oxide synthase induction by interferon- γ and tumor necrosis factor- α in INS-1 cells. *Journal of Cellular Physiology*, 184(1), 46–57.
- Tanabe, K., Amo-Shiinoki, K., Hatanaka, M., Tanizawa, Y. (2017). Interorgan Crosstalk Contributing to β -Cell Dysfunction. *Journal of Diabetes Research*, Article ID 3605178.
- Thichanpiang, P., Harper, S. J., Wongprasert, K., Bates, D. O. (2014). TNF- α -induced ICAM-1 expression and monocyte adhesion in human RPE cells is mediated in part through autocrine VEGF stimulation. *Molecular Vision*, 20, 781–789.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(11), 2563-2582.
- Vanbervliet, B., Homey, B., Durand, I., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., et al. (2002). Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *European Journal of Immunology*, 32, 231-242.
- Villarino, C. B., Jayasena, V., Coorey, R., Chakrabarti-Bell, S., Johnson, S. K. (2016). Nutritional, Health, and Technological Functionality of Lupin Flour Addition to Bread and Other Baked Products: Benefits and Challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 835-857.
- Wang, C., Guan, Y., Yang, J. (2010). Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction. *International Journal of Endocrinology*, Article ID 515136.
- Wu, Y., Tian, Z., Wei, H. (2017). Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Frontiers in Immunology*, 8, 930.

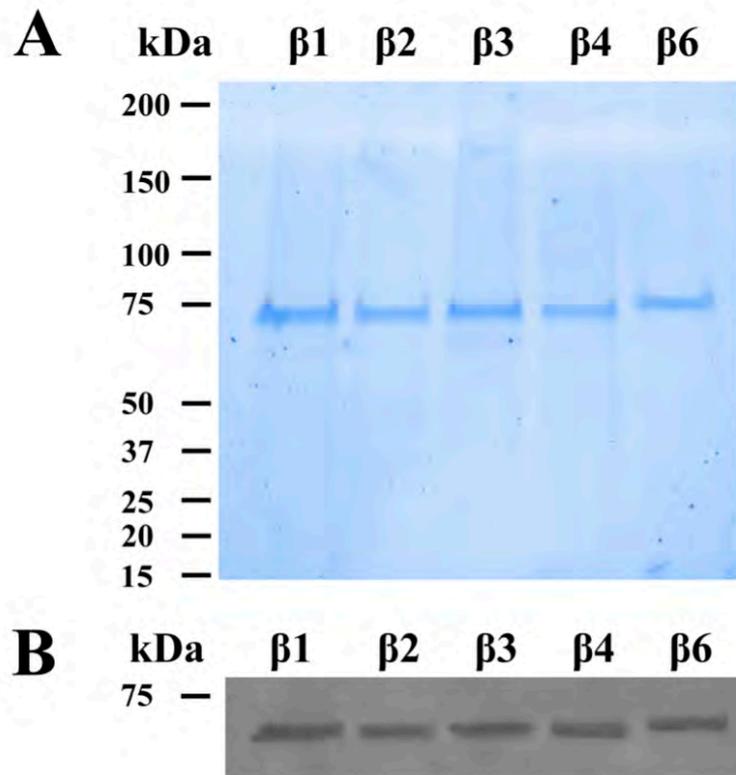


Figure 1

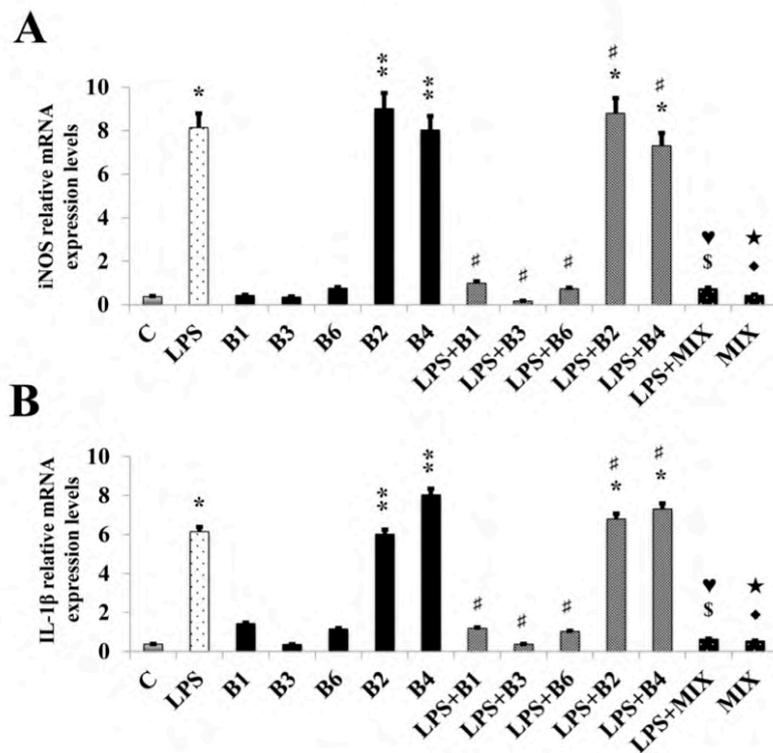


Figure 2

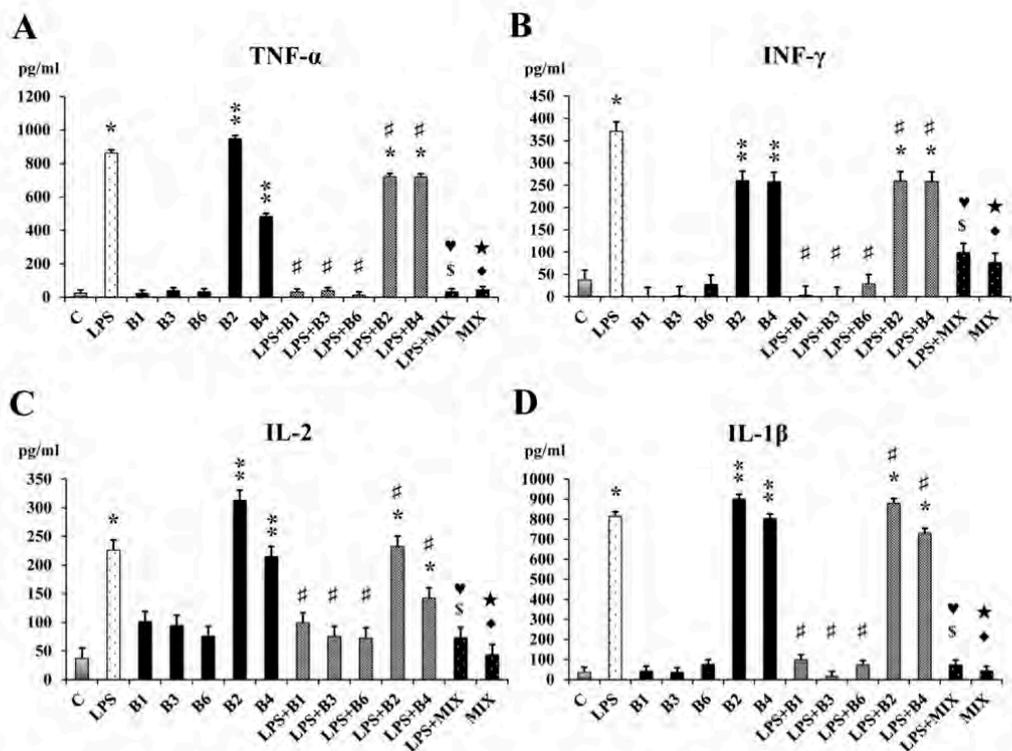


Figure 3

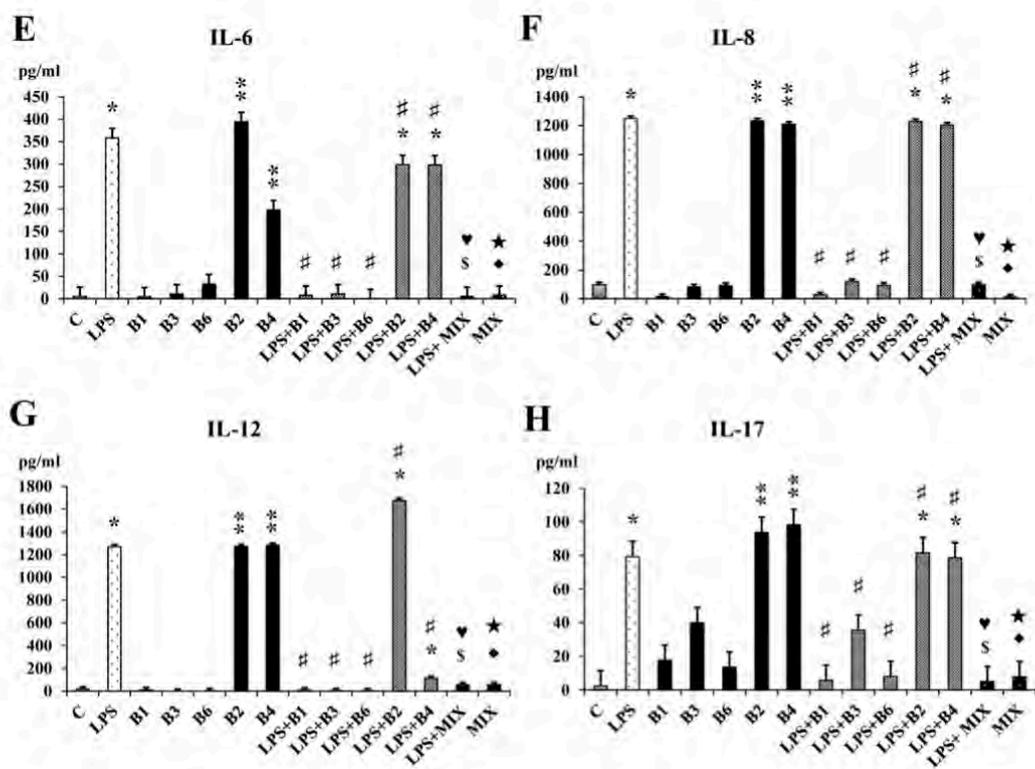


Figure 3 (continued)

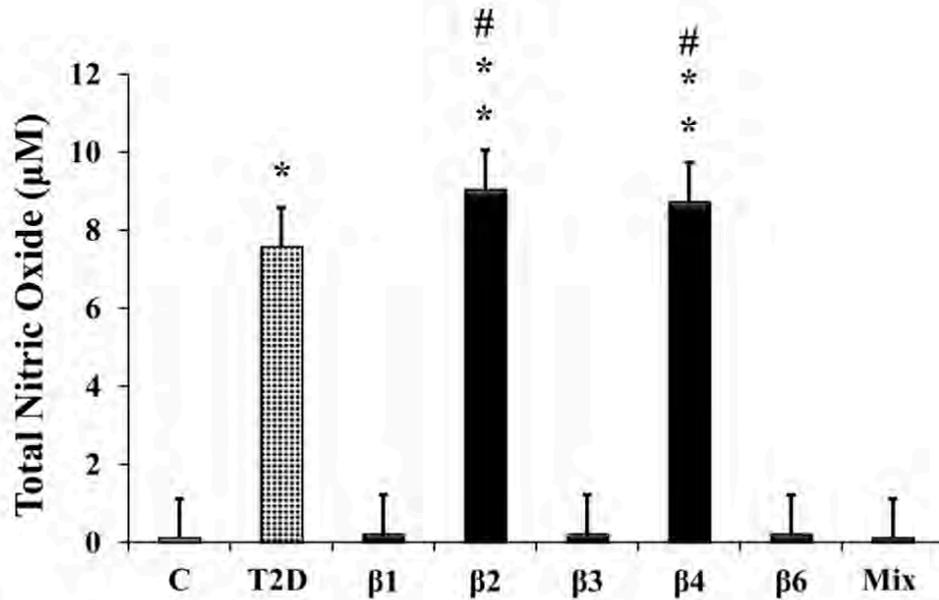


Figure 4

Table 1. Cell viability (%) and dose effects of each purified NLL β-conglutin proteins (β1, β3 β6, β2, and β4).

Cytotoxicity of β1, β3, β6, β2, and β4 on PANC-1-pancreatic cells. Cells were treated with 10µg and 20µg of sample proteins for 24h. Data represent three independent experiments.

Samples	10µg	20µg
Control	100 ± 3.8	100 ± 4.5
β1	102.0 ± 15.8	97.2 ± 1.1
β2	97.0 ± 2.2	98.3 ± 1.5
β3	93.0 ± 3.1	98.0 ± 12.4
β4	103.0 ± 6.2	99.7 ± 2.0
β6	99.0 ± 23.6	104.0 ± 3.1
Mix (β1+β3+β6+β2+β4)	88.8 ± 3.1	100.0 ± 3.4

Table 2. Characteristics of the study groups.

Values represent the median (25th percentile, 75th percentile). To detect differences between groups, we used analysis of variance Significant *P*-values (<0.01) are marked with an asterisk. BMI, body mass index; HbA1c, glycosylated hemoglobin 1c; BPM, beats per minute; T2D, type 2 diabetes.

Patient characteristics	Control group	T2D	<i>P</i> -value
Male	14	14	–
Age	50 (40, 53)	48 (45, 58)	0.007
Fasting glycaemia (mg/dL)	83 (80, 91)	165 (132, 198)	<0.001
Blood pressure (mmHg)	12/7 (11/7, 12/7)	15/8 (14/8, 15/7)	<0.001
BMI (kg/m ²)	24.8 (23.0, 26.6)	33.3 (27.5, 46.7)	<0.001
Heart rate (bpm)	64 (65, 76)	84 (96, 80)	<0.001
HbA1c (%)	5.5 (5.4, 5.7)	6.7 (6.0, 7.4)	<0.001

Table 3. Effect of NLL conglutin proteins β 1, β 3 β 6, β 2, and β 4 on inflammation diabetes-related genes in isolated PBMC of type 2 diabetic patients.

Numbers represent fold-change obtained from qPCR array data analysis of inflammation diabetes-related genes CCL5, IFN- γ , TNF- α , NF- κ B1. Treatments with β 1, β 3, β 6, β 2, and β 4, resulted in a significant up- or down-regulation of these eight pro-inflammatory genes compared to control patients. Data represent three independent experiments. The *p*-value (*P*<0.05) represents statistically significant differences, and they are included in italic.

Gene name	Gene acronym	T2D	β 1	β 3	β 6	β 2	β 4
Chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	23.940 <i>0.031</i>	7.900 <i>0.032</i>	5.940 <i>0.036</i>	3.990 <i>0.035</i>	31.940 <i>0.031</i>	29.970 <i>0.032</i>
Interferon, gamma	IFN γ	2.360 <i>0.018</i>	-3.730 <i>0.017</i>	3.430 <i>0.019</i>	-3.440 <i>0.017</i>	37.70 <i>0.018</i>	29.970 <i>0.019</i>
Tumor necrosis factor	TNF- α	34.390 <i>0.019</i>	5.940 <i>0.018</i>	2.400 <i>0.019</i>	2.710 <i>0.020</i>	32.810 <i>0.019</i>	23.700 <i>0.019</i>
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NF κ B1 (p50)	27.930 <i>0.030</i>	7.370 <i>0.0320</i>	2.950 <i>0.031</i>	1.600 <i>0.032</i>	23.190 <i>0.033</i>	21.940 <i>0.033</i>

SUPPLEMENTARY MATERIAL**Supplementary Table 1. Cell viability (%) and dose effects of each purified NLL β -conglutin protein β 1, β 3 β 6, β 2, and β 4.**

Cytotoxicity of β 1, β 3, β 6, β 2, and β 4 on PANC-1-pancreatic cells. Cells were treated with 10 μ g and 20 μ g of sample proteins for 24h. Data represent three independent experiments.

Samples	10 μ g	20 μ g
LPS	90.1 \pm 15.6	99.0 \pm 1.3
LPS+ β 1	114.0 \pm 3.0	88.0 \pm 0.1
LPS+ β 2	114.0 \pm 0.3	88.0 \pm 2.2
LPS+ β 3	116.0 \pm 5.1	92.0 \pm 1.3
LPS+ β 4	113.0 \pm 1.3	87.0 \pm 0.1
LPS+ β 6	114.0 \pm 3.2	97.2 \pm 3.5
LPS+Mix	117.0 \pm 3.4	116.0 \pm 5.8

Supplementary Table 3. Fold-change in protein levels of pro-inflammatory cytokines.

Numbers represent fold-changes calculated *versus* control from data in Figure 3. Positive values mean gene up-regulation.

Cytokines	LP S	β 2	β 4	β 1+LP S	β 3+LP S	β 6+LP S	β 2+LP S	β 4+LP S	Mix+LP S
TNF- α	36	39	19	1.2	1.5	0.4	29	29	1.2
INF- γ	9	6	6	0	0	0	6	6	1
IL-1 β	21	24	21	2	0.4	1.9	23	28	0.9
IL-2	6	8. 4	5. 7	1.6	2.03	0.9	6.2	3.8	0.9
IL-6	71	78	39	0	1	0	59	59	0
IL-8	12	12	12	0.2	1	0.9	12	12	0
IL-12	70	70	70	0.5	0.2	0.2	94	62	3
IL-17	32	38	40	2	4	3	33	32	1

Supplementary Table 4. Fold-change in protein levels of pro-inflammatory cytokines.

Numbers represent fold-changes calculated *versus* LPS from data in Figure 3. Negative values mean gene down-regulation.

Cytokines	β1+LPS	β3+LPS	β6+LPS	Mix+LPS
TNF- α	-28	-22	-72	-19
INF- γ	-100	-400	-122	-48
IL-1 β	-8	-9	-11	-18
IL-2	-2	-3	-3	-5
IL-6	-49	-33	-2000	-45
IL-8	-45	-10	-13	-1.8
IL-12	-127	-2.54	-338	-21
IL-17	-13	-2	-9	-10

4.3.3 PUBLICACIÓN: Lima-Cabello, E.; Morales-Santana, S.; León, J.; Alché, V.; Clemente, A.; Alché, J.D.; Jimenez Lopez.J.C. (2018). Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β -conglutins reverse back the induced insulin resistance in pancreatic cells. *Food & Function*. 9: 5176-5188. DOI: 10.1039/c8fo01164h.

RESUMEN

La resistencia a insulina (IR) es la causa con mayor contribución al desarrollo de la diabetes de tipo 2. En este estudio, hemos purificado proteínas recombinantes de tipo β -conglutina (r β 1 a r β 4, y r β 6) altramuz de hoja estrecha (NLL) usando cromatografía de afinidad. El objetivo de este estudio fue elucidar la capacidad de esas β -conglutinas de mejorar el estado de IR usando sistemas *ex vivo* e *in vitro* systems. Las proteínas r β 1, r β 3, y r β 6 produjeron niveles inferiores del mediador proinflamatorio óxido nítrico (alrededor de 7 veces en todos los casos), incrementaron los niveles de expresión de los mRNAs de IRS-1 (+201, +173, +192%) y Glut-4 (+286, +121, +147%), incrementaron los niveles de las proteínas p85-PI3K (+188, +187, +137-veces) y Glut-4 (+503, +548, +515-veces), niveles más altos de fosforilación del activador de la ruta de señalización de la insulina p-IRS-1 y de mediadores derivados como p-Akt, p-Cbl, y p-caveolina, así como absorción mejorada de insulina por parte de células cultivadas resistentes a la insulina (IR-C). Las proteínas β -conglutinas fueron capaces de suprimir el estrés oxidativo producido por la resistencia a la insulina en células PANC-1 control (C) reduciendo fuertemente la carbonilación producida por ROS y equilibrando la homeostasis metabólica en las células IR-C a través de la regulación de la expresión de mRNAs. Al mismo tiempo, las β -conglutinas fueron capaces de reducir los niveles del mediador proinflamatorio óxido nítrico y promover la capacidad antioxidante de las células incrementando los niveles de glutatión reducido. Estos resultados sugieren que las β -conglutinas del NLL pueden jugar un papel fundamental como componente alimentario funcional, ya que las propiedades nutracéuticas de las β -conglutinas pueden incrementar la efectividad de las mejoras dietéticas frente a las complicaciones de la diabetes tipo 2.

Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β -conglutins reverse back the induced insulin resistance in pancreatic cells

Elena Lima-Cabello¹, Sonia Morales-Santana², Josefa León³, Victor Alché⁴, Alfonso Clemente⁵, Juan D. Alché¹, Jose C. Jimenez-Lopez^{1,6*}

1- Department of Biochemistry, Cell & Molecular Biology of Plants; Estacion Experimental del Zaidin, Spanish National Research Council (CSIC), Profesor Albareda 1, Granada E-18008, Spain.

2- CIBER of Fragility and Healthy Aging (CIBERFES), Endocrinology Unit, Endocrinology Division, Biomedical Research Institute of Granada – “IBS.Granada”, University Hospital San Cecilio, Dr. Oloriz 16, Granada E-18012, Spain.

3- Clinical Management Unit of Digestive System, San Cecilio University Hospital, Biomedical Research Institute of Granada – “IBS.Granada”, University Hospital San Cecilio, Dr. Oloriz 16, Granada E-18012, Spain.

4- Andalusian Health System, Health Center "Villanueva de las Torres", San Blas, Granada E-18539, Spain.

5- Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition; Estacion Experimental del Zaidin, Spanish National Research Council (CSIC), Camino del Jueves, Granada E-18100, Spain.

6- The UWA Institute of Agriculture and School of Agriculture and Environment; The University of Western Australia, CRAWLEY, WA 6019, Australia.

*Corresponding author: Jose C. Jimenez-Lopez, PhD
josecarlos.jimenez@eez.csic.es

Abstract

Insulin resistance (IR) is the main contributing problem leading to the development of the type 2 diabetes. In this study, we have purified recombinant β -conglutin proteins (r β 1 to r β 4, and r β 6) from narrow-leafed lupin (NLL) by using affinity-chromatography.

The objective of this study was to evaluate the capacity of these β -conglutins to improve IR state using *ex vivo* and in vitro systems. r β 1, r β 3, and r β 6 produced lower levels of pro-inflammatory mediator nitric oxide (~ -7-fold in all cases); up-regulated mRNA expression levels of IRS-1 (+201, +173, +192%) and Glut-4 (+286, +121, +147%); increased levels of p85-PI3K (+188, +187, +137-fold) and Glut-4 (+503, +548, +515-fold) proteins; higher levels of phosphorylation of insulin signalling pathway activator p-IRS-1, and downstream mediators as p-Akt, p-Cbl, and p-Caveolin; as well as improved glucose uptake in insulin resistant (IR-C) culture cells.

β -conglutin proteins were able to suppressing the oxidative stress produced by insulin induced resistance on PANC-1 control (C) cells by strongly reducing proteins oxidative carbonylation induced by ROS, and balancing the metabolic homeostasis in IR-C cells through regulation of mRNA expression. At the same time, β -conglutins are able to reduce the levels of pro-inflammatory mediator nitric oxide; and promoting anti-oxidative capacity of cells by increasing the levels of reduced glutathione.

These results suggest NLL β -conglutins might play a fundamental role as functional food components, since β -conglutins nutraceutical properties could enhance the effectiveness of dietary improvement of type 2 diabetes complications.

Keywords: vicilins, β -conglutins, *Lupinus angustifolius*, nitric oxide, proteins carbonylation, oxidative stress, insulin signalling pathway, diabetes.

Introduction

Diabetes mellitus is the most important disease worldwide after cancer and cardiovascular diseases¹. Lifestyle and diet changes with an excessive caloric food intake are the main factors for the growing incidence of diabetes². The International Diabetes Federation estimated that in 2015, more than 400 million people diagnosed with diabetes worldwide. This number will increase over 600 million by 2040, and people with type 2 diabetes (T2DM) will account for more than 90% of this number (<https://www.idf.org/>).

Development of T2DM is associated with the failure of pancreatic β cells that display the main functions of insulin synthesis and secretion. T2DM courses with insulin resistance (IR), a fundamental aspect associated with severe complications, including cardiovascular disease, retinopathy, nephropathy, and neuropathy. Thus, it is important to prevent and manage T2DM; therefore, an improvement on insulin sensitivity of sensible tissues is an important approach in diabetes prevention³.

Various factors such as glucotoxicity, lipotoxicity, chronic inflammation, endoplasmic reticulum stress, dysregulation of adipokine secretion, and oxidative stress are implicated in the pathogenesis of IR⁴. In this regard, IR induces hyperinsulinemia, and defects in glycogen synthesis that plays an important role in glucose homeostasis, and a significant decrease in glycogenesis⁵.

Therefore, at molecular level, phosphorylation of key proteins in the insulin signalling pathway affecting negatively or positively downstream effectors, e.g. serine or tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate isoform 1 (IRS-1) is a crucial mediating mechanism for IR development⁶. IRS-1 tyrosine and Akt phosphorylation represent an insulin sensitization mechanism in insulin-resistant cells⁷. Furthermore, enhancing the phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160), increase the migration of glucose transporter-4 (GLUT-4) and the glucose uptake of insulin-resistant cells in the absence of insulin⁸, suggesting that they can be substitute for insulin to promote glucose clearance.

Pancreatic islets β cells may easily suffer from oxidative stress leading to IR. Elevated plasma free fatty acid (FFA) and glucose levels play a key role in the development of IR, since these metabolites are accompanied with excessive generation of reactive oxygen species (ROS) and increased lipid accumulation⁹. In this regard, high levels of ROS are an important trigger of IR, and contribute to the onset and development of T2DM, and ROS levels are negatively correlated with insulin sensitivity¹⁰. Thus, reduction of ROS level would be an important contributor for the improvement of IR, as another effective approach in the management of IR and T2DM¹¹.

Thus, interest in searching for effective therapeutic strategies to tackle this problem has increased worldwide. Food bioactive compounds that can treat IR or provoke insulin-independent glucose disposal should be helpful in preventing β -cell damage, and managing T2DM and related disorders. Sweet lupin seed bioactive components as fibre, polyphenols, digestible carbohydrates, and storage proteins as globulins, have displayed different health benefits, particularly in the area of dyslipidaemia, hyperglycaemia and T2DM, and hypertension prevention^{12,13,14}. However, the mechanism/s at how these lupin seed compounds, and particularly specific proteins, improve inflammatory-related diseases remains to be elucidated.

In the present study, we used human pancreatic PANC-1 cells as a model of induced IR aimed to validate the ability of IR improvement by narrow-leafed lupin (NLL) β -conglutins by activation of insulin signalling pathway genes expression up-regulation and key proteins phosphorylation, anti-oxidative enzymes improvement and ROS production reduction, as well as T2DM metabolic makers improvement.

Material and Methods

Expression of genetic constructs

Bacterial β -conglutins expression were developed using the pET28a(+) vector containing each individual β -conglutinin isoform β 1, β 2, β 3, β 4, and β 6 (GenBank accession number HQ670409, HQ670410, HQ670411, HQ670412, and HQ670414, respectively), linked to 6xHis-Tag.

Proteins expression and purification

Proteins were expressed in Rosetta™ 2(DE3) pLysS Singles™ Competent Cells (Novagen) following the method developed by Jimenez-Lopez *et al.* (2016)¹⁵.

Bacterial pellets were used for recombinant conglutinin isoforms β 1, β 2, β 3, β 4, and β 6 purification. The purity of the protein samples was >95% and typical yields were ~5–25 mg/mL. Purified β -conglutinin proteins concentration was estimated using Pierce Coomassie (Bradford, Bio-Rad, USA) Protein Assay Kit (Thermo Fisher, USA).

β -conglutinin antibody production

The polyclonal antiserum production was performed in rabbit by using a synthetic peptide as an immunization epitope that is commonly shared in the five NLL β -conglutinin protein isoforms (Agrisera, Sweden). The antibody was affinity-purified being total IgG quantified by ELISA.

Cell culture

Human pancreatic PANC-1 cells were supplied by the Cell Bank of the University of Granada (CIC-UGR, Granada, Spain). PANC-1 cells were grown in poly-L-lysine-coated flasks (~2.0–2.5 × 10⁶ cells/mL) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine and 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 37 °C under 5% CO₂ in humidified air. Cells were grown as monolayers and detached from cultures by trypsinization, and frequently sub-cultured to be used in the exponential growth phase for all experiments. Cells were washed twice with phosphate-buffered solution (PBS, Sigma) and treated with 0.25% tryp-EDTA (Lonza, Switzerland) for 10 min under 5% CO₂ in humidified air at 37 °C. The trypsinization effect was neutralized with culture medium. The cells were collected after centrifugation at 1000 ×g for 5 min and washed with PBS for viability assays. Cell counting and viability were checked using a Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher, USA) at the beginning and the end of each experiment using representative wells. Cell viability was monitored as > 95%.

MTT assay for cell viability

Assays of cell viability were performed by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) according to Riss *et al.* (2016)¹⁶. Briefly, PANC-1 cells were seeded in 96-well plates in the normal culture medium: 1 × 10³ cells in 100 μ L of medium per well in 200 μ L of DMEM with FBS and antibiotics. After overnight incubation, cells were treated with LPS alone, or each of the β 1, β 2, β 3 β 4, and β 6 purified protein alone or as a mix at indicated doses in two replicates. After the treatments, the cells were three times washed with PBS avoiding any interference of the phenolic compounds with the MTT. 200 μ L of free red-phenol DMEM containing 1 mg/mL of MTT was added, and the cells incubated for 3 h. Viable cells with active metabolism convert MTT into formazone crystals (purple colour), which was solubilized with 200 μ L of DMSO, and the absorbance measured at test (570 nm) and reference (690 nm) wavelengths using a microplate reader (iMark microplate reader, Bio-Rad, USA).

Insulin resistance PANC-1 cell model and Glucose uptake

PANC-1 control cells (C) were seeded in 96-well microtiter plates in DMEM supplemented

with 10% (v/v) FBS, under standard cell culture conditions (humidified atmosphere, 5% CO₂ and 37°C), at a density of 2×10^4 cells/mL in 200 mL of growth media. The following protocol was used to determine the optimal dose of insulin and treatment duration required to establish insulin-resistant IR_PANC-1 (IR-C) cells.

The cells were divided into two groups with six replicates per group: 1) the cells were cultured in 200 μ L complete medium (group named C); 2) insulin-treated cells between 3×10^{-5} and 3×10^{-9} nmol/L when the cells become adherent (IR-C). The cells were then cultured for 24, 48 and 72 h. Following the defined culture periods, the glucose concentration in the culture media was detected using the glucose oxidase method, according to the manufacturer's guideline (Abcam, UK). Insulin resistant PANC-1 cell culture (IR-C) were established for insulin concentration 3×10^{-7} nmol/L cultured during 24h, and with the lower amount of glucose uptake¹⁷. At this state, we consider that cells are insulin sensitive or insensitive to determine whether β -conglutin proteins can improve insulin-dependent glucose uptake capacity of the cells.

Using IR-C epithelial cells, these cells were divided into seven groups, each with six replicates: The control group (C), 200 μ L normal medium; the model group, IR-C; and the IR-C β -conglutin groups (β 1, β 3, β 6, β 2, β 4 treated with 5 μ g of protein, respectively). After 24h of culture, 2 μ L of supernatant was collected from each sample. Glucose concentration was detected as above. IR-C cells were cultured to 80% confluence and then treated with β 1, β 2, β 3 β 4, or β 6 purified proteins for 24 h. 5 μ g of each purified conglutin was added to cultures. After the treatments, cells were harvested for further analyses.

Quantitative real-time PCR

Real-time quantitative PCR technology was used to assay IRS-1, GLUT-4 mRNAs expression from each experimental group. Total RNA was isolated from C cells using the RNeasy Tissue RNA isolation kit (Qiagen, Germany). First strand cDNA was synthesized using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, USA). For gene expression assays, cDNA was prepared, diluted and subjected to real-time polymerase chain reaction (PCR), amplified using TaqMan technology (LightCycler 480 quantitative PCR System, Roche, Switzerland). Primers and probes were used from the commercially available TaqMan Gene Expression Assays (GenBank accession no: NM_005544.2, Assay ID: Hs00178563_m1; GenBank accession n°: NM_001042.2, Assay ID: Hs00168966_m1, respectively). Relative changes in gene expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The cycle number at which the transcripts were detectable (CT) was normalized to the cycle number of β -Actin (GenBank accession n°: NM_001101.3, Assay ID: Hs99999903_m1, Applied Biosystems, used as the housekeeping gene) detection, referred to as ΔC_t , where the relative mRNA levels were presented as unit values of $2^{\Delta C_t}$ [C_t (β -Actin)– C_t (gene of interest)], having C_t as the threshold cycle value defined as the fractional cycle number at which the target fluorescent signal passes a fixed threshold above baseline. PCR efficiency was determined by TaqMan analysis on a standard curve for targets and endogenous control amplifications, which were highly similar.

Immunoblotting phosphorylation analysis of IRS-1 and downstream effectors in IR-C cells

After treatments, IR-C cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in ice-cold RIPA buffer for 1 h, supplemented with a 1/100 dilution of protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma, USA). After centrifugation at $12,000 \times g$ at 4 °C for 30 min, the supernatant was stored at –80 °C until use. Proteins levels, including Glut-4 transporter, IRS-1, phospho-IRS-1 (Tyr612), p85-PI3K, Akt, phospho-Akt (Ser473), phospho-caveolin-1 (Tyr14), and phospho-CBL (Tyr700) (Santa Cruz, USA), were detected and evaluated by Western blot with primary antibodies. Briefly, equal amounts of protein samples were separated by 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride

(PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) on a wet transfer apparatus (Bio-Rad, USA). The PVDF membranes were blocked with 5% non-fat dry milk or bovine serum albumin in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 2 h, and then incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Immunoblots were washed three times (each for 5 min with TBS-T), followed by 1 h incubation in peroxidase conjugated secondary antibody at room temperature. After washing the membrane four times (10 min) with 15 mL of TBS-T buffer, the membranes were developed by Western Lightning™ Plus-ECL (Perkin Elmer Life Sciences, USA). The blots were monitored by a luminescent image analyser (LAS-3000, Fujifilm, Minato, Tokyo, Japan) to acquire the data for further analysis and comparison.

Antioxidant Enzymatic Activities Assays

After 24h-incubation, the treated culture media was removed and cells washed with 4°C phosphate buffered solution (PBS, Sigma, USA). C, and IR-C cells, and IR-C cells challenged with different β -conglutin isoforms cells were collected for the GSH, SOD and Catalase activity (Canvax, Spain), following manufacturer's instructions. Data were statistically analysed by the t-test.

Participant information

Fourteen type 2 diabetic patients and fourteen healthy control subjects were involved for this study. The subjects were unrelated and diagnosed from the coverage area of the 'Pedro Martínez' hospital (A.G.S. North East Granada, Spain). All study procedures were performed using samples and protocols previously approved by the ethics committee of 'Pedro Martínez' hospital (A.G.S. North East Granada, Spain). Medical staff of the 'Pedro Martínez' hospital (A.G.S. North East Granada, Spain) involved in this study obtained the full written and informed consent for the procedures from all participants of this study.

The whole study was developed according to the international declarations in research ethics:

(1) The Declaration of Helsinki (DoH, Edinburgh 2000), ethical guidelines for physicians and other participants in medical research of the World Medicine Association (WMA, www.wma.net).

(2) Council of Europe Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine (Oviedo 1997, www.coe.int).

(3) Universal Declaration on Bioethics and Human Rights adopted by UNESCO's General Conference on 19 October 2005 (www.unesco.org).

(4) CIOMS/WHO International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects (1993, reviewed in 2001, www.cioms.ch).

Moreover, this study was developed according to the Spanish research and ethics laws:

1) LAW 14/2007, of 3rd July on Biomedical Research.

2) ROYAL DECREE 65/2006, of 30 January on setting requirements to import and export biological samples (when applicable).

3) ROYAL DECREE 1301/2006, of 10 November, on setting quality and security standards to donate, obtain, evaluate, process, preserve, store and distribute human cells and tissues, and approving the managing regulation for using them in humans.

4) ORDER of 14 April 2000, adapting the annexes of the Royal Decree 2043/1994 of 14th October as regards inspection and verification of good laboratory practices, to the technical progress.

T2DM group includes patients that were screened and diagnosed according to the American Diabetes Association guidelines¹⁸. Furthermore, anthropometric data were collected; i) Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters; ii) Blood pressure and heart rate were measured in a standardized manner. After

subjects remained resting for a period of time at least of 5 min, blood pressure and heart rate were measured twice using a standard mercury sphygmomanometer and a heart rate monitor with a wrist receiver, respectively. In both cases, the mean of the two values was used for analysis; iii) We obtained samples of venous blood collected from the cubital vein in 4 mL lithium–heparin tubes; iv) Biochemical parameters were obtained. Fasting plasma glucose was measured by standard biochemical methods, where fasting can be defined as no caloric intake for at least 12 h; v) Glycated haemoglobin (HbA1c) was measured using standard automated laboratory techniques, by high-performance liquid chromatography.

When calling patients diagnosed with T2DM for blood samples extraction, these receiving treatment for T2DM, e.g. metformin, sulfonylureas, thiazolidinedione or other medications that might affect inflammation process were excluded from this study.

Whole blood Culture

Venous blood was drawn into lithium–heparin tubes (BD Vacutainer System, Germany) in the morning. Participants were fasted for 12 hours before blood collection (Fasting consisted in no food or drink intake but water). Within 3 h, whole unseparated blood was diluted 1:3 with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and HEPES 2.4%; (Invitrogen, Germany), and agitated gently in 50mL tubes (Greiner Bio-one, Germany); aliquots (1mL) were seeded in 24-well plates (Nunc, VWR International GmbH, Germany) and cultured for 24 h at 37°C under 5% CO₂ in humidified air. Assays were performed for each blood included positive and negative controls, and separate cultures challenged with 15 µg of each purified β-conglutin (β1, β2, β3, β4, β6, respectively). After treatments, blood samples were centrifuged at 700 g for 5 min at 20°C; obtained supernatants were aliquoted and stored at -20°C until further analysis.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized blood by density-gradient centrifugation on Histopaque 1077 (Sigma, USA), washed three times in Hanks' balanced salt solution (Life Technologies, USA), and re-suspended in complete medium consisting of RPMI 1640 (Sigma, USA) supplemented with penicillin, streptomycin and L-glutamine (100 U/mL, 100 µg/mL, and 2 mM, respectively) (Sigma, USA).

Polymerase chain reaction (PCR) array for diabetes-inflammatory response

Total RNA was extracted from isolated PBMC of type 2 diabetic patients using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). 2 µg total RNA was converted to complementary DNA (cDNA) using an RT2 First-Strand kit (Qiagen, Germany). The resulting cDNA was mixed with RT2 SYBR Green qPCR (Qiagen, Germany) and aliquoted into a commercially available diabetes-obesity and inflammation pathway-specific real-time RT2 Profiler PCR Array (PAHS-023Z, Qiagen, Germany). Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using a Light Cycler 480 (Roche, Switzerland), where samples were run as duplicates for 40 cycles: 1 cycle of 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 40 cycles of 60 °C for 1 min. Cycle thresh-olds were measured, and the relative expression of genes calculated by comparing Ct values. The difference in gene expression was evaluated by calculating the fold-change in expression levels based on at least a 2-fold up or down change in comparison or the gene expression levels of the control group. All gene expression levels were normalized to the housekeeping genes – β-Actin, hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1, β-2-microglobulin, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - which did not vary significantly between the study groups.

Determination of intracellular ROS (Oxyblot assay) and nitric oxide

Proteins were extracted from control C and IR-C cell cultures that were/were not treated with individual β-conglutin isoforms, following either control or treatments company instructions (EMD Millipore, USA). 25 µg of total proteins were loaded onto 12% polyacrylamide gels for protein separation. Proteins separated by SDS-PAGE were electrotransferred to PVDF

membranes. The OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (EMD Millipore, USA) was used according to the manufacturer's instructions for immunoblot detection of carbonyl groups introduced into proteins by reaction with ROS. Measurements were made at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

The total amount of NO production including nitrite/nitrate contents from cultured C cell samples and IR-C cells before and after β -conglutin proteins challenges were measured using a commercial assay kit ab65328 (Abcam, UK). Briefly, samples from all experimental groups were deproteinized according to the manufacturer's instructions. An equal amount (30 μ L) of samples and standards were loaded into 96-well microtiter plates. Nitrate reductase, enzyme cofactor, and assay buffer was added, followed by 1 h incubation at room temperature by Enhancer, Griess Reagent R1 and Griess Reagent R2. Immediately after incubation, measurements at 540 nm were carried out in a microplate reader (iMark Bio-Rad, USA), and the value of the blank control (medium without cells) was subtracted. Total nitrite/nitrate concentrations were calculated by using a standard curve.

Statistics

Values from all assays were carried out in triplicate and data were shown as means \pm standard deviations (SEM). Statistical significant differences ($p < 0.05$) of the data were assessed using SPSS software by analysis of variance followed by Dunnett analysis.

Results and Discussion

Purification of β -conglutin isoforms

Purification of β -conglutins was accomplished according to the methodology of Jimenez-Lopez *et al.* (2016)¹⁵. Protein elution was performed by using an imidazole linear gradient (0–300 mM). SDS–PAGE analyses of the eluted fractions displayed a single protein band of \sim 69 kDa (Suppl. Fig. S1). Purified recombinant β -conglutins exhibited a level of purity $>$ 95%, and a concentration of 5–25 mg/mL. Analysis by immunoblotting using the anti- β -conglutin protein antibody confirmed the identity of the recombinant proteins (Suppl. Fig. S1).

β -conglutins do not affect the cellular viability of PANC-1 pancreatic cells

Before assessing the IR improvement activity of β -conglutin proteins, we evaluated their effect on cell viability and potential cytotoxicity. To investigate whether β -conglutin isoforms could have a cytotoxic effect, an MTT assay was performed on insulin induced-resistance IR-C cells after separately adding each β -conglutin isoform protein, as well as a mix of the five β -conglutins for 24 h. Neither individual β -conglutins nor the mix of β -conglutins had significant effect on cell viability (Suppl. Table S1), when compared to the unchallenged IR-C group. The addition of insulin in the absence of β -conglutin was used as a positive control.

To complete the feasibility studies of the β -conglutins, cell viability was assayed using trypan blue exclusion in IR-C pancreatic cells treated either with increasing concentrations of each β -conglutin, or the mix of conglutins, for a 24 h period. As expected, there were no differences in cell viability after 24 h of incubation in the presence of higher concentrations of each β -conglutin, or in the mix of β -conglutins containing 5 or 10 μ g when compared to the control (Suppl. Table S1).

These results suggest that either individual β -conglutin proteins or the mix of isoforms do not compromise the integrity of IR-C pancreatic cells. Moreover, cell viability did not differ significantly from the control assays upon exposure to higher concentrations of β -conglutins.

Participant information

The clinical parameters of the population studied are summarized in Suppl. Table S2. As expected, the T2DM patients showed classical parameters for BMI, and in values of fasting glycaemia ($p < 0.002$), blood pressure ($p < 0.0025$), heart rate ($p < 0.001$), and HbA1c ($p < 0.001$), when compared to the control study group of healthy volunteers.

Insulin induced resistance IR-C cell model

IR plays a key role in the development of inflammatory-related pathologies such as T2DM and obesity¹⁹. Furthermore, IR derives in several metabolic disorders including hyperglycaemia, hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia²⁰. Thus, the alleviation of IR by NLL seed proteins as β -conglutins may contribute to the inhibition of these disorders.

In order to establish an *in vitro* insulin resistant model of pancreatic cells and evaluate the effects of different insulin concentrations on glucose metabolism in the cell model, C cells were incubated with insulin in a concentration range between 5×10^{-5} and 5×10^{-9} nmol/L to build an insulin-resistant cell (IR-C) model (Suppl. Fig. S2). The cells were stimulated with fresh insulin for 24 h, and the glucose uptake of these cells was analysed. As shown in Suppl. Fig. S2A, following 3×10^{-7} nmol/L insulin incubation of C cells, there was the most significant decrease in the consumption of extracellular glucose ($P < 0.05$) compared with control without insulin pre-treatment. In Suppl. Fig. S2B, the addition of 3×10^{-7} nmol/L insulin to C cells induced a time-dependent decrease ($P < 0.05$) in the glucose consumption in the period 24-48 h compared to C cells without insulin pre-treatment. These results showed that IR-C cells have maintained the state of insulin-resistant in a period of 48 h after insulin incubation. After that, cells are acquiring a normal condition as C cells, which is consistent with the increasing glucose uptake showed after 72h in Suppl. Fig. S2B and where non-significant differences in glucose consumption were displayed compared to C cells without insulin pre-treatment.

β -conglutins increase glucose uptake and insulin signalling pathway genes expression in IR-C cells

IR is observed in a wide variety of pathophysiological states and it is a key cause of diabetes and pre-diabetes status²¹. Improving IR is the main approach to prevent and treat diabetes. Hyperglycaemia and hyperinsulinemia result from IR, which may affect different insulin target organs, e.g. liver and skeletal muscle²². The alleviation of IR by NLL seed proteins as β -conglutins may contribute to the inhibition of insulin dependent organs to improve the T2DM state. However, the molecular mechanisms underlying the effects leading glucose homeostasis and IR are still unclear.

The different NLL β -conglutins might play an important role on glucose homeostasis. The treatment of pancreatic insulin induced resistance IR-C cells with β -conglutins were performed to determine their effects on GLUT-4 mRNA level and increasing total GLUT4 protein for potential improvement of glucose uptake in IR_PANC-1. We have demonstrated that treatment with conglutin proteins β 1, β 3 and β 6, induced glucose uptake by IR-C cells showing comparable results since increasing β -conglutin quantity treatment resulted in an incensement of the glucose uptake in IR-C cells, particularly until 5 μ g of proteins, which induced a glucose uptake of 60% in comparison to IR-C cells ($p < 0.05$) (Fig. 1). A small decrease was displayed when β -conglutin proteins (10 μ g) was added to the cell culture.

A similar effect was showed between members of the other β -conglutins group. On the contrary to what happened to β 1, β 3, and β 6, treatment with conglutins β 2 and β 4 maintained glucose uptake at comparable levels than IR-C cells (without β -conglutin proteins challenge).

Therefore, the analysis of key genes in the insulin signalling pathway as IRS-1 and GLUT-4 has showed the up-regulation of the expression for these genes. The increased expression of IRS-1 and GLUT-4 was achieved when conglutin β 1, β 3 and β 6 were incubated with IR-C cells

(IRS-1: +201%, +173%, and +192%; GLUT-4: +268%, +121%, and +147%, respectively) ($p < 0.05$) (Fig. 2A). Furthermore, IRS-1 and GLUT-4 mRNA expression did not increase in IR_PANC-1, being at similar levels to control when cell culture was challenged with conglutin $\beta 2$ and $\beta 4$ (Fig. 2B). In this regard, protein synthesis of p85-PI3K and GLUT-4 increased when $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 6$ challenged the IR-C cell culture (p85-PI3K: +188%, +187%, and +137%; GLUT-4: +503%, +548%, and +515%, respectively) ($p < 0.05$), in comparison to C cells. No significant differences in total GLUT4 protein expression were observed between IR-C cell culture when challenged with $\beta 2$, and $\beta 4$.

These findings suggest that β -conglutin proteins would be able to significantly reduce blood glucose level by promoting glucose uptake by cells and alleviating hyperglycaemia via increasing GLUT-1 concentration. In this regard, improving IR is also achieved through up-regulation of IRS-1 may mediate the activation of the insulin signalling pathway leading to decreasing blood glucose by cells glucose uptake²³. Furthermore, glucose uptake is mediated by the recruitment of glucose receptor GLUT4 to the plasma membrane. At the cellular level, the ability to uptake glucose is determined by controlling the amount of the GLUT4 glucose transporter present in the plasma membrane. At molecular level, increased expression of GLUT-4 may increase glucose uptake, together with an increasing trend of insulin signalling key proteins phosphorylation²⁴.

Conglutin $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 6$ increased the phosphorylation of IRS-1 and downstream effectors

Chronic insulin treatment or IR usually results in the reduction of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor⁷. Insulin-resistant target cells exhibit impaired insulin-stimulated glucose uptake and defective insulin signal transduction²⁵. The Ser/Thr phosphorylation of insulin receptor and substrates IRS proteins are considered to be a molecular basis for IR. The insulin receptor is a tyrosine kinase that undergoes ligand-stimulated auto-phosphorylation and activation of its intrinsic substrate kinase activity. Once activated, the receptor phosphorylates intracellular substrates on tyrosine, including members of the insulin receptor substrate family (IRS1/2/3/4), and downstream effectors as Cbl or APS²⁶. The insulin receptor-dependent tyrosine phosphorylation of both IRS1 and IRS2 are critical in maintaining proper glucose homeostasis through its interaction with the PI3K²⁷. This interaction appears to serve a dual function by stimulating PI3K activity and targeting the enzyme to a critical intracellular site²⁸.

We treated the IR-C cells with β -conglutin proteins to investigate the molecular mechanism by which these proteins improve insulin sensitivity. Thus, we studied the effects of β -conglutins on insulin signalling pathway in C cells at basal level or after insulin induced resistance IR-C cells. As shown in Fig. 3A, basal phosphorylation of Akt at serine 473 and IRS-1 at tyrosine 612 in C and IR-C cells were analysed after β -conglutin treatments. Furthermore, after conglutin $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 6$ challenges elevated Akt and IRS-1 phosphorylation in IR-C (Fig. 3A and Fig. 3B), were the p-IRS1/IRS1 and pAkt1/Akt1 were increased (+250, +283, +275-fold; and +315, +396, +303-fold, respectively). In addition to increasing levels of IRS-1 phosphorylation, we also found that mRNA expression level of IRS-1, and IRS-2 were up-regulated when T2DM blood culture were challenged with $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$ -conglutins in comparison to control (T2DM blood untreated) (Table 1), as well as down-regulation of the mRNA expression level of protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (PTPN1), a protein that can dephosphorylate the phospho-tyrosine residues of the activated insulin receptor kinase, thus inhibition of the PTPN1 increase insulin sensitivity by preventing inhibition of IRS-1 dephosphorylation (Table 1). These results show that using NLL β -conglutins improves the insulin signalling in insulin induced resistant cells, which also could improve IR state. The translocation of GLUT4 is predominantly mediated through the insulin-dependent p85-

PI3K/AKT/GLUT4 signal pathway to form glycogen storages²⁹, which involves several pivotal genes, such as PKB, p85-PI3K, IRS-1, and insulin receptor (IR). When insulin binds to IR induces tyrosine phosphorylation of IR and IRS-1, which subsequently activate and phosphorylate IRS-1, p85-PI3K, AKT and PKB/AKT2, and induce GLUT4 translocation³⁰. Thus, the activation of IRS-1, p85-PI3K and AKT could be direct evidence to demonstrate the specific effects of NLL β -conglutin proteins only on the insulin-dependent pathway. Our results showed increased tyrosine phosphorylation of IRS-1, which could reduce glucose level (increase glucose uptake) and IR in hyperglycaemic and T2DM state⁷, in agreement with the IRS-1 and GLUT-4 mRNA increased expression (Fig. 2A), and p85-PI3K and GLUT-4 proteins synthesis (Fig. 2B). In addition, we also found increased levels (up-regulation) of PKB after T2BM blood culture treated with β 1, β 3, and β 6 (Suppl. Table S3). It has been proven that hyperglycaemia and IR is caused via inhibition of p85-PI3K phosphorylation³⁰. Consequently, phosphorylation of IR, IRS-1, p85-PI3K, and PKB is essential for GLUT4 translocation and anti-hyperglycaemia. In the current study, we have shown increasing phosphorylation of proteins IRS-1, and Akt [IRS-1(Tyr612), and Akt (Ser473)] up-regulated by NLL conglutins β 1, β 3, and β 6 treatment in insulin induced resistant IR-C cells (Fig. 3). Moreover, NLL β -conglutins also increased IRS-1, and GLUT-4 mRNA and p85 and GLUT4 proteins expression levels (Fig. 2A). These findings demonstrated that NLL β -conglutins may enhance GLUT4 translocation via increasing the phosphorylated proteins in the PKB/GLUT4 pathway, as well as the up-regulation of IRS-1 and GLUT-4 genes' expression at the transcriptional level and corresponding proteins synthesis in insulin resistant IR-C.

In addition to the p85-PI3K activation through IRS-1 phosphorylation (a p85-PI3K-independent pathway), recent data suggest that a second requisite pathway might involve tyrosine phosphorylation events that are restricted to subdomains of the plasma membrane³⁰. We have investigated the role of Cbl and caveolin proteins phosphorylation in facilitating GLUT4 translocation to the membrane and glucose uptake. The tyrosine phosphorylation of Cbl results in caveolin-enriched, lipid raft subdomains of the plasma membrane³¹, and is required to promote the GLUT4 translocation to the plasma membrane. In this regard, lipid raft subdomains have been implicated as sites for signal initiation through helping in formation of caveolae, a subset of lipid raft microdomains. These small invaginations of the plasma membrane are often enriched in signalling molecules, glycolipids, and cholesterol and have been proposed to act as signalling organelles³².

In the present study, our data presented in Fig. 3C and 3D show that conglutin β 1, β 3, and β 6 maximally phosphorylate Cbl (Tyr700) and caveolin-1 (Tyr14). Differences among control and these isoforms of β -conglutin treated cells in Cbl and caveolin-1 phosphorylation level were significant ($p < 0.03$). Although the precise function of lipid raft subdomains in assembling this signalling complex remains uncertain, resident structural proteins may play an important role. One such protein is caveolin-1 that is known to undergo tyrosine phosphorylation³³, and when Cbl is phosphorylated, a Cbl-CAP complex is recruited to lipid rafts through the interaction of CAP with flotillin³⁴. In addition, the caveolin family of proteins appears to play a particularly important role in the formation of caveolae and possibly in signalling activities that occur in these microdomains. Caveolin interacts with a number of signalling molecules that are thought to be enriched in caveolae, including a subset of tyrosine kinase receptors as the insulin receptor³⁴. Caveolin is also known to undergo tyrosine phosphorylation although this phosphorylation correlates with metabolic responsiveness to insulin. In addition, previous studies strongly support a direct insulin receptor-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin on Tyr14 of the protein, which does not require the activation of PI3K or MAPK and is independent of the phosphorylation and translocation of Cbl to the lipid raft microdomains³³. A possibility remains that the tyrosine phosphorylation of caveolin by the insulin receptor is merely a result of the interaction of these two molecules and, further, that the binding of

caveolin to the receptor helps to recruit the latter protein to caveolae, where it initiates the CAP/Cbl signalling pathway³⁵. The investigation of this possibility will be the subject of a further work.

This data collectively suggested that NLL β -conglutins i) promote the phosphorylation of p-85-PI3K through activation of IRS-1 by phosphorylated IRS-1, beside to an increases in their mRNA expression ($p < 0.05$); ii) activated the downstream proteins of SOCS3 such as Akt, and could increase the insulin sensitivity by regulating Akt; GLUT4 translocation to the plasma membrane was regulated by iii) its major upstream regulators, via promoting the phosphorylation of IRS-1, Akt, and p85-PI3K; and iv) promoting the phosphorylation of Cbl and caveolin proteins that recruit main activators protein complexes to lipid rafts and caveolae formation. β -conglutin proteins are a potential biochemical composition from the legume NLL to promote glucose uptake and glycaemic control.

Effects of β -conglutin proteins on the metabolism and signalling pathways

A main thing for the IR state is the uncontrolled balance of the glucose metabolism. In this state, glucose uptake to be used in target tissues is deeply decreased because down-regulation of GLUT-4 transporter in T2DM subjects³⁶. In addition, glucose metabolism key enzymes expressions are also dysregulated, e.g. hexokinase or glucose kinase, glucose 1,6 phosphatase and glucose 6-phosphatase, controlling the direction of glycolysis and gluconeogenesis direction³⁷.

In the current study, we have found that particular β -conglutin isoforms are able to regulate the expression of key enzymes of the glucose metabolism (Fig.1) that may favour increase glucose utilization and degradation instead of gluconeogenic pathway and to activate the metabolism of isolated PBMC from type 2 diabetic patients' blood. Hexokinase (GK) mRNA level was only affected by $\beta 1$ treatment (lowered the value) in PBMC samples compared to control group (without β -conglutin proteins challenges), which may help to use glucose in the degradative catabolic pathway (glycolysis instead to the pentose phosphate pathway). The same effect is favoured by the decreasing levels of glucose 6-phosphate dehydrogenase when T2DM blood samples were challenged with $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$ -conglutins. Glucose catabolism may be favoured also by decreasing levels of glucose 6-phosphatase (G6Pase), G6Pase catalytic subunit, and mRNA up-regulated levels of fructose 1,6- biphosphatase (F1,6BPase) in T2DM blood treated with $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$ (Table 1). G6Pase catalyse enzymatic reaction that is included in the gluconeogenesis reactions, and confers the capacity to release glucose into the blood³⁸. In the present study, simultaneous lowering expression of enzymes that decreased glucose generation (GP and G6Pase) and increase in those involved in glucose utilization (HK) increased glucose utilization, causing improvements in hyperglycaemia (reduction of blood glucose) and IR (insulin sensitivity) in T2DM culture cells.

At the same time, glucose homeostasis is controlled not only by glucose catabolism but also by glycogen synthesis through balancing insulin/glucagon levels. Increasing mRNA levels of glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) by $\beta 2$ and $\beta 4$ treatments of T2DM blood samples (Suppl. Table S3) is able to activate the insulin secretion of pancreatic beta cells³⁹ that increasing the insulin/glucagon balance favouring the glucose catabolism since increasing this balance activates key glycolysis metabolism enzymes as phosphofructokinase, and inhibiting gluconeogenesis⁴⁰. In addition, in order to increase this balance insulin/glucagon, $\beta 1$ and $\beta 3$ down-regulated mRNA synthesis of glucagon and glucagon receptor, as well as increasing mRNA synthesis of insulin by $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$ (Suppl. Table S3).

An increased glucokinase (GK) activity enhanced glucose utilization of blood for glucose storage, and glucose uptake in insulin targeted tissues⁴¹. Glycogen synthesis from different precursors and its degradation are known to be dependent on nutritional and hormonal factors, principally glucose and insulin⁴⁰. Insulin decreased the glucose output by activating glycogen

transporter in order to increase the influx of glucose and improve the IR.

Therefore, in the current work, we have also found that AMPK α 1 catalytic subunit, and AMPK γ 2 non-catalytic subunit mRNA expression level are up-regulated by β 4 and β 1, respectively, in T2DM cultures (Suppl. Table S3). These increased levels of this kinase may help to control glucose homeostasis and improve IR, which could be achieved through affecting the mRNA levels of FOXO1, GLP-1R, PDX-1, and PI3K in hepatic and pancreatic tissues. It has been previously found that AMPK decreased for FOXO1⁴⁹. In addition, these findings indicated that AMPK significantly affects mRNA levels (up-regulation) of GLP-1R (activate the insulin secretion of pancreatic beta cells), PI3K (activation of insulin signalling pathway and glucose uptake by GLUT-4), at the same time that down-regulated (lowering) mRNA levels of downstream signalling pathway genes FOXO1 (transcription factor) and PDX-1 (insulin promoter factor 1). AMPK activates PI3K/AKT signalling to decrease the cellular expression of FOXO1 and increase that of PDX-1. Brunet et al.⁵⁰ found that insulin represses liver gluconeogenesis through PI3K/AKT phosphorylation and FOXO1 inactivation. Thus, due to these major roles, the anti-diabetic effects promoted by AMPK includes a strong potential of preventing IR, oxidative stress or diabetic disorder, particularly AMPK affecting the decreasing blood glucose, lipid profiles, and serum levels of inflammatory biomarkers, as well regulate the PI3K/FOXO1/PDX-1 signalling pathway. Furthermore, the beneficial biological functions of GLP-1 are mediated by its interaction with its specific receptor, GLP-1R, a member of the B-subclass of the G protein-coupled receptor (GPCR) family. GLP-1 binds to GLP-1R in β -cells and increases cAMP levels. In turn, cAMP molecules individually act on protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP to stimulate insulin secretion and promote β -cell growth³⁹. In addition, GLP-1R is a GPCR family member that can activate PI3K that participate in several critical steps in insulin signal transduction and in glucose and lipid metabolism. We suggest that mRNA increasing levels of AMPK by β 1 and β 4-conglutins could help effectively activate GLP-1R, also up-regulated by β 4 and β 6-conglutins, which acts on GLP-1 to strengthen insulin/IGF-1 signal, potentiated by the fact that β 1, β 3, and β 6-conglutins up-regulated the mRNA expression levels of both insulin and IGF-1 (Table 1, and Suppl. Table S3). This effect, in turn, may lead to the phosphorylation of downstream PI3K/AKT pathway and inhibits the expression of downstream FOXO1 to promote the nuclear localization of PDX-1 and pancreatic β -cell mass and function.

Transcriptional Activation of metabolism through insulin pathway require a cascade of proteins phosphorylation where implicated multiple kinases, e.g. extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK. All these kinases are activated by insulin in sensitive cells. It has been found that activation of p38 MAPK is impaired in insulin resistant cells, where as ERK and JNK were activated by insulin⁵¹. We have also found that p38 mRNA expression levels are down-regulated in induced insulin resistant IR-C cells. However, treatment of IR-C cell culture with β 1, β 3, and β 6-conglutins are able to highly increase mRNA expression levels of p38 MAPK (Table 1), which would be also a mechanism to increase p38 activity if more available protein is produced in the cell, recovering p38 levels of insulin non-resistant state.

Determination of the effects of β -conglutin proteins in oxidative stress.

Oxidative stress (excess of ROS generation) is the main factor to the onset and the progression of diabetic complications (IR) under obesity or hyperglycaemic conditions¹¹. Furthermore, oxidative stress may be an important factor for the development of IR and T2DM. Hyperglycaemia causes injury of antioxidant defence system followed by excessive reactive oxygen species (ROS) production, contributing to oxidative stress and mitochondrial dysfunction that in turn aggravate IR⁵². The amount of ROS within the cell is finely modulated by enzymatic and non-enzymatic antioxidant defences such as superoxide dismutases (SODs),

catalase (CAT), and glutathione⁵³. Therefore, it is necessary to understand the relationship among oxidative stress, and IR for diabetes prevention, and decrease free radical levels may serve to reduce the risk of diabetes and its associated complications⁵⁴.

Thus, the effect of β -conglutin protein on the capacity of suppressing the oxidative stress produced by insulin induced resistance on C cells was examined. IR-C cells were challenged with individual conglutin isoforms $\beta 1$ to $\beta 4$ and $\beta 6$. We estimated production of ROS capacity by examining the level of protein carbonylation in insulin induced resistant cells and compared to C and IR-C without any challenge using an OxyBlot Protein Oxidation Detection and immunoassay⁵⁵. Protein oxidation is one of the covalent modifications of proteins induced by ROS such as H_2O_2 or other products of oxidative stress, and carbonylation is one of the most commonly occurring oxidative modifications of proteins, which may be responsible for the alteration in protein activity, for example, signalling. Carbonylated proteins have been identified in many plant species at different stage of growth and development as indication of oxidative modification in proteins⁵⁶.

Very low levels of proteins oxidation, as generated through normal metabolic activity were observed in IR-C cells after challenging with conglutin $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$, as well as in non-challenged C cells (Fig. 4). Following challenges with conglutin $\beta 2$, and $\beta 4$, protein oxidation remained at similar levels than insulin induced resistant IR-C cells (Fig. 4). These results show that conglutin $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$ effectively reverse back the ROS production (oxidative stress) in pancreatic IR-C cells treated with these β -conglutins. The analyses indicated that NLL conglutins $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 6$ have the strongest anti-oxidant effect, and these proteins ameliorated the oxidative stress induced by IR in IR-C cell model.

Therefore, IR has been found to be intricately linked with a rapid rise in free radicals and weakening of antioxidants. The Superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) enzymatic activity, a cytoplasmic isoform as a major antioxidant enzyme for removal of free radicals, glutathione (GSH) values and nitric oxide production represent key indicators of the level of oxidative stress¹¹. In the current work, it was evaluate the effects of the different isoforms of β -conglutins over antioxidant variables in the *in vitro* model (IR-C). In order to achieve this, we measured the SOD and Catalase activities, GSH levels and NO production in induced resistant IR-C cells before and after individual β -conglutin isoforms challenges (Fig. 5). We found significant increased levels of GSH in IR-C cells after treatment with $\beta 1$ -, $\beta 3$ -, and $\beta 6$ -conglutins (+1197, +1515, +1565-fold, respectively) (Fig. 5A). Levels of GSH remained not altered when challenges were made with $\beta 2$ -, and $\beta 4$ -conglutins compared with IR-C cells. On the other hand, the levels of SOD and Catalase activities were strongly reduced in IR-C after the same treatments with $\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$ (SOD: -286, -291, -290-fold; Catalase: -28, -26, -26-fold, respectively) (Fig. 5B and Fig. 5C). These data indicated that increasing levels of GSH and reduction on the SOD and Catalase activities may be regulated by β -conglutins as consequence of direct or indirect marked effects of these β -conglutin isoforms in preventing lipid peroxidation and proteins oxidative modifications because drastic reduction on oxidative carbonylation (Figure 4) and, in this regard, overall oxidative stress balancing (amelioration) by β -conglutins.

Additionally, nitric oxide is a signalling molecule that plays a key role in the pathogenesis of inflammation, since NO is considered a pro-inflammatory mediator that induces inflammation when over-produced in abnormal situations in an oxidative stress situation (IR), e.g. as result of peroxynitrite production, a potent oxidizing agent from the reaction between superoxide with nitric oxide (NO)⁵⁷. In the current work, the effect on the NO production was determined in IR-C cells challenged with individual $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 6$ isoforms for 24 h. IR-C cultures treated with $\beta 1$ -, $\beta 3$ -, and $\beta 6$ -conglutins significantly reduced the levels of NO compared to IR-C untreated samples (Fig. 5C) [-7.08, -7.03, -7.03-fold, respectively], recovering the NO levels

at the C cell (non-insulin resistant) state. Interestingly, adding $\beta 2$ or $\beta 4$ -conglutins had no effect on NO reduction, which was at comparative level of IR-C cells.

Conclusions

IR contributes to the loss of pancreatic β -cell function with T2DM progression. NLL β -conglutin proteins could improve T2DM by acting on multiple targets and pathways in order to reverse back IR.

In this study, treatments with particular NLL β -conglutin protein isoforms ($\beta 1$, $\beta 3$, and $\beta 6$) to *in vitro* induced IR-C pancreatic culture cells assays promoted i) glucose uptake, which may be mediated by other β -conglutin effects as ii) the up-regulation of mRNA expression in key insulin signalling pathway activation mediators including IRS-1, GLUT-4 transporter, and protein increased synthesis of p85-PI3K and GLUT-4, in addition to iii) the activation of the intracellular IRS-1/PI-3-kinase pathway eventually involved in glucose homeostasis and protein synthesis stimulation, by increasing the level of phosphorylation (active forms) of insulin pathway activator p-IRS-1, and downstream mediators as p-Akt, p-Cbl, and p-Caveolin proteins, which playing an important role in the vesicular transport of GLUT4 to cell surface improving glucose uptake.

In addition, β -conglutins improve IR by iv) strongly lowering the oxidative stress of IR-C culture cells as measured by decreasing the level of carbonylation of proteins, and increasing glutathione (GSH) levels and lowering antioxidant enzymatic activities such as SOD and Catalase as immediate effects of β -conglutins in oxidative stress reversion, and the reduction of the mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines as TNF- α , INF- γ ; v) reducing the NO production in IR-C, a main source of oxidative stress; and vi) changing the mRNA expression levels (up-/down-regulation) of multiple key mediators of metabolic and signalling transduction pathways, and transcription factors.

This study is the first to describe the molecular basis underlying the IR improvement effect of a legume protein family (β -conglutin), particularly NLL $\beta 1$ -, $\beta 3$ -, and $\beta 6$ - conglutin proteins, with strong evidences suggesting that NLL β -conglutins might play a key role as functional food components with multi-pathway intervention with novel efficacious therapeutic options for the prevention and treatment of complications from prediabetes and T2DM.

Acknowledgement

This work was partially supported by the European Research Program MARIE CURIE (FP7-PEOPLE-24 2011-IOF) for through the grant ref. number PEOF-GA-2011-301550 to JCJ-L, KBS and JDA. JCJ-L thanks the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness for the grant ref. number RYC-2014-16536 (Ramon y Cajal Research Program), and the grant ref. BFU2016-77243-P.

Conflict of Interest Statement

The authors have declared that no competing interests exist.

Authors' Contribution

Conceived and designed the experiments: JCJ-L, and EL-C. Performed the experiments: JCJ-L, and EL-C. Analysed the data: JCJ-L, EL-C, JDA, AC, SM-S, and JL. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCJ-L, JDA. Wrote the paper: all authors.

References

1. GBD 2015 Risk Factors Collaborators, *Lancet*, 2016, **388**, 1659-1724.
2. K. R. Siegel, K. McKeever Bullard, G. Imperatore, M. K. Ali, A. Albright, C. I. Mercado, R. Li and E. W. Gregg, *Diabetes Care*, 2018, **41**, 1032-1039.
3. F. Bril and K. Cusi, In: *Dermatology and Diabetes*, 2018, Springer.
4. K. N. Keane, V. Fernandes Cruzat, R. Carlessi, P. I. Homem de Bittencourt and P. Newsholme, *Oxid Med Cell Longev.*, 2015, Article ID 181643.
5. M. P. Czech, *Nature Med.*, 2017, **23**, 804-814.
6. S. J. Humphrey, S. B. Azimifar and M. Mann, *Nature biotech.*, 2015, **33**, 990-996.
7. K. D. Copps, and M. F. White, *Diabetologia*, 2012, **55**, 2565-2582.
8. M. Beg, N. Abdullah, F. S. Thowfeik, N. K. Altorki and T. E. McGraw, *eLife*, 2017, **6**, e26896.
9. J. Wang and H. Wang, *Oxid Med Cell Longev.*, 2017, Article ID 1930261.
10. A. Besse-Patin and J. L. Estall, *Int J Cell Biol.*, 2014, Article ID 519153.
11. S. Tangvarasittichai, *World J Diabetes*, 2015, **6**, 46-480.
12. A. Arnoldi, G. Boschini, C. Zanoni and C. Lammi, *J Funct Foods*, 2015, **18**, 550-563.
13. E. Lima-Cabello, V. Alche, R. C. Foley, S. Andrikopoulos, G. Morahan, K. B. Singh, J. D. Alche, J. C. Jimenez-Lopez, *Mol Nutr Food Res*, 2017, **61**.
14. E. Lima-Cabello, S. Morales-Santana, R. C. Foley, S. Melser, V. Alché, K. H. M. Siddique, K. B. Singh, J. D. Alché, J. C. Jimenez-Lopez, *J Funct Foods*, 2018, **40**, 510-519.
15. J. C. Jimenez-Lopez, S. Melser, K. Deboer, L. F. Thatcher, L. G. Kamphuis, and K. B. Singh, *Front Plant Sci*, 2016, **7**, 1856.
16. T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, et al., In: G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, et al., (Eds.). *Assay guidance manual* [Internet], 2016, Bethesda (MD).
17. M. T. Chan, G.E. Lim, S. Skovsø, Y. Hsuan, C. Yang, T. Albrecht, E. U. Alejandro, C. A. Hoesli, J. M. Piret, G.L. Warnock and J. D. Johnson, *BMC Cancer*, 2014, **14**, 814.
18. American Diabetes Association, *Diabetes Care*, 2017, **40**, S11-S24.
19. L., Chen, R., Chen, H., Wang and F. Liang, *Int J Endocrinol.*, 2015, article ID 508409.
20. J. Cho, H. Hong, S. Park, S. Kim and H. Kang, *BioMed Res Int.*, 2017, Article ID 8728017.
21. U. M. Kabadi, *J Endocrinol Soc.*, 2017, **1**, 742-750.
22. R. A. DeFronzo and D. Tripathy, *Diabetes Care*, 2009, **32**, 157-163.
23. C. A. Stuart, M. E. A. Howell, B. M. Cartwright, M. P. McCurry, M. L. Lee, M. W. Ramsey and M. H. Stone, *Physiol Rep.*, 2014, **2**, e12236.
24. J. R. Jaldin-Fincati, M. Pavarotti, S. Frendo-Cumbo, P. J. Bilan and A. Klip, *Trends Endocrinol Metab.*, 2017, **28**, 597-611.
25. S. Fröjdö, H. Vidal, and L. Pirola, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2009, **1792**, 83-92.
26. R. A., Haeusler, T. E., McGraw and D. Accili, *Nature Rev Mol Cell Biol.*, 2018, **19**, 31-44.
27. L. Chang, S.-H. Chiang and A. R. Saltiel, *Mol Med.*, 2004, **10**, 65-71.
28. R. W. A., Mackenzie and B. T. Elliott, *Diabetes Metab Syndr Obesity.*, 2014, **7**, 55-64.
29. D. Leto, A. R. Saltiel, *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2012, **13**, 383-396.
30. J. Boucher, A. Kleinridders and C. R. Kahn, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2014, **6**, a009191.
31. M. Kanzaki and J. E. Pessin, *Current Biol.*, 2003, **13**, 574-576.
32. B. Pani and B. B. Singh, *Cell Calcium*, 2009, **45**, 625-633.
33. A. Kimura, S. Mora, S. Shigematsu, J. E. Pessin and A. R. Saltiel, *J Biol Chem.*, 2002, **277**, 30153-30158.
34. J. Liu, S. M. DeYoung, J. B. Hwang, E. E. O'Leary and A. R. Saltiel, *J Biol Chem.*, 2003, **278**, 36754-36762.
35. C. A. Baumann, V. Ribon, M. Kanzaki, D. C. Thurmond, S. Mora, S. Shigematsu, R. E. Bickel, J. E. Pessin and A. R. Saltiel, *Nature*, 2000, **407**, 202-207.

36. V. L. Kouznetsova, M. Hauptschein and I. F. Tsigelny, *Integr Obes Diabetes.*, 2017, **3**, 1-6.
37. C. Nogiec, A. Burkart, J. M. Dreyfuss, C. Lerin, S. Kasif and M.-E. Patti, *Mol Metab.*, 2015, **4**, 151–163.
38. D. S. Edgerton, C. J. Ramnanan, C. A. Grueter, K. M. S. Johnson, M. Lautz, D. W. Neal, P. E. Williams and A. D. Cherrington, *Diabetes*, 2009, **58**, 2766–2775.
39. A. R. Meloni, M. B. DeYoung, C. Lowe and D. G. Parkes, *Diabetes Obes Metab*, 2013, **15**, 15–27.
40. J. M. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer, *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.
41. L. Katz, N. Manamley, W. J. Snyder, M. Dodds, N. Agafonova, J. Sierra-Johnson, M. Cruz, P. Kaur, S. Mudaliar, P. Raskin, R. Kewalramani, and A. Pellacani, *Diabetes Obes Metab.*, 2016, **18**, 191–195.
42. M. C. Petersen, D. F. Vatner and G. I. Shulman, *Nature Rev Endocrinol.*, 2017, **13**, 572–587.
43. S. Cernea and M. Dobreanu, *Biochemistry Medicine*, 2013, **23**, 266–280.
44. T. M. Nordmann, E. Dror, F. Schulze, S. Traub, E. Berishvili, C. Barbieux, M. Böni-Schnetzler and M. Y. Donath, *Scientific Rep.*, 2017, **7**, 6285.
45. R.-H. Shih, C. Y. Wang and C.-M. Yang, *Front Mol Neurosci.*, 2015, **8**, 77.
46. Y. Li, S. Xu, M. Mihaylova, B. Zheng, X. Hou, B. Jiang, O. Park, Z. Luo, E. Lefai, J. Y.-J. Shyy, B. Gao, M. Wierzbicki, T. J. Verbeuren, R. J. Shaw, R. A. Cohen and M. Zang, *Cell Metab.*, 2011, **13**, 376–388.
47. S.-M. Jeon, *Exp Mol Med.*, 2016, **48**, e245.
48. M. Cormont, M. N. Bortoluzzi, N. Gautier, M. Mari, E. van Obberghen, and Y. Marchand-Brustel, *Mol Cell Biol.*, 1996, **16**, 6879-86.
49. A. Puddu, R. Sanguineti, F. Mach, F. Dallegri, G. L. Viviani and F. Montecucco, *Mediat Inflamm.*, 2013, 750540.
50. A. Brunet, J. Park, H. Tran, L. S. Hu, B. A. Hemmings and M. E. Greenberg, *Mol. Cell Biol.*, 2001, **21**, 952-965.
51. N. Kumar and C. H. Dey, *Mol. Cellular Bioch.*, 2004, **260**, 55–64.
52. S. Hurrle and W. H. Hsu, *Biomed J.*, 2017, **40**, 257-262.
53. O. M. Ighodaro and O. A. Akinloye, *Alexandria J Med.*, 2017, doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001
54. L. Rochette, M. Zeller, Y. Cottin and C. Vergely, *Biochim Biophys Acta.*, 2017, **1840**, 2709-2729.
55. D. Ranieri-Rossi, D. Giustarini, A. Milzania and R. Colombo, *Clin Chim Acta.*, 2003, **329**, 23-38.
56. X.-L. Liu, H.-D. Yu, Y. Guan, J.-K. Li and F.-Q. Guo, *Mol Plant.*, 2012, **5**, 1082-1099.
57. J. N. Sharma, A. Al-Omran and S. S. Parvathy, *Inflammopharmacology*, 2007, **15**, 252–259.

Figure Legends

Figure 1. The effect of different β -conglutin isoforms in glucose consumption by insulin-resistant IR-C cells. (A) β 1-, (B) β 3-, (C) β 6-, (D) β 2- and (E) β 4-conglutin at 0, 3, 5 and 10 μ g. Values are shown as the mean \pm standard deviation. $p < 0.05$ represent statistically significant differences associated with each figure.

$p^* < 0.05$ β -conglutins treated IR-C cells (μ g) vs IR-C.

Figure 2. Effect of NLL β 1-, β 3-, β 6-, β 2-, and β 4-conglutin isoforms on mRNA expression levels of IRS-1, and GLUT-4 genes, and proteins synthesis of p85-PI3K and GLUT-4.

IR-C pancreatic cells were incubated for 24h with each purified β -conglutin proteins (β 1, β 3 β 6, β 2, β 4) alone. A) The bar graph shows IR—C pancreatic cells mRNA levels determined by real-time RT-qPCR of IRS-1 and GLUT-4. B) The bar graph shows C pancreatic cells protein levels of p85-PI3K and GLUT-4. β -actin was used as loading control. Data represent three independent experiments. **IR-C** = induced insulin resistant cells, **C** = control PANC-1 cells.

$p^* < 0.05$ β -conglutins treated IR-C cells vs IR-C; $p\# < 0.05$ β -conglutin treated IR-C or IR-C vs C.

Figure 3. Analysis of phosphorylation of insulin signalling pathway key proteins on IR-C cells treated with β -conglutin isoforms.

IR-C pancreatic cells were incubated for 24h with each purified β -conglutin proteins (β 1, β 3 β 6, β 2, β 4) alone. Protein expression levels of A) IRS-1 / p- IRS-1, B) Akt / p-Akt, C) p-CBL, and D) p-Caveolin were measured by western blot. β -actin was used as loading control. Densitometry analysis was performed using the software Image-pro plus 6.0. White/black bars represent measurements (relative % to C/IR-C) of non-phosphorylated/phosphorylated proteins. Vertical lines represent standard deviations of three replicates. **IR-C** = induced insulin resistant cells, **C** = control PANC-1 cells.

$p^* < 0.05$ β -conglutins treated IR-C cells vs IR-C; $p\# < 0.05$ β -conglutin treated IR-C cells or IR-C vs C.

Figure 4. Effect of β -conglutins on proteins oxidative modifications caused by ROS.

Changes of protein carbonyl formation were measured in IR-C pancreatic cells after 24 h of incubation with individual β -conglutin isoforms (β 1, β 3 β 6, β 2, β 4). Protein carbonyls were assessed using an OxyBlot kit. Representative blots showing basal carbonylation levels in C cells, IR-C cells, and IR-C culture cells challenged with individual β -conglutin isoforms. Graph y-axis represents arbitrary densitometry units. **IR-C** = induced insulin resistant cells, **C** = control PANC-1 cells.

$p^* < 0.05$ β -conglutins treated IR-C cells vs IR-C; $p\# < 0.05$ β -conglutin treated IR-C cells or IR-C vs C.

Figure 5. Effect of β -conglutins on antioxidant enzymatic activities, GSH and NO production.

IR-C pancreatic cells were incubated for 24h with individual β -conglutin isoforms (β 1, β 3 β 6, β 2, β 4). A) GSH production, B) SOD and C) Catalase activities, and D) nitric oxide production were measured.

$p^* < 0.05$ β -conglutins treated IR-C cells vs IR-C; $p\# < 0.05$ β -conglutin treated IR-C cells or IR-C vs C.

Table 1. Effect of NLL conglutin proteins β 1, β 3, β 6, β 2, and β 4 on inflammation diabetes-related genes in isolated PBMC from type 2 diabetic patients' blood.

Numbers represent fold-change obtained from qPCR array data analysis of inflammation diabetes-related genes. Treatments with β 1, β 3, β 6, β 2, and β 4, resulted in a significant up- or down-regulation of these genes compared to control patients. Data represent three independent experiments. Values presenting statistical significant ($P < 0.05$) differences with T2DM are depicted in bold.

Gene name	Gene acronym	Up-/Down-regulation*	T2DM	β 1	β 3	β 6	β 2	β 4
Metabolic enzymes								
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	β 1, β 3, β 6 \uparrow	-7.76	3.94	3.96	3.80	-6.20	-6.91
Glucose-6-phosphatase	G6PC	β 1, β 3, β 6 \downarrow	32.64	1.87	6.96	6.88	33.97	22.88
Glucose-6-phosphatase catalytic subunit	G6PC	β 1, β 3, β 6 \downarrow	29.87	1.26	2.93	2.90	30.43	24.72
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	β 1, β 3, β 6 \downarrow	32.49	7.37	2.88	2.53	31.71	23.97
Glucokinase (hexokinase 4)	GCK-HK	β 1 \downarrow	25.87	3.23	24.97	27.96	26.70	23.55
Cytokines and growth factors								
Glucagon	GCG	β 1, β 3 \downarrow	27.37	7.90	4.72	29.97	29.97	24.97
Glucagon Receptor	GCGR	β 1, β 3 \downarrow	27.37	7.07	3.96	32.95	25.92	27.67
Cell Signalling								
Insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	β 1, β 3, β 6 \uparrow	1.35	29.62	27.25	31.96	1.23	0.31
Insulin receptor substrate 1	IRS-1	β 1, β 3, β 6 \uparrow	0.97	17.28	16.73	16.80	0.69	0.80
Insulin receptor substrate 2	IRS-2	β 1, β 3, β 6 \uparrow	2.00	22.78	24.50	30.75	0.81	2.96
Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14/P38	β 1, β 3, β 6 \uparrow	-1.00	13.83	14.80	34.89	-2.55	-3.86
Transcription factors								
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NFkB1 (p50)	β 1, β 3, β 6 \downarrow	27.93	7.37	2.95	1.600	23.19	21.94

* indicate particular β -conglutin isoforms that up- or down-regulated the mRNA expression level of each gene in comparison with the control (T2DM).

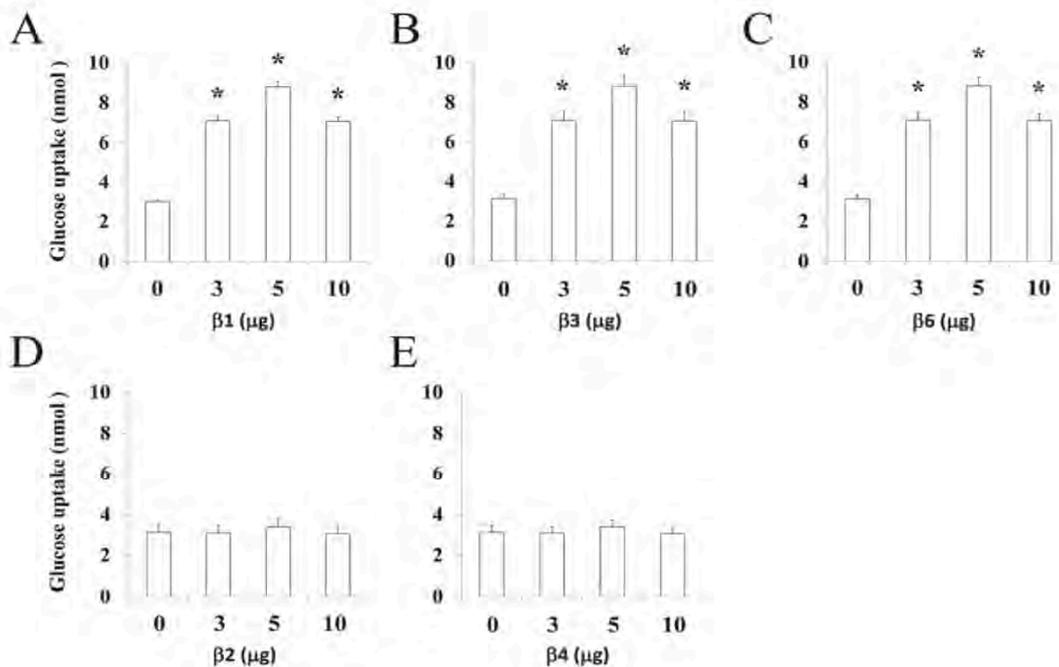


Figure 1.

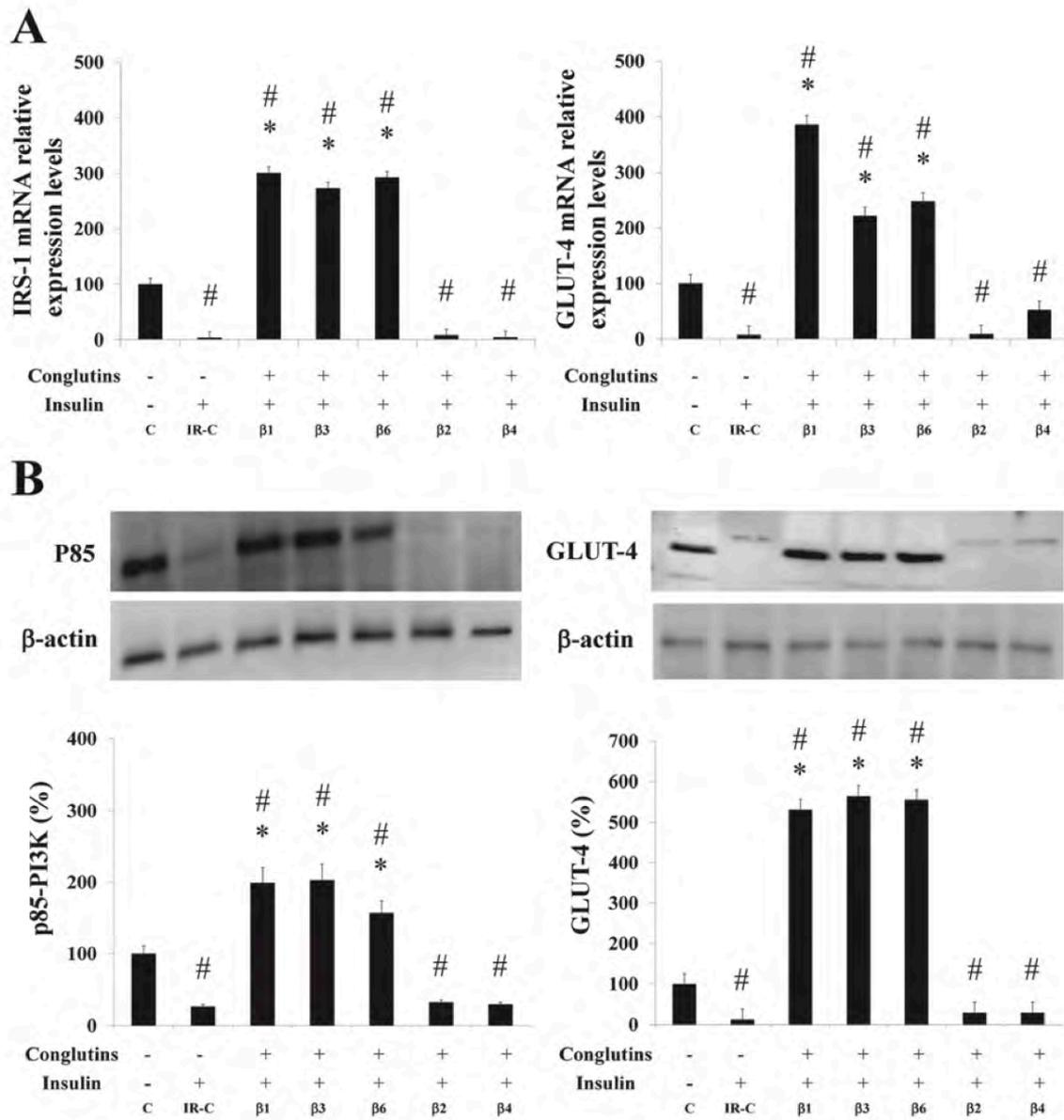


Figure 2.

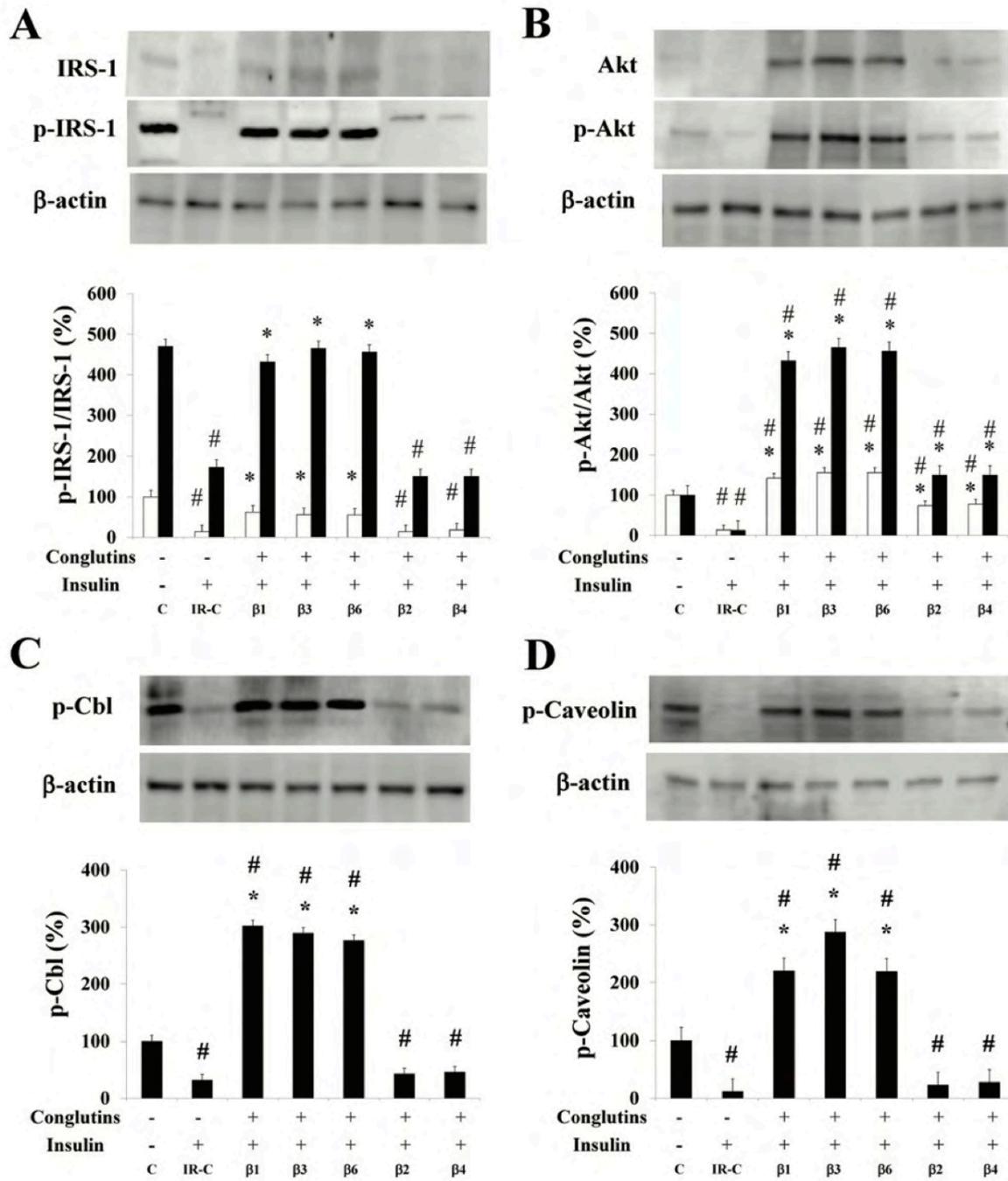


Figure 3.

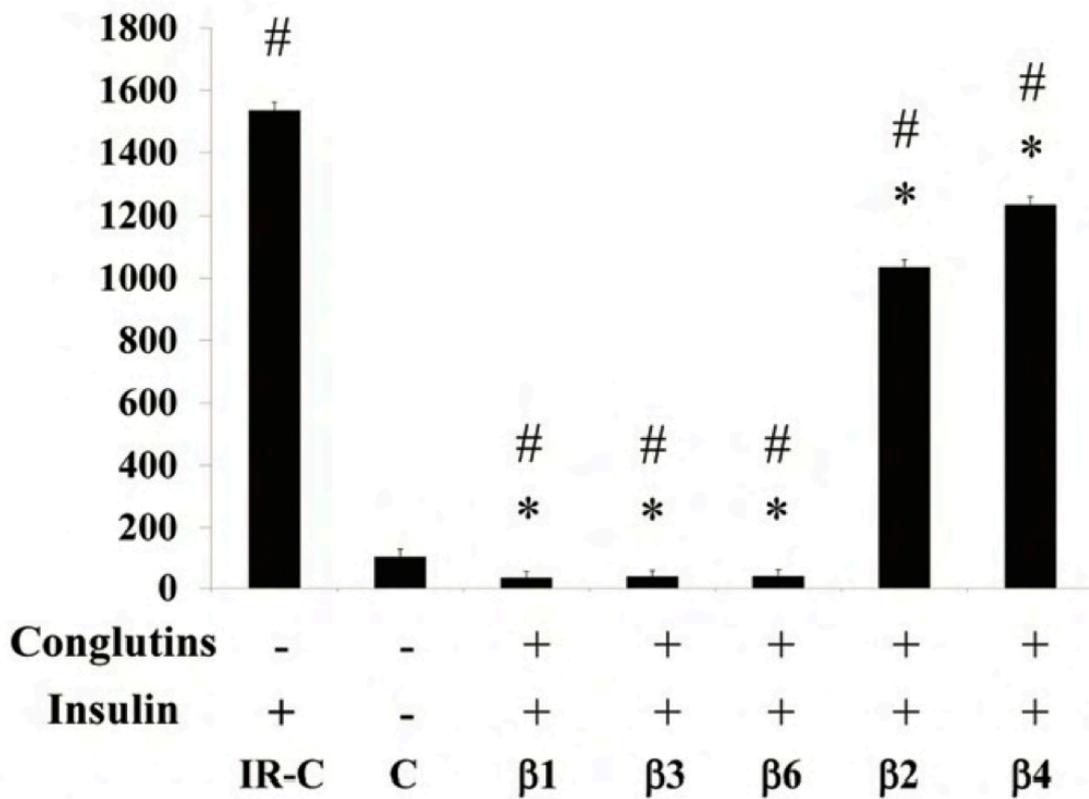
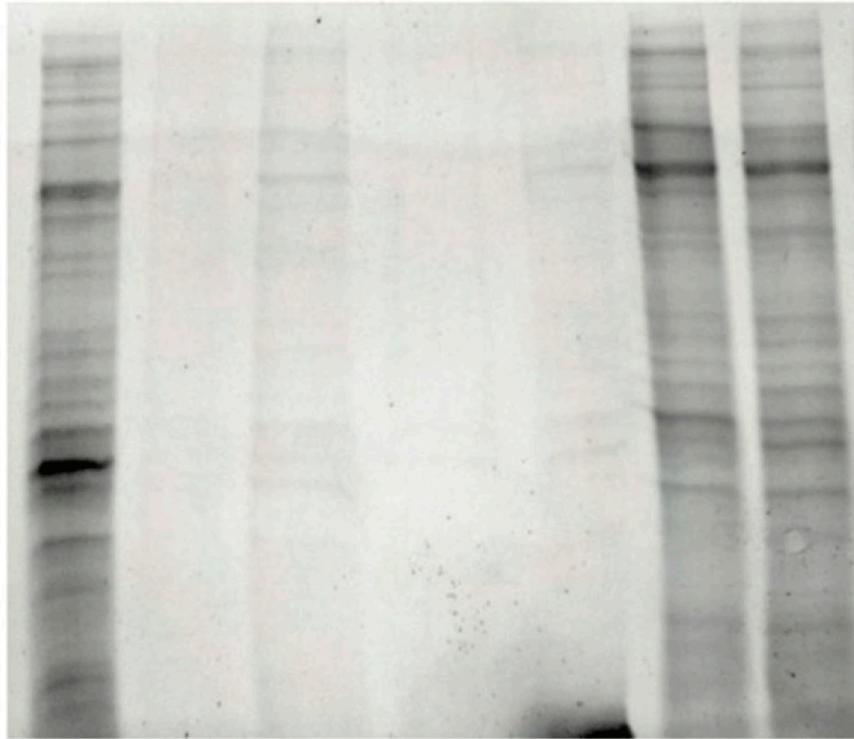
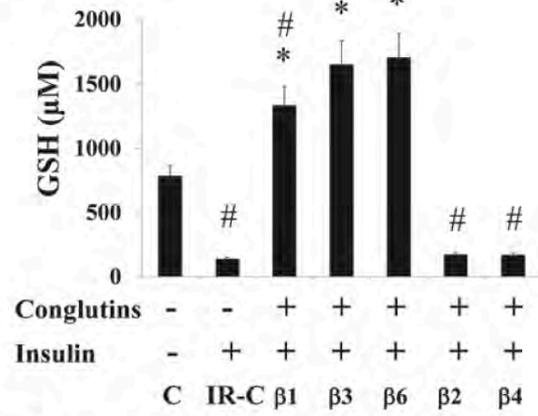
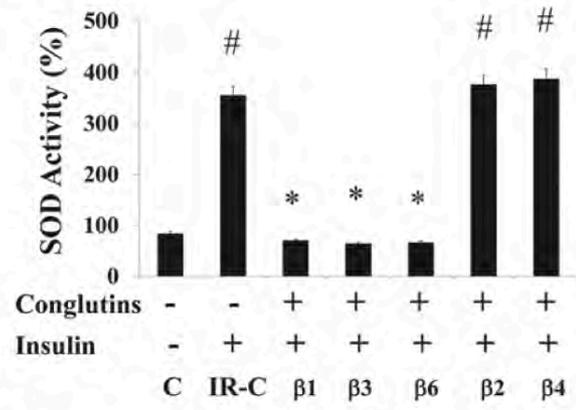
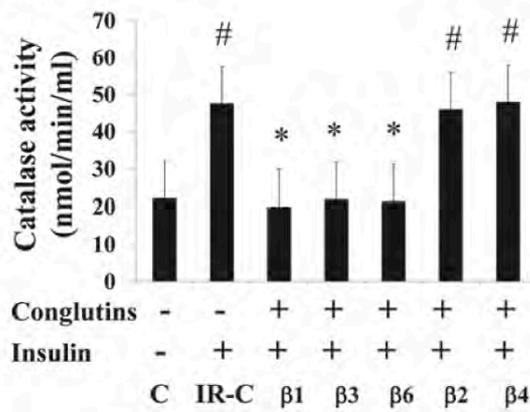
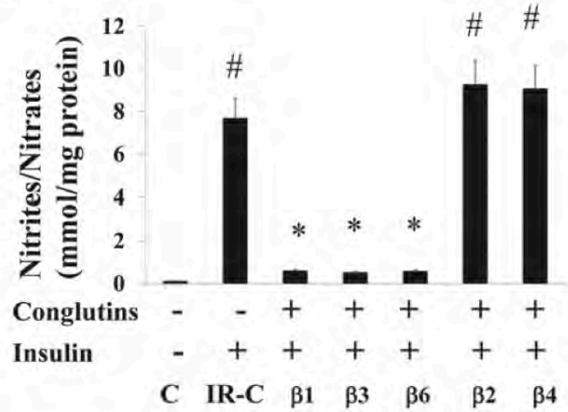


Figure 4.

A**B****C****D****Figure 5.**

5. DISCUSIÓN GENERAL

5.1 El consumo por individuos adultos sanos de aceites de oliva enriquecidos en triterpenos (ácidos oleanólico y maslínico) tiene un marcado efecto positivo sobre numerosos parámetros oxidativos e inflamatorios.

Un estudio reciente emergente a partir del ensayo NUTRAOLEUM (Biel *et al.*, 2016), ha sido capaz de aportar un primer nivel de evidencia *in vivo* sobre los beneficios de los triterpenos del olivo (ácidos oleanólico y maslínico) en humanos sanos, estableciendo que los biomarcadores HDLc y endotelina-1 (marcadores de síndrome metabólico y de función endotelial, respectivamente) mejoran notablemente tras la toma de los tres aceites de oliva ensayados (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018). Un estudio adicional ha mostrado que, tras el consumo de aceite de oliva, disminuye el nivel de oxidación del DNA y de los biomarcadores inflamatorios IL-8 y TNF- α (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2019). El presente estudio aporta pruebas adicionales de estos potenciales beneficios, aportando el análisis de un amplio panel de biomarcadores de oxidación e inflamación.

A diferencia de los análisis mencionados anteriormente, en este trabajo se seleccionó una aproximación *ex vivo*, que incluyó la inducción artificial de un estado inflamatorio en la sangre recolectada de los pacientes del ensayo NUTRAOLEUM. Esta inducción inmune se realizó mediante la adición de diferentes químicos al cultivo de sangre *ex vivo*. En el primer caso, se usó fitohemoaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris*, que es un mitógeno selectivo de células T bien conocido (Movafagh *et al.*, 2011). Los mecanismos de interacción entre la PHA y las células T son poco conocidos, aunque varios autores sugieren la implicación de señales de activación vía receptores de tipo CD2 (O'flynn *et al.*, 1985; Tiefenthaler y Hünig, 1989; Hünig *et al.*, 1989), o de forma similar a otras lectinas, a través de la entrada de Ca²⁺ a través de canales diferentes a los utilizados por las rutas de señalización específicas para CD3 (Pang *et al.*, 2012). La administración de lipopolisacárido (LPS) se usa comúnmente como un modelo de inflamación en diferentes sistemas celulares (Ho *et al.*, 2015; Krishna *et al.*, 2016; Zakaria *et al.*, 2017), y es comúnmente acompañada por la producción y liberación de citoquinas pro-inflamatorias como las interleucinas (IL)-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) entre otras. El modelo de inducción con LPS fue desarrollado inicialmente para simular ciertos aspectos del choque séptico en humanos. Sin embargo, este modelo puede considerarse un modelo general de primera línea de inflamación, y puede usarse para probar el potencial anti-inflamatorio de diversos compuestos. El LPS estimula a los monocitos/macrófagos a través de TLR4, y tiene como resultado la activación de una serie de eventos de señalización que potencian la producción de mediadores inflamatorios (Fang *et al.*, 2004). El tercer método de inducción usado aquí consiste en la combinación de PMA + IO. El PMA es un pequeño compuesto orgánico que difunde a través de la membrana celular hasta el citoplasma, activando directamente la proteína quinasa C (PKC), superponiéndose a la estimulación de los receptores de superficie. Se usa generalmente en combinación con el ionóforo de calcio ionomicina, que es capaz de inducir la liberación de calcio necesaria para la actividad de los factores de transcripción del factor nuclear de las células T activadas (NFAT), que están presentes en la mayoría de las células inmunes y que regulan la respuesta inmune, por ejemplo, disparando la expresión de IL-2.

Los resultados mostrados aquí muestran que los tres métodos fueron capaces de elicitar una respuesta pro-inflamatoria de la sangre cultivada *ex vivo* de forma diferencial, de acuerdo con la naturaleza y los mecanismos moleculares implicados en la inducción. De forma general, la mayoría de las inducciones tuvieron como resultado la aparición de niveles mayores de NO en las muestras de plasma, una presencia incrementada de iNOS, patrones de diferencias de nitración de Tyr y niveles superiores de los numerosos biomarcadores analizados y cuantificados en el plasma. Estos importantes cambios no alteraron significativamente la viabilidad de las células sanguíneas, como se determine experimentalmente mediante la tinción con Azul Tripán. Independientemente del método

de inducción usado, no se detectaron diferencias entre tratamientos, ni entre cultivos inducidos y no inducidos, con viabilidades siempre superiores al 78% en todos los casos (resultados no mostrados). Esta alta viabilidad indica claramente que las inducciones se realizaron dentro de rangos fisiológicos, y a lo largo de un periodo de tiempo razonable. La expresión y los niveles de los marcadores analizados fue modulada de forma notoria por las intervenciones nutricionales diseñadas en NUTRAOLEUM, con un pronunciado descenso de la respuesta pro-inflamatoria de los cultivos.

Una de las ventajas fundamentales del uso de los métodos descritos en el presente trabajo consiste en la inmunorespuesta incrementada derivada de las inducciones, que magnifica los niveles de los biomarcadores utilizados, revelando potenciales diferencias entre las intervenciones, que de otra forma pasarían inadvertidas, particularmente en sujetos sanos como los que forman parte del ensayo NUTRAOLEUM.

En el presente trabajo hemos seleccionado diferentes marcadores indicativos implicados en la extensión y características del proceso inflamatorio. Así, el NO es considerado el más importante miembro de las especies de nitrógeno reactivo, el cual juega un importante papel en la patogénesis de la inflamación (Sharma *et al.*, 2007). Mientras que por una parte promueve efectos anti-inflamatorios en condiciones fisiológicas, la sobreproducción de NO es considerada un mediador pro-inflamatorio en situaciones patológicas, y es liberado en vastas cantidades en las respuestas inmunes por macrófagos activados por citoquinas. Los efectos indeseables de la sobreproducción de NO incluyen vasoconstricción, inflamación y daños a los tejidos, y pueden ser reducidos o modulados por diferentes medios, que incluyen el uso de inhibidores de la biosíntesis de NO, de análogos sintéticos de la arginina, o reduciendo la activación de los macrófagos por citoquinas pro-inflamatorias.

Como se puede observar en el presente trabajo, hay una buena correlación entre los niveles de NO en las diferentes muestras y la presencia de citoquinas inflamatorias, que en todos los casos fueron disminuidas por las intervenciones alimentarias llevadas a cabo en el ensayo. La producción de NO requiere la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la oxidación de la L-arginina a L-citrulina. En mamíferos han sido descritas tres isoformas diferentes de NOS, que incluyen la forma endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), ambas expresadas constitutivamente, junto con una forma inducible (iNOS) (Fukuto y Chaudhuri, 1995). La expresión de la iNOS ha sido descrita tras la generación de estímulos inflamatorios en varios tipos celulares que incluyen a los macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales en las mucosas intestinal y pulmonar, células del músculo liso, y células estromales de órganos linfoides secundarios (revisado por Sonar y Lal, 2019). En el presente trabajo, se describe la presencia del enzima en los diferentes escenarios inflamatorios. La iNOs incrementa claramente tras la activación de las muestras de sangre con los diferentes químicos, mientras que su presencia disminuye notablemente tras las diferentes intervenciones analizadas aquí, que de forma concomitante disminuyen la presencia de NO en las muestras de forma paralela. El ión superóxido (O₂⁻) y el NO son conocidos por su interacción para formar peroxinitrito. El peroxinitrito y/o sus intermediarios pueden inducir la formación de 3-nitrotirosina. La detección de 3-nitrotirosina unida a proteínas es un marcador común tanto de inflamación como de producción de NO. El presente trabajo demuestra que la producción incrementada de NO no necesariamente tiene como consecuencia un incremento en la presencia cuantitativa de proteínas con residuos 3-Tyr nitrados, sino a cambios en los perfiles de proteínas con dicha modificación, lo que puede considerarse una indicación de la precisa modulación mediada a través de eventos de señalización mediante NO.

El presente trabajo también analiza la expresión de un amplio panel de citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular o péptidos secretados por múltiples tipos celulares (particularmente células del sistema inmune), que regulan la duración y la intensidad de la respuesta inmune (Ai *et al.*, 2013). Han sido descritas en múltiples procesos

fisiológicos, y particularmente en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria. Incluso cambios insignificantes en su concentración óptima pueden alterar la fisiología, contribuyendo al desarrollo de sucesos patológicos en diversas enfermedades. Son particularmente relevantes para la respuesta inmune las citoquinas liberadas por las células CD4+ T (Van der Meide y Schellekens, 1996).

Ai *et al.*, (2013) revisaron los métodos óptimos para estimular la producción de citoquinas y su uso para evaluar la inmunotoxicidad, de forma similar a la descrita aquí. Estos autores usaron también diferentes inductores de inflamación, y analizaron la producción de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, RANTES y TGF- β en cultivos de sangre completa de rata, observando un rápido incremento en la secreción de IL-2, IFN- γ , TNF- α , RANTES y TGF- β poco tiempo después de la inducción con PMA e ionomicina. Estos resultados son altamente coincidentes con los mostrados en el presente trabajo en relación con IL-2 y TNF- α , y han sido extendidos aquí a otras citoquinas relevantes como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-27 y MPO. Todas las citoquinas ensayadas aquí mostraron incrementos significativos tras la inducción de la sangre, y su presencia fue en la mayor parte de los casos disminuida por la intervención con los aceites, que difieren en su contenido en triterpenos. Ai *et al.*, (2013) también evaluaron el uso de inmunosupresores como ciclosporina A (CsA) y azatioprina (AZP) in los cultivos de sangre completa, con inmunotoxicidad bien conocida. In estos casos, los químicos inhibieron drásticamente la producción de varias citoquinas, indicando la presencia de toxicidad en el sistema inmune. Esta reducción no es comparable con el descenso moderado en los niveles de citoquinas producidos por los diferentes aceites ensayados aquí, que puede ser atribuido a una actividad antiinflamatoria y no a un efecto tóxico. Esta conclusion es apoyada por el mantenimiento de una alta viabilidad de as células sanguíneas, que fue determinada antes y despues de los ensayos.

El presente trabajo incrementa nuestro conocimiento en relación a los efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva en la prevención de eventos inflamatorios en humanos, particularmente en referencia a su contenido en components bioactivos como los triterpenos (ácidos oleanólico y maslínico). En este caso, se demuestra el efecto positivo del consumo de estos aceites sobre el mantenimiento de niveles adecuados de numerosos marcadores inflamatorios y oxidativos, confirmando así observaciones anteriores (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018, 2019). en los que se usó un número limitado de biomarcadores, y fundamentalmente usando métodos *in vivo*. El presente estudio confirma igualmente que dichos efectos son dependientes de la dosis de triterpenos ingeridos, en la forma de los tres aceites utilizados, con contenido diferencial en estos compuestos. Además, ha sido obtenida información adicional en relación a la implicación de la señalización mediada por NO en los cambios observados. La mayor sensibilidad de los métodos de inducción inflamatoria usados en este trabajo pueden ayudar a distinguir mínimas diferencias en los efectos descritos, por ejemplo, relacionados con el género de los pacientes, o incrementar las diferencias entre intervenciones muy similares. El uso de diferentes métodos de inducción inflamatoria como los empleados aquí, en combinación con múltiples biomarcadores puede también ayudar a diseccionar los mecanismos específicos que implican la inflamación, que son modulados por las diferentes intervenciones. También pueden aportar información adicional sobre la implicación de las diferentes células del sistema inmune, como son las células T, en la respuesta inmune. Incluso en pacientes sanos, estos métodos pueden ayudar a evaluar la susceptibilidad inflamatoria de los pacientes y la actividad de los diferentes mecanismos anti-inflamatorios. Además, el uso de cultivos *ex vivo* y su inducción abre numerosas alternarivas para futuras investigaciones, incluyendo el uso de muestras patológicas, y el co-cultivo con diferentes moduladores de la inmunorespuestas como puedan ser fracciones de aceites, componentes purificados (e.g. diferentes triterpenos purificados), ácidos grasos modificados y otros. El pequeño volumen de sangre necesitado también representa una

ventaja para análisis múltiples y comparativos. El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales el aceite y sus componentes mejoran las respuestas antiinflamatorias puede ayudar a diseñar estrategias mejores para el manejo clínico y nutricional de las enfermedades derivadas o relacionadas con la inflamación.

5.2 Las harinas purificadas de semillas de olivo contienen compuestos antiinflamatorios que pueden modular la inflamación basal de pacientes diabéticos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran por una parte que es posible diseñar un escenario experimental de inducción de inflamación en células pancreáticas en cultivo *in vitro*, que cursa con un incremento de la producción de ciertos marcadores específicos (e.g. iNOS así como otros mostrados en diversos capítulos del presente trabajo), sin afectar significativamente la viabilidad de las células del cultivo. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la adición de harinas de semillas de olivo a los cultivos no causa efectos deletéreos que disminuyan su viabilidad, siendo compatible esta adición con el análisis de distintos biomarcadores. La adición de la harina en varias concentraciones produce una clara disminución en la expresión de iNOS, compatible con una disminución del balance inflamatorio de estas células. Los resultados son análogos a los obtenidos en cultivos *ex vitro* (Lima-Cabello *et al.*, 2017b), y por tanto confirman esta propiedad de las harinas de semillas de olivo a nivel potencialmente tisular *in vitro*. Numerosas cuestiones quedan abiertas, comenzando por la determinación precisa de los componentes antiinflamatorios de la semilla, que, según descripciones presentes en la literatura, así como resultados adicionales obtenidos en el grupo de investigación pueden ser múltiples. Como ejemplo, en la presente memoria se describe la presencia de varios tipos de proteínas de almacenamiento de semillas (SSPs) de tipo β -conglutinas con efectos similares (Lima-Cabello *et al.*, 2017a, 2018d). Formas heterólogas de estas β -conglutinas y otras SSPs están igualmente presentes en las semillas de olivo (Zafra *et al.*, 2016, 2018). Un trabajo reciente del grupo de investigación demuestra igualmente que muchas de estas proteínas de almacenamiento forman parte del proteoma del aceite (Castro *et al.*, 2020), como resultado del proceso elaiotécnico que incluye la molienda del fruto completo (incluyendo las semillas). Estas proteínas son por tanto consumidas de forma rutinaria de forma conjunta con este alimento en una mayor o menor proporción, por lo que podrían igualmente contribuir a los beneficios sobre la salud de este producto.

Aparte de los elementos proteicos, otros componentes de la semilla (e.g. polifenoles, triterpenos etc.) forman parte de la semilla completa y de las harinas derivadas, y muchos de estos componentes han sido descritos como antiinflamatorios en distintos sistemas. Futuros trabajos a desarrollar pretenden identificar estos compuestos de forma individualizada, ayudando a diseñar nuevos enfoques terapéuticos para las diferentes enfermedades inflamatorias y el desarrollo de alimentos funcionales.

5.3 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* modulan la ruta de señalización de la insulina y podrían tener un papel en el tratamiento potencial de la diabetes de tipo 2 y la mejora de la inflamación subyacente.

El aumento de la incidencia de trastornos relacionados con la inflamación ha llevado a la búsqueda de biopéptidos activos derivados de proteínas vegetales con propiedades antiinflamatorias (Möller *et al.*, 2008). En esta Tesis Doctoral investigamos la posible actividad

antiinflamatoria de cinco proteínas de tipo β -conglutina purificadas del altramuz de hoja estrecha (NLL). Observamos una pronunciada activación de iNOS, así como de la citoquina IL-1 en sobrenadantes de cultivos de pacientes con diabetes tipo 2. Ambos marcadores mostraron una inhibición significativa después de 24 h de incubación con las conglutinas purificadas β 1, β 3 o β 6 en los pacientes con diabetes tipo 2. La expresión génica de IL-1 e iNOS mostró un patrón similar en PBMC de acuerdo con los resultados observados en los sobrenadantes de hemocultivos de pacientes con T2D. Por tanto, analizamos los efectos de cada proteína β -conglutina purificada en plasma, con la presencia de estímulos del sistema inmunológico innato (la endotoxina LPS). En nuestro estudio, el LPS representa una fuerte señal inmunoestimuladora que induce una respuesta inflamatoria sistémica con aumentos de citoquinas proinflamatorias como IL-1 e iNOS en todos los grupos experimentales (DM2 y control) (Olefsky y Glass, 2010). En experimentos paralelos, también encontramos que los ensayos de co-cultivo con LPS+ β 1, LPS+ β 3 y LPS+ β 6 redujeron fuertemente la expresión de ARNm de IL-1 en comparación con LPS solo en los sujetos con diabetes tipo 2. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los desafíos LPS+ β 2 y LPS+ β 4 en comparación con LPS solamente. Estudios previos que utilizan proteínas alimentarias de origen animal y vegetal han demostrado efectos específicos que van más allá del simple suministro de nutrientes (Möller *et al.*, 2008). Sin embargo, nuestros resultados indican por primera vez que las proteínas purificadas β 1, β 3 y β 6 desencadenan un descenso de la capacidad proinflamatoria de las células al disminuir la expresión de ARNm de IL-1 e iNOS y los niveles de proteína, lo que conduce a una mejora del proceso inflamatorio asociado con la DM2 en cultivos de sangre entera. De forma relevante, nuestro estudio proporciona nueva e interesante información, en particular sobre las formas β 1, β 3, y β 6 de LLN que inducen niveles de expresión diferenciales de genes clave en la ruta de señalización de la insulina en los pacientes con DM2 en comparación con β 2 y β 4, modulando la vía de señalización de IRS-1/PI3-quinasa/AKT7-GLUT-4, y participando eventualmente en la estimulación de la síntesis de estas proteínas, así como modulando sus efectos antioxidantes y antiinflamatoria. Un estudio inicial ha mostrado claras diferencias estructurales entre las estructuras modeladas de las siete conglutinas utilizadas en este estudio (Jiménez-López *et al.*, 2015), entre las cuales se ha detectado una identidad que varía entre el 73 y el 99%. Este nivel relativamente alto de polimorfismo en la secuencia de proteínas podría inducir diferencias también a nivel fisiológico en los procesos de desarrollo de las plantas (Zienkiewicz *et al.*, 2011a; Jiménez-López *et al.*, 2016), pero también podría ser responsable de roles diferenciales como péptidos bioactivos potenciales (Elliott *et al.*, 2014). Por tanto, no podemos descartar que la variabilidad de la secuencia de las proteínas β -conglutinas pueda ser, al menos parcialmente, responsable de las actividades diferenciales relativas a los efectos estimulantes de la transcripción de genes y de la traducción de las proteínas en la vía de señalización de la insulina. En conclusión, y hasta donde sabemos, este es el primer informe que utiliza este sistema experimental *ex vivo* para testar muestras de sangre humana de pacientes con T2D y C con proteínas de conglutina NLL purificadas y en combinación con LPS. El co-cultivo con las proteínas β 1, β 3 y β 6 desencadenó la presencia de niveles crecientes de expresión de los genes IRS-1, p85, AKT y GLUT-4 tanto en sujetos DM2 como control, y niveles de expresión atenuados de IL-1 e iNOS, con una posible mejora del estado inflamatorio causado por DM2. Además, este estudio mostró por primera vez la interacción de la insulina humana recombinante con varias proteínas β -conglutina de NLL, particularmente con β 1, β 3 y β 6, que podría ser un posible mecanismo para alterar los niveles de expresión de genes en la vía de la insulina.

Estos resultados destacan el uso potencial de las proteínas β 1, β 3 y β 6-conglutina como ingredientes alimentarios y como enfoques alternativos para la prevención, el manejo y/o el tratamiento de la diabetes tipo 2. La inflamación crónica es un sello distintivo de varias patologías, como la artritis reumatoide, DM2, la enfermedad inflamatoria intestinal, la aterosclerosis y el

cáncer. Nuestro trabajo y sus aplicaciones futuras pueden ayudar a desarrollar enfoques terapéuticos (basados en plantas novedosos y relevantes a nivel agrícola) que puedan tener utilidad en la atenuación de la inflamación y, al mismo tiempo, pueden servir como herramientas de control de calidad para fomentar tratamientos basados en plantas fiables y eficaces. Además, este enfoque metodológico ofrece una oportunidad interesante para identificar nuevos péptidos y metabolitos vegetales bioactivos potenciales con actividad antidiabética, y abre la puerta a posibles enfoques terapéuticos basados en plantas para prevenir trastornos inflamatorios. Finalmente, la implementación de programas de mejora de plantas utilizando este conocimiento experimental para diseñar herramientas moleculares sería útil en términos del uso de las semillas NLL en productos derivados de alimentos con beneficios positivos para la salud humana al producir plantas de lupino con mayor expresión y almacenamiento de isoformas particulares de β -conglutina, con efectos conocidos en DM2 y enfermedades inflamatorias relacionadas.

5.4 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* poseen capacidad antiinflamatoria en modelos *ex vivo* e *in vitro*.

Una vez analizados los efectos del co-cultivo de las proteínas recombinantes purificadas β -conglutinas de NLL en cultivos de sangre completa inducidos *ex vivo*, se procedió a realizar ensayos similares en un sistema de cultivo de células pancreática *in vitro*. Como paso previo se evaluó la potencial presencia de efectos nocivos o citotóxicos de las proteínas recombinantes sobre la viabilidad de las células PANC utilizadas. Los resultados obtenidos sugieren que ni las proteínas β -conglutinas individuales ni la mezcla de isoformas comprometen la integridad de las células pancreáticas.

5.4.1 Algunas beta-conglutinas tienen efectos claros sobre el proceso inflamatorio de las células PANC.

Diferentes enfermedades, como la diabetes tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico, están asociadas y crónicamente sostenidas por la inflamación. Las enfermedades de este tipo pueden subyacer múltiples mecanismos que afecten la función de los islotes pancreáticos, contribuyendo a la patología en función de aspectos como antecedentes genéticos y el medio ambiente (Halban *et al.*, 2014). La diabetes es una enfermedad crónica que se produce cuando los islotes pancreáticos no producen suficiente insulina y / o disminuye la sensibilidad de los tejidos que metabolizan la glucosa a la insulina. Durante el establecimiento de la diabetes tipo 2, la hiperglucemia crónica puede provocar daños orgánicos. Las células beta pancreáticas median el daño tisular y promueven respuestas inflamatorias junto con las células del sistema inmunológico al liberar mediadores proinflamatorios y otros atrayentes celulares como quimioquinas, estableciendo un proceso de retroalimentación que aumenta aún más el contenido de células del sistema inmunológico y promueve un estado inflamatorio crónico (Donath y Shoelson, 2011). Los niveles elevados de citoquina IL-1 β o iNOS, como consecuencia de factores estresantes, se encuentran entre los principales contribuyentes al desarrollo inflamatorio, ya que la disfunción de las células β pancreáticas mediada por IL-1 β está involucrada en el establecimiento de T2D. Por ejemplo, la exposición sostenida de las células β pancreáticas a IL-1 β activa la expresión de iNOS dando como resultado una producción excesiva de NO, que induce la expresión de genes proinflamatorios (Wang *et al.*, 2010). En esta Tesis Doctoral hemos evaluado la capacidad de las β -conglutinas purificadas (β 1, β 2, β 3, β 4 y β 6) para modular los niveles de expresión de mediadores proinflamatorios (posibles

efectos antiinflamatorios potenciales) como los ARNm de IL-1 β e iNOS en las células pancreáticas PANC-1.

Nuestros resultados indican que las β -conglutinas, particularmente las β 1, β 3 y β 6, reducen la capacidad proinflamatoria de las células pancreáticas PANC-1 al disminuir la expresión de iNOS y citoquinas, lo que ayuda a mejorar el proceso inflamatorio en general. Es posible que esta reducción de la capacidad proinflamatoria sea el resultado de ejercer un efecto antioxidante, lo que podría reducir el estrés oxidativo en la DM2 y otras enfermedades relacionadas con altos niveles de oxidación (Bognar *et al.*, 2013; Boudjou *et al.*, 2013). Además, estos resultados en la célula PANC-1 están de acuerdo con los análisis preliminares previos que discutimos en referencia a hemocultivos inducidos (Lima-Cabello *et al.*, 2017a). Los ensayos de provocación también se realizaron usando una mezcla de isoformas de β -conglutina (β 1 + β 3 + β 6 + β 2 + β 4) en cultivo de células PANC-1 para medir variaciones de los niveles de iNOS e IL-1 β usando qRT-PCR. El conjunto de β -conglutina suprimió los niveles de inducción de iNOS y el mediador proinflamatorio IL-1 β en las células tratadas con mezcla de β -conglutina y mezcla de LPS+ β -conglutina. Está bien establecido que la producción local y/o la IL-1 β sistémica juegan un papel importante en la progresión de la disfunción del tejido pancreático, particularmente la apoptosis de las células β en T2D. Este proceso es producido por una etapa inflamatoria sostenida iniciada y amplificada por la síntesis de iNOS mediada por IL-1 β y la producción de NO (Russell y Morgan, 2014). Las proteínas conglutinas β 1, β 3 y β 6 de NLL pueden revertir este estado al disminuir los niveles de ARNm de IL-1 β e iNOS proinflamatorios.

5.4.2 Los péptidos de β -conglutina inhiben la producción de múltiples citoquinas y mediadores de la inflamación

Las citoquinas están implicadas en la regulación de la función de las células β pancreáticas. Además de las citoquinas circulantes en el plasma, las células β pancreáticas producen diversas citoquinas en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos, que desempeñan papeles clave en la regulación de la función de las células β (Wang *et al.*, 2010). La resistencia a la insulina aumenta la producción de citocinas deletéreas (proinflamatorias) en las células β y en el plasma. En una etapa de progresión de la diabetes tipo 2, esta situación anormal se caracteriza por un desequilibrio en el perfil de citoquinas proinflamatorias y mediadores que juegan un papel importante en el desencadenamiento de la disfunción de las células β (Tanabe *et al.*, 2017). Por lo tanto, restablecer el equilibrio a favor de las citoquinas protectoras en las células β y el plasma podría prevenir y tratar la disfunción de las células β y la progresión de la T2D.

La literatura describe algunas actividades biológicas ejercidas por péptidos de semillas de leguminosas. Sin embargo, solo unos pocos estudios han caracterizado los efectos antiinflamatorios de los péptidos cortos derivados de plantas, que generalmente son mediados a través de la regulación del óxido nítrico proinflamatorio, citoquinas (es decir, interleuquinas), TNF- α e INF- γ . Ndiaye *et al.*, (2012) describen que los péptidos bioactivos de la harina de soja fueron capaces de inhibir significativamente varios mediadores inflamatorios, incluidos NO, iNOS, COX-2 y TNF- α en macrófagos inducidos por LPS. Además, el péptido lunasina derivado de la proteína de semilla 2S de soja, redujo la producción de ROS en macrófagos inducidos por LPS e inhibió la liberación de TNF- α e IL-6 (Millán-Linares *et al.*, 2014; Millán-Linares *et al.*, 2015). En esta Tesis Doctoral demostramos que las conglutinas β 1, β 3 y β 6 de NLL solas o por acción conjunta, disminuyeron los niveles de producción de mediadores proinflamatorios. Esta amplia capacidad antiinflamatoria puede ser capaz de hacer frente a múltiples situaciones que promueven un proceso de retroalimentación en el establecimiento de un estado inflamatorio crónico que defiende la DT2. Por tanto, las β -

conglutinas pueden revertir los efectos dañinos de un curso inflamatorio de varios estados celulares en diferentes niveles como se describe a continuación.

- Un nivel elevado sostenido de ácidos grasos induce la liberación de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Esta exposición continua de las células β pancreáticas a este tipo de citoquinas promueve la producción y liberación excesivas de ROS e inhibe la secreción de insulina, lo que resulta en la apoptosis de las células β pancreáticas (Imai *et al.*, 2013).

- La inducción de apoptosis de células β pancreáticas por IL-1 β e IFN- γ es activada por estrés ER (Gurzov *et al.*, 2009).

- La apoptosis de los islotes pancreáticos fue inducida por la acción sinérgica de TNF- α e IFN- γ a través de la activación de los canales de Ca²⁺, que promueven la síntesis de NO y posteriormente activan la vía de estrés del ER (Ramadan *et al.*, 2011), lo que conduce a una disfunción mitocondrial y activación de caspasas (Chang *et al.*, 2004).

- La combinación sinérgica de dos (IL-1 β + IFN- γ) o tres (IL-1 β + IFN- γ + TNF- α) citoquinas en los tejidos pancreáticos aumentó la producción de NO al aumentar directamente la síntesis de proteínas iNOS o afectar indirectamente al ARNm expresión de islotes de iNOS, lo que da como resultado la destrucción de las células de los islotes (Sekine *et al.*, 2000). En la presente Tesis Doctoral, los niveles de expresión de ARNm de dos de los tres principales factores inductores de la apoptosis (TNF- α e IFN- γ) se redujeron en PBMC aislados de muestras de sangre con T2D después del tratamiento con las isoformas de conglutina β 1, β 3 y β 6, lo que puede tener un efecto positivo sobre la supervivencia de las células β pancreáticas (Salim *et al.*, 2016).

- El IFN- γ afecta positivamente los niveles de ARNm de IL-12, mientras que la IL-12 actúa como una molécula de señalización para aumentar la síntesis de IFN- γ (Liu *et al.*, 2005). La reducción de los niveles de ARNm de IL-12 en las células sanguíneas T2D después del tratamiento con β 1, β 3 y β 6 puede reducir la síntesis de IFN- γ (y aumento de la producción de IL-12) y sus efectos inflamatorios perjudiciales.

- La interleuquina-17 (IL-17A) actúa como una citoquina inflamatoria muy potente y un potente inductor de T2D a través de la producción de ROS, desempeñando un papel importante en la resistencia a la insulina que da como resultado daño tisular. En adición, IL-17 e IFN-gamma tienen una colaboración sinérgica para estabilizar la diabetes (Marwaha *et al.*, 2014). La IL-17 tiene actividades pleiotrópicas que incluyen la inducción de diversas citocinas inflamatorias (p. ej., IL-6 y TNF- α) y quimioquinas [p. ej., la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1)] de una gran variedad de células (Kawaguchi *et al.*, 2004). Por lo tanto, la reducción en los niveles de proteína IL-17 puede contribuir a la reducción de los efectos proinflamatorios de IL-6, la apoptosis de células de los islotes pancreáticos, y el reclutamiento local de células inmunitarias para mejorar el proceso de inflamación en la progresión de la diabetes tipo 2.

- Los efectos proinflamatorios inducidos por IL-1 β a través de la inducción de la síntesis de IL-6, IL-8, TNF- α y la producción de quimioquinas CCL2 atrajeron a los macrófagos y otras células inmunes a los tejidos pancreáticos, que mejoran la inflamación de retroalimentación. progresión en islotes (Vanbervliet *et al.*, 2002). Este efecto podría reducirse disminuyendo los niveles de producción de IL-1 β e IL-6, IL-8 y TNF- α .

- La IL-2 y la quimioquina CCL5 inducen la activación y proliferación de las células inmunitarias asesinas naturales (NK), lo que mejora los procesos moleculares proinflamatorios (Wu *et al.*, 2017). En la presente Tesis Doctoral, la reducción en los niveles de ARNm de IL-2 y CCL5 por las conglutinas β 1, β 3 y β 6 puede ayudar a reducir este efecto proinflamatorio.

- El factor nuclear NF- κ B es un actor clave en las enfermedades inflamatorias, ya que controla la respuesta inflamatoria global. NF- κ B regula la expresión de una gran cantidad de genes proinflamatorios en la mayoría de los tejidos metabólicos, incluidas las enzimas [por ejemplo, la

ciclooxigenasa (COX)-2, la 5-lipoxigenasa (LOX), iNOS], citoquinas [por ejemplo, interleuquina (IL) -1, IL-6, IL-8, quimioquinas CCL2, CCL5 y TNF- α] y moléculas de adhesión (p. Ej., ICAM-1, VCAM-1, moléculas reguladoras del ciclo celular y factores angiogénicos) (Lawrence, 2009). La activación de NF- κ B, particularmente en pacientes con un estado inflamatorio crónico, está críticamente asociada con una amplia variedad de enfermedades humanas, que incluyen diabetes, asma, aterosclerosis y cáncer. En la presente Tesis Doctoral, el nivel de expresión de ARNm de NF- κ B1 (p50), un componente dimérico del complejo NF- κ B, fue fuertemente inhibido por β 1, β 3 y β 6 frente a T2D, lo que puede contribuir a una reducción en la formación y activación del complejo NF κ B. Esta reducción en el nivel de expresión de ARNm de NF- κ B también puede ser facilitada indirectamente por la reducción en los niveles de TNF- α promovida por las mismas isoformas de β -conglutina.

La activación de la expresión de NF- κ B también induce la producción de moléculas de adhesión (es decir, ICAM-1) y quimiotaxis (es decir, CCL2, CCL5) (Naamane *et al.*, 2007). Por lo tanto, una reducción en los niveles de NF- κ B provocada por las β -conglutinas puede facilitar el mismo efecto sobre ICAM-1, la quimioquina CCL5 y la expresión del receptor CCR2 y contribuir a disminuir los procesos moleculares de inflamación, reduciendo así el reclutamiento de células inmunes.

5.4.3 Las diferentes isoformas de la β -conglutina tienen efectos sobre el NO en los hemocultivos T2D.

El óxido nítrico es una molécula de señalización que desempeña un papel clave en la patogenia de la inflamación. El NO se considera un mediador proinflamatorio que induce inflamación cuando se produce en exceso en situaciones anormales. El vínculo entre el estrés de las células β pancreáticas y la inflamación en la DM2 activa la expresión de una variedad de genes proinflamatorios de citoquinas y quimioquinas (p. ej., TNF- α , IL-6, IL-12, CCL2, CCL5 y otros mediadores inflamatorios como el NO), además de la producción excesiva de ROS. Esta expresión de citoquinas proinflamatorias activaría vías de señalización inflamatorias y la atracción de células inmunes que agravan aún más la inflamación local, provocando apoptosis de células β y T2D (McDaniel *et al.*, 1996). La producción de NO por la NO sintasa inducible (iNOS) es un signo de progresión de la inflamación. La sobreproducción de NO es perjudicial para el huésped, lo que conduce al desarrollo de enfermedades relacionadas con la inflamación (Fujimoto *et al.*, 2005).

Como se indicó anteriormente, la lunasina de soja tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la producción de NO en los macrófagos (de Mejía y Dia, 2009). Sin embargo, esta en esta Tesis Doctoral describimos por primera vez que una proteína leguminosa perteneciente a *L. angustifolius* ha suprimido la producción de NO en las células de hemocultivo de pacientes con diabetes tipo 2, con posibles efectos antiinflamatorios.

5.4.4 Las proteínas β -conglutinas inhiben la quimiotaxis y la capacidad de adhesión celular.

La patogenia de la inflamación de los islotes pancreáticos en la diabetes tipo 2 es un proceso complejo que implica infiltración de células inmunitarias, producción de citoquinas, apoptosis de células β , depósito de péptido amiloide de los islotes y fibrosis (Montane *et al.*, 2014). Las vías inflamatorias contribuyen al deterioro de la captación de glucosa estimulada por la insulina en el tejido adiposo debido a la inhibición del TNF- α y las quimioquinas en el hígado y las células del músculo esquelético, así como a la disminución de la producción pancreática de insulina y la desregulación de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepáticas (McArdle *et al.*, 2013).

Los niveles de expresión de citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18, y quimioquinas como CCL2 (MCP-1) y CCL5 o RANTES, contribuyen en gran medida a la inflamación localizada y la

disfunción de los islotes en la diabetes tipo 2 al reclutar células inmunes en el tejido adiposo y los islotes pancreáticos, y conducen a la resistencia a la insulina e hiperglucemia. Este reclutamiento de células inmunes se ve reforzado por el círculo vicioso de autoestimulación de IL-1 β y la deposición de péptidos amiloides que pueden interactuar con las células inmunes para promover la síntesis de IL-1 β (Turner *et al.*, 2014). Presumimos que las β -conglutinas NLL podrían tener un efecto beneficioso en el mecanismo de quimiotaxis modulando el eje CCR / CCL. Para examinar esto, evaluamos la expresión de CCR2 y quimiocina CCL5 en PBMC aisladas de pacientes diabéticos de tipo 2 después de 24 h de incubación con proteínas de isoforma β -conglutina individuales. Está claro que las conglutinas β modulaban marcadamente el eje CCR/CCL. La expresión de CCR2 disminuyó drásticamente en las pruebas de exposición de β 1, β 3 y β 6, pero no hubo efecto en las pruebas de exposición β 2 y β 4 en comparación con las PBMC de T2D. De manera similar, la expresión de la quimioquina CCL5 disminuyó en los desafíos β 1, β 3 y β 6. Por tanto, los resultados indican que el tratamiento de hemocultivos T2D con conglutinas β 2 o β 4 aumentó la expresión tanto del receptor CCR2 como de la quimioquina CCL5 y, en consecuencia, la capacidad de la quimiotaxis para aumentar la migración de células inmunitarias a tejidos inflamatorios. Por el contrario, el tratamiento con conglutinas β 1, β 3 o β 6 redujo los niveles de expresión de CCR2 y CCL5, lo que mejoró directamente el estado inflamatorio al inhibir el reclutamiento y la migración de células inmunes, y redujo los niveles de mediadores inflamatorios (iNOS, TNF- α , INF- γ), producción de ARNm y proteínas de interleucinas y producción de NO. La inhibición de CCR2 y las quimiocinas CCL2 y CCL5 mejora significativamente la patología pancreática al aumentar el número de islotes pancreáticos y la reversión casi completa de la hipertrofia de los islotes (Cardona *et al.*, 2013). Además, la recuperación funcional pancreática puede ser un reflejo de la gravedad reducida de la diabetes, ya que la insulina redujo los niveles de CCR2, mejoró la respuesta sistémica y aumentó el contenido de glucógeno hepático para asegurar la normalización. Está bien establecido que la inflamación crónica juega un papel crítico en la patogénesis de diversas enfermedades como la diabetes tipo 2 a través de múltiples mecanismos. Uno de esos mecanismos es la activación y el aumento de la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (es decir, ICAM-1, VCAM-1) que facilitan la adhesión, transmigración y reclutamiento de células inmunes, particularmente monocitos y células T, con mayor inducción y liberación de pro-citoquinas inflamatorias, migración de macrófagos y oxidación de lípidos que promueven y mantienen respuestas inflamatorias de retroalimentación (Muller, 2013). Nuestros resultados mostraron que, además de reducir la capacidad de reclutar células inmunes al disminuir la expresión de los mediadores del eje CCR/CCL, las isoformas de conglutina β 1, β 3 y β 6 tienen la capacidad de reducir la quimiotaxis debido a la fuerte reducción en la expresión de la molécula de adhesión celular ICAM-1 en muestras de sangre con T2D. Por tanto, la modulación conjunta de la quimiotaxis y la adhesión celular al reducir la expresión del eje CCR / CCL y las moléculas ICAM-1 por las proteínas de conglutina β puede reducir el reclutamiento de células inmunitarias y, por tanto, mejorar el progreso inflamatorio. Este efecto también facilitaría la reducción de los niveles de TNF- α tanto en el modelo celular PANC-1 como en las PBMC de los pacientes diabéticos tipo 2, ya que esta citoquina puede inducir la expresión de ICAM-1 (Thichanpiang *et al.*, 2014).

5.5 Las proteínas β -conglutinas de la semilla de *Lupinus angustifolius* son capaces de revertir la resistencia inducida a la insulina en un modelo celular pancreático.

El cultivo de células pancreáticas *in vitro* tiene la ventaja adicional de que es posible establecer de forma relativamente sencilla un modelo de resistencia a insulina, en el que se pueden ensayar las

condiciones mencionadas anteriormente, obteniendo información fisiológica adicional. Como paso previo se evaluó la potencial presencia de efectos nocivos o citotóxicos de las proteínas recombinantes sobre la viabilidad de las células PANC insulino-resistentes utilizadas en el sistema *in vitro*. Los resultados obtenidos sugieren que ni las proteínas β -conglutinas individuales ni la mezcla de isoformas comprometen la integridad de las células pancreáticas control ni de las células en las que se indujo resistencia a la insulina (RI).

5.5.1 Las β -conglutinas incrementan la captación de glucosa y la expresión génica de los genes de la ruta de señalización de la insulina en células IR-C.

La RI se observa en una amplia variedad de estados fisiopatológicos y es una causa clave del estado de diabetes y prediabetes (Kabadi, 2017). Mejorar la RI es el enfoque principal para prevenir y tratar la diabetes. La hiperglucemia y la hiperinsulinemia son el resultado de la IR, que puede afectar a diferentes órganos diana de la insulina, por ejemplo, el hígado y el músculo esquelético (DeFronzo y Tripathy, 2009). El alivio de la IR por las conglutinas β de la semilla de NLL podría contribuir a que los órganos insulino-dependientes mejoren el estado de la DM2. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen los efectos que conducen a la homeostasis de la glucosa y la IR aún no están claros. Las diferentes β -conglutinas del NLL podrían desempeñar un papel importante en la homeostasis de la glucosa. El tratamiento de células IR-C pancreáticas resistentes inducidas por insulina con β -conglutinas se realizó para determinar los efectos sobre el nivel de ARNm de GLUT-4 y el aumento de la proteína GLUT4 total para la mejora potencial de la captación de glucosa en IR_PANC-1. Hemos demostrado que el tratamiento con las proteínas purificadas β 1, β 3 y β 6 indujo la captación de glucosa por las células IR-C, mostrando resultados comparables entre sí. Sin embargo, el tratamiento con conglutinas β 2 y β 4 mantuvo la captación de glucosa a niveles comparables a los de las células IR-C (sin co-cultivar con la proteína β -conglutina). El análisis de genes clave en la vía de señalización de la insulina, como IRS-1 y GLUT-4, ha demostrado la regulación positiva de la expresión de estos genes tras el co-cultivo con β 1, β 3 y β 6, mientras que la expresión de ARNm de IRS-1 y GLUT-4 no aumentó en IR_PANC-1, estando en niveles similares a los del control cuando el cultivo celular fue adicionado con las conglutinas β 2 y β 4. Estos hallazgos sugieren que las proteínas β -conglutinas podrían reducir significativamente el nivel de glucosa en sangre al promover la captación de glucosa por las células y aliviar la hiperglucemia mediante el aumento de la concentración de GLUT-1. La involución de la IR también se logra mediante la regulación al alza de IRS-1, que puede mediar la activación de la vía de señalización de la insulina, lo que lleva a una disminución de la glucosa en sangre por la absorción celular de glucosa (Stuart *et al.*, 2014). Además, la absorción de glucosa está mediada por el reclutamiento del receptor de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática.

A nivel celular, la capacidad de captar glucosa se determina controlando la cantidad del transportador de glucosa GLUT4 presente en la membrana plasmática. A nivel molecular, el aumento de la expresión de GLUT-4 puede aumentar la captación de glucosa, junto con otros factores (Jaldin-Fincati *et al.*, 2017). Las conglutinas β 1, β 3 y β 6 aumentaron la fosforilación de IRS-1 y de los efectores posteriores.

5.5.2 Las conglutinas purificadas β 1, β 3 y β 6 incrementan la fosforilación de IRS-1 y los efectores subsecuentes.

El tratamiento continuado con insulina o la IR generalmente resultan en la reducción de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina mediada por esta misma molécula (Copps y White,

2012). Las células diana resistentes a la insulina exhiben una captación de glucosa estimulada por insulina imperfecta y una transducción defectuosa de la señal de insulina (Fröjdö *et al.*, 2009). La fosforilación Ser/Thr del receptor de insulina y las proteínas del sustrato IRS se considera una base molecular para la IR. El receptor de insulina es una tirosina quinasa que sufre autofosforilación estimulada por ligando y una activación de su actividad intrínseca de sustrato quinasa. Una vez activado, el receptor fosforila los sustratos intracelulares de la tirosina, incluidos los miembros de la familia de sustratos del receptor de insulina (IRS1/2/3/4) y de los efectores posteriores, como Cbl o APS (Haeusler *et al.*, 2018). La fosforilación de tirosina dependiente del receptor de insulina de IRS1 y El IRS2 es fundamental para mantener la homeostasis adecuada de la glucosa a través de su interacción con el PI3K (Chang *et al.*, 2004). Esta interacción parece tener una función dual al estimular la actividad de PI3K y dirigir la enzima a un sitio intracelular crítico (Mackenzie y Elliott, 2014).

Los resultados obtenidos muestran que el uso de β -conglutinas de NLL mejora la señalización de la insulina en las células resistentes a la insulina, lo que también podría mejorar el estado de IR. La translocación de GLUT4 está mediada predominantemente a través de la ruta de señalización dependiente de insulina p85-PI3K/AKT/GLUT4 para formar sitios de almacenamiento de glucógeno (Leto y Saltiel, 2012), que implica varios genes fundamentales, tales como PKB, p85-PI3K, IRS-1, y el receptor de insulina (IR). Cuando la insulina se une al IR, induce la fosforilación de tirosina de IR e IRS-1, que posteriormente activan y fosforilan a IRS-1, p85-PI3K, AKT y PKB/AKT2, e inducen la translocación de GLUT4 (Boucher *et al.*, 2014). Así, la activación de IRS-1, p85-PI3K y AKT podrían ser una evidencia directa para demostrar los efectos específicos de las proteínas conglutinas β NLL sólo en la vía insulino dependiente. Nuestros resultados muestran un aumento de la fosforilación de tirosina de IRS-1, lo que podría reducir los niveles de glucosa (aumento de la captación de glucosa) y la IR en el estado hiperglucémico y DM2, en concordancia con el aumento de expresión de ARNm de IRS-1 y GLUT-4 y la síntesis de proteínas p85-PI3K y GLUT-4. Además, también encontramos niveles aumentados de PKB después del tratamiento de hemocultivo T2BM con β 1, β 3 y β 6. Se ha demostrado que la hiperglucemia y la RI son causadas por la inhibición de la fosforilación de p85-PI3K (Boucher *et al.*, 2014). En consecuencia, la fosforilación de IR, IRS-1, p85-PI3K y PKB es esencial para la translocación de GLUT4 y la antihiperglucemia. En la presente Tesis Doctoral, hemos demostrado un aumento de la fosforilación de las proteínas IRS-1 y Akt [IRS-1 (Tyr612) y Akt (Ser473)] a través de la regulación positiva por las conglutinas β 1, β 3 y β 6 de NLL en el tratamiento de IR-C resistentes a la insulina. Además, las β -conglutinas de NLL también aumentaron los niveles de mRNA de IRS-1 y GLUT4, y de las proteínas p85 y GLUT4. Estos hallazgos demuestran que las β -conglutinas NLL pueden mejorar la translocación de GLUT4 aumentando las proteínas fosforiladas en la vía PKB/GLUT4, así como regulando al alza la expresión génica de IRS-1 y GLUT-4 a nivel transcripcional y la síntesis de proteínas correspondientes en las IR-C. Además de la activación de p85-PI3K a través de la fosforilación de IRS-1 (una vía independiente de p85-PI3K), los datos recientes sugieren que una segunda vía podría involucrar eventos de fosforilación de tirosina que están restringidos a subdominios de la membrana plasmática (Boucher *et al.*, 2014). Hemos investigado el papel de la fosforilación de la proteína Cbl y caveolina facilitando la translocación de GLUT4 a la membrana y la absorción de glucosa. La fosforilación de tirosina de Cbl da como resultado la presencia de subdominios lipídicos en la membrana plasmática enriquecidos con caveolina (Kanzaki y Pessin, 2003) y es necesaria para promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. En este sentido, los subdominios lipídicos mencionados se han implicado como sitios para el inicio de la señal, ayudando en la formación de caveolas. Estas pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática a menudo están enriquecidas en moléculas de señalización, glicolípidos y colesterol, y se ha propuesto que actúan como orgánulos de señalización (Pani y Singh, 2009).

Los datos sugieren colectivamente que las β -conglutinas del NLL: (i) promueven la fosforilación de p-85-PI3K a través de la activación de IRS-1 por IRS-1 fosforilado, después de un aumento en la expresión de su ARNm; (ii) activan a otras proteínas que actúan tras SOCS3, como Akt y podrían incrementar la sensibilidad a la insulina regulando Akt. La translocación de GLUT4 a la membrana plasmática fue regulada por (iii) sus principales reguladores, mediante la promoción de la fosforilación de IRS-1, Akt y p85-PI3K; y (iv) promoviendo la fosforilación de proteínas como Cbl y caveolina que reclutan complejos de las principales proteínas activadoras para la formación de balsas lipídicas y caveolas. Las proteínas β -conglutinas son un compuesto bioquímico potencial de la leguminosa NLL que promueve la captación de glucosa y el control glucémico.

5.5.3 Efectos de las proteínas β -conglutinas sobre el metabolismo y las vías de señalización

Una característica principal del estado de IR es el desequilibrio en el metabolismo de la glucosa. En este estado, la captación de glucosa (que se utilizará en los tejidos diana) está profundamente disminuida debido a la regulación a la baja del transportador GLUT-4 en los sujetos con DM2 (Kouznetsova *et al.*, 2017). Además, la expresión de enzimas clave en el metabolismo de la glucosa como la exoquinasa o glucosa quinasa, la glucosa 1,6-fosfatasa y la glucosa 6-fosfatasa, que controlan la dirección de la glucólisis y la gluconeogénesis, también están desreguladas (Nogiec *et al.*, 2015). En la presente Tesis Doctoral, hemos encontrado que determinadas isoformas de β -conglutina son capaces de regular la expresión de enzimas clave del metabolismo de la glucosa que puede favorecer una mayor utilización y la degradación de la glucosa en lugar de la vía gluconeogénica y activar el metabolismo de PBMC aislados de la sangre de pacientes diabéticos tipo 2. El nivel de ARNm de la hexoquinasa (GK) se vio afectado solo por el tratamiento con β 1 (valor reducido) en muestras de PBMC en comparación con el grupo de control (sin co-cultivo con proteína conglutina β), lo que puede ayudar a utilizar la glucosa en la vía catabólica degradativa (glucólisis en lugar de la ruta de las pentosas fosfato). El mismo efecto se ve favorecido por los niveles decrecientes de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa cuando las muestras de sangre T2DM se expusieron a conglutinas β 1, β 3 y β 6. El catabolismo de la glucosa también puede verse favorecido por la disminución de los niveles de glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa), la subunidad catalítica de G6Pasa y los niveles regulados al alza del ARNm de fructosa 1,6-bisfosfatasa (F1,6BPasa) en sangre T2DM tratada con β 1, β 3 y β 6. La reacción enzimática catalizada por la G6Pasa está incluida en las reacciones de gluconeogénesis y confiere la capacidad de liberar glucosa a la sangre (Edgerton *et al.*, 2009). En la presente Tesis Doctoral hemos detectado que se produce simultáneamente una reducción de la expresión de enzimas que disminuyen la generación de glucosa (GP y G6Pasa) y un aumento de la expresión de enzimas involucradas en la utilización de glucosa (HK), provocando mejoras en la hiperglucemia (reducción de la glucosa en sangre) y la RI (sensibilidad a la insulina) en las células cultivadas de T2DM. Al mismo tiempo, la homeostasis de la glucosa está controlada no solo por el catabolismo de la glucosa sino también por la síntesis de glucógeno a través del equilibrio de los niveles de insulina/glucagón. El aumento de los niveles de ARNm del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1R) por los tratamientos con β 2 y β 4 de muestras de sangre de DM2, activa la secreción de insulina por las células beta pancreáticas (Meloni *et al.*, 2013), que aumenta el equilibrio insulina/glucagón, favoreciendo el catabolismo de la glucosa, ya que aumentar este equilibrio activa enzimas clave del metabolismo de la glucólisis como la fosfofructoquinasa, inhibiendo la gluconeogénesis (Berg *et al.*, 2002). Además, β 1 y β 3 regulan negativamente la síntesis de ARNm del glucagón y de su receptor, así como aumentan la síntesis de ARNm de insulina por parte de β 1, β 3 y β 6, aumentando este equilibrio insulina/glucagón. La actividad glucoquinasa incrementada (GK) aumenta la utilización de glucosa de la sangre para su almacenamiento y la captación de glucosa

en los tejidos dirigidos blanco de la insulina (Katz *et al.*, 2016). Se sabe que la síntesis de glucógeno a partir de diferentes precursores y su degradación dependen de factores nutricionales y hormonales, principalmente glucosa e insulina (Berg *et al.*, 2002). La insulina disminuye la producción de glucosa al activar el glucógeno síntesis y glucólisis e inhibiendo la gluconeogénesis. Sin embargo, en la diabetes, la vía gluconeogénica se activa de forma aberrante y suministra una cantidad relativamente mayor de glucosa a la circulación (Petersen *et al.*, 2017). Para controlar los niveles de catabolismo de la glucosa, observamos que GSK3 β (que inhibe la síntesis de glucógeno) es regulado negativamente por el tratamiento con β 1, β 3 y β 6 en el hemocultivo T2DM, que desvía parte de la glucosa que ingresa a la biosíntesis de glucógeno. Además, también hemos encontrado que el RNAm de la insulina es regulado positivamente por β 1, β 3 y β 6, lo que ayuda a equilibrar el catabolismo de la glucosa y la gluconeogénesis. Por lo tanto, las β -conglutinas pueden promover la entrada de glucosa en las células mediada por GLUT-4 (que muestra niveles de expresión aumentados), lo que a su vez equilibra la oxidación de la glucosa y la producción de glucosa en T2DM, mejorando la IR a través de la normalización de los niveles de expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa.

Las citocinas proinflamatorias regulan la función de las células β pancreáticas. Además de las citoquinas circulantes en plasma, las células β pancreáticas producen diversas citoquinas en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos, desempeñando papeles clave en la regulación de la función de las células β y en la RI (Cernea y Dobreanu, 2013). La RI aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias en las células β y en plasma. Así, con la progresión de la DM2, esta situación anormal se caracteriza por un desequilibrio en los perfiles de óxido nítrico proinflamatorio, de citoquinas (*i.e.* interleuquinas), TNF- α e INF- γ , y otros mediadores que juegan un papel importante en la activación de la disfunción de las células β , en la RI y en la DM2, ya que la intercomunicación a través de las citoquinas entre las células β pancreáticas y otros tejidos puede estar fuertemente involucrada en la regulación de la función de las células β (Nordmann *et al.*, 2017). Por lo tanto, restaurar el equilibrio hacia las citoquinas protectoras en las células β y en el plasma podría prevenir y tratar la disfunción de las células β , la progresión de la RI y la DM2. En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado que las proteínas conglutinas β 1, β 3 y β 6 de NLL disminuyeron los niveles de producción de ARNm de los mediadores proinflamatorios NO, TNF- α , INF- γ y NF κ B1 en hemocultivos de T2DM. El factor nuclear NF- κ B es un actor clave en las enfermedades inflamatorias, ya que controla la respuesta inflamatoria global. El NF- κ B regula la expresión de una plétora de genes proinflamatorios en la mayoría de los tejidos metabólicos, incluidas enzimas como la ciclooxigenasa (COX)-2, la 5-lipooxigenasa (LOX) y la iNOS, y citoquinas como el TNF- α , moléculas reguladoras del ciclo celular y factores angiogénicos (Shih *et al.*, 2015). En la presente Tesis Doctoral, mostramos que el nivel de expresión de ARNm de NF- κ B1 (p50) fue fuertemente inhibido por β 1, β 3 y β 6, lo que puede contribuir a una reducción en la formación y activación del complejo NF- κ B. Esta reducción en el nivel de expresión del ARNm de NF- κ B también puede ser facilitada indirectamente por la reducción en los niveles de INF- γ y TNF- α promovidos por las mismas isoformas de β -conglutina. Esta amplia capacidad antiinflamatoria puede ser capaz de hacer frente a múltiples situaciones que promueven un proceso de alimentación en el establecimiento de un estado inflamatorio crónico que es promovido por la RI en la DM2. Así, las β -conglutinas pueden revertir los efectos nocivos de un curso inflamatorio de varios estados celulares a diferentes niveles, como se describe en Lima-Cabello *et al.* (2018d). La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es una serina/treonina quinasa que juega un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la energía celular. La AMPK inhibe la síntesis de ácidos grasos mediante la restricción de la fosforilación de dos dianas: la acetil-coA carboxilasa 1 (ACC1) y la proteína de unión al elemento regulador de estero1c (SREBP1c) (Li *et al.*, 2011). La AMPK también estimula la captación

de glucosa mediante la translocación de vesículas intracelulares que contienen GLUT4 a través de el plasma, además de inhibir la gluconeogénesis para mantener los niveles de glucosa en sangre (Jeon, 2016). Además, la pequeña GTPasa Rab4 participa en el mecanismo molecular involucrado en la distribución subcelular de las moléculas transportadoras de glucosa GLUT-4 tanto en condiciones basales como estimuladas por insulina, que son muy sensibles a la insulina para el transporte de glucosa. Se ha determinado que cuando Rab4 está moderadamente presente, aumenta el número de moléculas de GLUT-4 reclutadas en la superficie celular en respuesta a la insulina, así como la eficacia de la insulina. Sin embargo, cuando Rab4 está presente en niveles más altos, la cantidad de GLUT-4 presente en la superficie celular en respuesta a la insulina se encuentra disminuida (Cormont *et al.*, 1996). En este sentido, el tratamiento con las conglutinas β 1, β 3 y β 6 ayudó a disminuir los niveles de ARNm de Rab4 en T2DM, para aumentar el reclutamiento del transportador GLUT-4 a la superficie celular con el fin de aumentar la entrada de glucosa y mejorar la RI. Por lo tanto, en la presente Tesis Doctoral, también hemos encontrado que los niveles de expresión de ARNm de la subunidad catalítica AMPK α 1 y la subunidad no catalítica AMPK γ 2 están regulados al alza por β 4 y β 1, respectivamente, en cultivos de T2DM. El aumento de los niveles de esta quinasa puede ayudar a controlar la homeostasis de la glucosa y mejorar la IR, lo que podría lograrse al afectar los niveles de ARNm de FOXO1, GLP-1R, PDX-1 y PI3K en los tejidos hepático y pancreático. Se ha encontrado previamente que la AMPK disminuyó los niveles de FOXO1 (Puddu *et al.*, 2013). Además, estos hallazgos indican que la AMPK afecta significativamente los niveles de ARNm (regulación positiva) de GLP-1R (que activa la secreción de insulina de las células beta pancreáticas), PI3K (activa la señalización de insulina vía y captación de glucosa por GLUT-4), al mismo tiempo que regula a la baja (reduce) los niveles de ARNm de los genes de la vía de señalización descendente FOXO1 (factor de transcripción) y PDX-1 (factor promotor de insulina 1). La AMPK activa la señalización de PI3K/AKT disminuyendo la expresión celular de FOXO1 y aumentando la de PDX-1. Brunet *et al.* (2001) encontraron que la insulina reprime la gluconeogénesis hepática mediante la fosforilación de PI3K/AKT y la inactivación de FOXO1. Por lo tanto, debido a estas funciones principales, los efectos antidiabéticos promovidos por la AMPK incluyen un fuerte potencial para prevenir la RI, el estrés oxidativo o el trastorno diabético, particularmente la AMPK que afecta la disminución de la glucosa en sangre, los perfiles de lípidos y los niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, además de regulando la vía de señalización PI3K / FOXO1 / PDX-1. Además, las funciones biológicas beneficiosas del GLP-1 están mediadas por su interacción con su receptor específico, GLP-1R, un miembro de la subclase B de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El GLP-1 se une al GLP-1R en las células β y aumenta los niveles de cAMP. Por otra parte, las moléculas de AMPc actúan individualmente sobre la proteína quinasa A e intercambian proteína activada directamente por AMPc para estimular la secreción de insulina y promover el crecimiento de células β (Meloni *et al.*, 2013). Además, el GLP-1R es un miembro de la familia de GPCR que puede activar PI3K, el cual participa en varios pasos críticos en la transducción de señales de insulina y en el metabolismo de glucosa y lípidos. Sugerimos que el aumento de los niveles de ARNm de AMPK por las conglutinas β 1 y β 4 podría ayudar a activar eficazmente el GLP-1R, que también está regulado positivamente por las conglutinas β 4 y β 6 y actúa sobre el GLP-1 para fortalecer la señal de insulina/IGF-1, potenciada por el hecho de que las conglutinas β 1, β 3 y β 6 regulan positivamente los niveles de expresión de ARNm tanto de insulina como de IGF-1. Este efecto, a su vez, puede conducir a la fosforilación de la vía subsecuente PI3K/AKT e inhibe la expresión subsecuente de FOXO1 para promover la localización nuclear de PDX-1 y la masa y función de células β pancreáticas.

La activación transcripcional del metabolismo a través de la vía de la insulina requiere una cascada de fosforilaciones de proteínas, que implica a múltiples quinasas, *e.g.*, la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y p38 MAPK. Todas estas quinasas

son activadas por la insulina en células sensibles. Se ha encontrado que la activación de la p38 MAPK está alterada en células resistentes a la insulina, en donde las quinasas ERK y JNK son activadas por insulina (Kumar y Dey, 2004). También hemos encontrado que los niveles de expresión del mRNA de p38 están regulados negativamente en células IR-C resistentes a insulina inducidas. Sin embargo, el tratamiento del cultivo de células IR-C con conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ puede aumentar en gran medida los niveles de expresión de ARNm de p38 MAPK, lo que también sería un mecanismo para aumentar la actividad de p38 si se encuentra más proteína disponible. en la célula, recuperando los niveles de insulina p38 al estado no resistente.

5.5.4 Las proteínas β -conglutinas tienen efectos positivos sobre el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo (exceso de generación de ROS) es el factor principal en la aparición y progresión de las complicaciones diabéticas (RI) en condiciones de obesidad o hiperglucemiantes (Tangvarasittichai, 2015). Además, el estrés oxidativo puede ser un factor importante para el desarrollo de RI y DM2.

La hiperglucemia causa una lesión del sistema de defensa antioxidante, seguida de una producción excesiva de especies de oxígeno reactivo (ROS), lo que contribuye al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial que a su vez agravan la IR (Hurrell y Hsu, 2017). La cantidad de ROS dentro de la célula está finamente modulada por defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas tales como superóxido dismutasas (SOD), catalasa (CAT) y glutatión (Ighodaro y Akinloye, 2017). Por lo tanto, es necesario comprender la relación entre el estrés oxidativo y la RI para la prevención de la diabetes, y la disminución de los niveles de radicales libres puede servir para reducir el riesgo de diabetes y sus complicaciones asociadas (Rochette *et al.*, 2014). Así, en esta Tesis Doctoral examinamos el efecto de las proteínas β -conglutinas ($\beta 1$ a $\beta 4$ y $\beta 6$) sobre la supresión del estrés oxidativo producido por la resistencia inducida por insulina en las células C e IR-C usando un inmunoensayo y la detección de oxidación de proteínas mediante OxyBlot (Dalle-Donne *et al.*, 2003). La oxidación de proteínas es una de las modificaciones covalentes de las proteínas inducidas por ROS como el H_2O_2 u otros productos de estrés oxidativo, y la carbonilación es una de las modificaciones oxidativas de proteínas que ocurren con mayor frecuencia y que puede ser responsable de alteraciones en la actividad de las proteínas, por ejemplo, la señalización. Se han identificado proteínas carboniladas en muchas especies de plantas, en diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, y esta detección sirve como indicación del nivel de modificación oxidativa de las proteínas (Liu *et al.*, 2012).

Se observaron niveles muy bajos de oxidación de proteínas, similares a las generadas a través de la actividad metabólica normal, en las células IR-C después de co-incubar con las conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$, así como en células C sin co-cultivo, a diferencia de las células co-cultivadas con las conglutinas $\beta 2$ y $\beta 4$, en las que la oxidación de proteínas permaneció en niveles similares a los de las células IR-C resistentes inducidas por insulina. Estos resultados muestran que las conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ invierten eficazmente la producción de ROS (estrés oxidativo) en las células pancreáticas IR-C tratadas con estas β -conglutinas. La actividad de la superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), los valores de glutatión (GSH) y la producción de óxido nítrico representan igualmente indicadores clave del nivel de estrés oxidativo (Tangvarasittichai, 2015). En la presente Tesis Doctoral evaluamos los efectos de diferentes isoformas de β -conglutinas sobre variables antioxidantes en el modelo *in vitro* (IR-C). Para lograr esto, medimos las actividades de SOD y catalasa, los niveles de GSH y la producción de NO en células IR-C resistentes inducidas antes y después de los desafíos individuales de isoformas de β -conglutina, registrando niveles crecientes de GSH y una reducción de las actividades SOD y catalasa. Además, la reducción drástica de la carbonilación oxidativa que detectamos, induce a pensar que de

forma indirecta se producirá una prevención de la peroxidación lipídica y de otras modificaciones oxidativas de proteínas, mejorando en este sentido, el equilibrio general del estrés oxidativo. Además, el óxido nítrico es una molécula de señalización que juega un papel clave en la patogenia de la inflamación, ya que el NO se considera un mediador proinflamatorio que induce inflamación cuando se produce en exceso en situaciones anormales en una situación de estrés oxidativo (RI), por ejemplo, como resultado de la producción de peroxinitrito, un potente agente oxidante de la reacción entre el superóxido con óxido nítrico (NO) (Sharma *et al.*, 2007). La producción de NO en las células IR-C co-cultivadas con β 1, β 3 y β 6 disminuyó igualmente de forma significativa en los cultivos IR-C, como se muestra en esta Tesis Doctoral.

6. CONCLUSIONES

- 1) Los triterpenos (ácido oleanólico y maslínico) del aceite de oliva, administrados a pacientes sanos en el ensayo clínico NUTRAOLEUM a través del consumo de aceites de oliva modificados, consiguen modular los estados inflamatorios y oxidativos generados artificialmente en cultivos *ex vivo* de sangre completa de los pacientes. Dicha modulación consiste en una disminución o modificación significativa de numerosos biomarcadores relevantes de tipo inflamatorio (e.g. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL12, IL-17, INF- γ , y TNF- α) y oxidativos (iNOS, presencia de proteínas nitradas en el aminoácido tirosina y producción de NO) usando un amplio panel de métodos experimentales.
- 2) Se ha generado un modelo celular para el estudio de la inducción de condiciones de inflamación *in vitro* en células pancreáticas PANC-1 mediante adición de LPS, que no afecta su viabilidad y que permite analizar la interacción con componentes agroalimentarios. Las harinas de semillas de olivo no afectan la viabilidad de dicho sistema, siendo por otra parte capaces de modular un marcador bien consensuado de estado inflamatorio como es la iNOS, reduciendo sus niveles de expresión hasta cifras no diferentes de las condiciones control en cultivos no inducidos. Es precisa una investigación más detallada para identificar los componentes precisos de la harina responsables de dicho efecto.
- 3) El sistema de inducción inflamatoria *ex vivo* en cultivos de sangre completa de pacientes control y pacientes con diabetes tipo 2 (T2D) ha sido usado por primera vez para evaluar la capacidad antiinflamatoria de 5 proteínas de tipo β -conglutina del altramuz de hoja estrecha, que han sido diseñadas, optimizadas en su expresión recombinante y purificadas de cultivos de *E. coli*. Tres de esas proteínas (β 1, β 3, y β 6) indujeron la sobreexpresión de los genes IRS-1, p85, AKT, y GLUT-4 en sujetos control y diabéticos, y atenuaron la expresión de IL-1 e iNOS, potenciando una mejora del estado antiinflamatorio causado por esta última patología. Estos efectos parecen estar mediados por la capacidad de estas β -conglutinas para interactuar con la insulina.
- 4) El tratamiento *ex vivo* de muestras de sangre de pacientes T2D y de células pancreáticas PANC-1 *in vitro*, en ambos casos estimuladas con LPS y co-cultivadas con las isoformas β 1, β 3, y β 6 promueve la atenuación de la expresión de mediadores pro-inflamatorios clave para el daño de las células β pancreáticas, que incluyen la interleuquina IL-1 β , la quimioquina CCL5, el receptor de la quimioquina MCP-1, el factor de adhesión ICAM-1, las citoquinas TNF- α e INF- γ , y el mediador NF- κ B1. Además, disminuyó significativamente la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, y IL-17. Finalmente, las conglutinas β 1, β 3, y β 6 inhibieron la producción de NO y la expresión y aparición de la iNOS.
- 5) Para profundizar en el posible mecanismo regulador de las proteínas conglutinas β 1, β 3, y β 6, hemos evaluado sus efectos en un sistema de cultivo *in vitro* de células pancreáticas PANC-1 en las que se indujo un estado de tolerancia a la insulina que imita la resistencia de las células β pancreáticas a lo largo del progreso de la diabetes mellitus. Las isoformas β 1, β 3, y β 6 mejoraron diversos biomarcadores de la diabetes, actuando sobre múltiples blancos y rutas, permitiendo una reversión notable de la resistencia a insulina. Algunos de los biomarcadores analizados incluyen el consumo intracelular de glucosa, la sobreexpresión de mediadores de la ruta de señalización de la insulina como IRS-1 y el transportador GLUT-4, la síntesis de p85-PI3K y GLUT-4, la activación de la ruta intracelular IRS-1/PI-3-quinasa

implicada en la homeostasis de la glucosa fosforilando al activador p-IRS-1 y a los mediadores subsecuentes p-Akt, p-Cbl, y caveolina-p, los cuales desempeñan un importante papel en el transporte vesicular de los receptores GLUT4 a la superficie celular, mejorando el consumo de glucosa.

- 6) Hemos demostrado que la disminución de la resistencia a insulina de los cultivos causada por las conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$, y $\beta 6$ también cursa con una disminución del estrés oxidativo como demuestra la disminución de los niveles generales de NO, de carbonilación proteica, y de actividades antioxidantes como la SOD y la catalasa, y los niveles aumentados de glutatión. Otro importante efecto del co-cultivo con esas conglutinas es la disminución de la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α y INF- γ . En resumen, todos estos efectos son claramente indicativos de una mejora de la respuesta de los cultivos a insulina que podría ser utilizado como una herramienta terapéutica a desarrollar.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int. J. Environm. Res. Public Health*. 2013; 10(9): 3834–3842. doi: 10.3390/ijerph10093834.

Alburquerque JA, González D, García D, Cegarra J. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour Technol*. 2004; 91: 195-200. doi: 10-1016/S09060-8524(03)00177-9.

Alche JD, Jiménez-López JC, Wang W, Castro AJ, Rodríguez-García MI. Biochemical characterization and cellular localization of 11S type storage proteins in olive (*Olea europaea L.*). *J Agric. Food Chem*. 2006; 54: 5562-5570. doi 10.1021/jf060203s.

Appel LJ, Sack FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER, Conlin PR, Erlinguer TP, Rosner BA, Laranjo NM et al. Effect of protein, Monounsaturated Fat, and Carbohydrate Intake on Blood Pressure and Serum Lipids: Results of the OmniHeart Randomized Trial. *JAMA* 2005; 294: 2455-2464.

Aranceta J, Arija V, Maíz E, Martínez de Victoria E, Ortega RM, Pérez-Rodrigo C, et al. Guías alimentarias para la población española (SENC, diciembre 2016); la nueva pirámide de la alimentación saludable. *Nutr. Hosp*. 2016; 33(supl 8): 1-48.

Aranceta J, Blay G, Echevarria FJ, Gil I, Hernández M, Iglesias JR, López ML. Guía de Buena Práctica Clínica en Alimentos Funcionales. International Marketing and communication S.A. edit. Madrid 2011.

Aranceta J, Serra Majem L (coord.) Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC), 2011; Spanish. *J. Commun. Nutr*. 2011; 17(4): 178-199.

Asociación Española de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa (ASEMESA)[Internet]. [Cited 3019 Jul 31] Available from http://asemesa.es/content/la_aceituna_variedad_tipo_y_presentacion

Belski R, Mori TA, Puddey IB, Sipsas S, Woodman RJ, Ackland TR et al. Effect of lupin-enriched foods on body composition and cardiovascular disease risk factors: a 12-month randomized controlled weight loss trial. *Int J Obesity* 2011; 35: 810-819.

Berbel J, Gutiérrez-Martín C, La Cal JA. Valorización de los subproductos de la cadena del Aceite de Oliva. *Mediterr Econ* 2018; 31:273-289.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*, W H Freeman, New York, 5th edn, 2002. New York. ISBN-10: 0-7167-3051-0.

Biel S, Mesa MD, de la Torre R, Espejo JA, Fernández-Navarro JR, Fitó M, Sánchez-Rodríguez E, Rosa C, Marchal R, Alche JD, Expósito M, Brenes M, Gandul B, Calleja MA, Covas MI. NUTRAOLEOUM Study, a randomized controlled trial, for achieving nutritional added value for olive oils. *BMC Complement. Altern. Med*. 2016; 16(1), 404. doi: 10.1186/s12906-016-1376-6.

Bognar E, Sarszegi Z, Szabo A, Debreceni B, Kalman N, Tucsek Z, Sumegi B, Gallyas F. Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264.7 macrophages of malvidin, a major red wine polyphenol. *PLoS One*, 2013; 8(6), e65355. doi: 10.1371/journal.pone.0065355.

Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; Jan 1;6(1): a009191. doi: 10.1101/cshperspect.a009191.

Boudjou S, Oomah BD, Zaidi F, Hosseinian F. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. *Food Chemistry* 2013; 138(2-3): 1543-1550. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.108.

Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol.* 2001; 21(3): 952-965. doi:10.1128/MCB.21.3.952-965.2001.

Camargo A, Delgado-Lista J, García-Ríos A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martínez P, Gutiérrez-Mariscal FM, Lora-Aguilar P, Rodríguez-Cantalejo F, Fuentes-Jiménez F, et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by Mediterranean diet in elderly people. *Br. J. Nutr.* 2012; 108: 500-508. doi: 10.1017/S0007114511005812.

Cardona SM, Garcia JA, Cardona AE. The fine balance of chemokines during disease: trafficking, inflammation and homeostasis. *Methods in Mol. Biol.* 2013; 1013. 1–16. doi: 10.1007/978-1-62703-426-5_1.

Castro AJ, Lima-Cabello E, Alché JD. Identification of seed storage proteins as the major protein constituents of the extra virgin olive oil proteome. *Food Chem X.* 2020; 7. doi: 10.1016/j.fochx.2020.100099.

Castro-López AJ, Jiménez-López JC, Rodríguez-García MI, Alché JD. Proteínas de almacenamiento tipo 11S en semillas de olivo (*Olea europaea* L.). Caracterización mediante técnicas de proteómica. *Comunicaciones del Simposium Científico –Técnico EXPOLIVA 2007.*

Cernea S, Dobreanu M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. *Biochem Med (Zagreb).* 2013; 23(3): 266-80. doi: 10.11613/bm.2013.033.

Chang I, Cho N, Kim S, Kim JY, Kim E, Woo JE, Nam JH, Kim SJ, Lee MS. Role of calcium in pancreatic islet cell death by IFN γ /TNF- α . *Journal of Immunology.* 2004; 1: 7008–7014. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.7008.

Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med.* 2004; Jul-Dec;10(7-12): 65-71. doi: 10.2119/2005-00029.

Civantos L. La olivicultura en el mundo y en España. En: Barranco D, Fernandez-Escobar D, Rallo L, editores. *El Cultivo del Olivo* (5ª ed). Junta de Andalucía 2004. Editorial Mundi-Prensa. 17-35.

Connor DJ, Fereres E. The Physiology of adaptation and Yield expression in olive. *Hort. Rev* 2005; 34:155-229.

Consejo Oleícola Internacional. [internet] [Cited 2019 Oct 4]. Available from: www.internationaloliveoil.org

Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 2012; Oct,55(10): 2565-2582. doi: 10.1007/s00125-012-2644-8.

Cormont M, Bortoluzzi MN, Gautier N, Mari M, van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Potential role of Rab4 in the regulation of subcellular localization of Glut4 in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(12): 6879-6886. doi:10.1128/mcb.16.12.6879.

Covas MI, Konstantinidou V, Fitó M. Olive Oil and Cardiovascular Health. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009; 54: 477-482.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 2003; Mar, 329(1-2): 23-38. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00003-2.

De Candolle A. *Origine des plantes cultivées.* 3rd ed. París; 1882.

De Felice, S. The Nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science Technol.* 1995; 6: 59-65. doi: 10.1016/S0924-2244(00)88944-X.

De Fronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; Nov, 32 (Suppl 2): S157-63. doi: 10.2337/dc09-S302.

De Mejia EG, Dia VP. Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kappaB pathway in the macrophage. *Peptides* 2009; 30(12): 2388-2398.

De Roos B, Zhang X, Rodríguez-Gutierrez G, Wood S, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ, Cantlay LL, Duthie GG, O'Kennedy N. Anti-platelet effect of olive oil extract: in vitro functional and proteomic studies. *Eur. J. Nutr.* 2011; 50: 553-562. doi: 10.1007/s00394-010-0162-3.

Diez CM, Trujillo I, Martínez-Urdiroz N, Barranco D, Rallo L, Marfil P, Gaut BS. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist* 2015; 206: 436-447. doi: 10.1111/nph.13181.

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11: 98-107. doi: 10.1038/nri2925.

Dove ER, Mori TA, Chew GT, Barden AE, Woodman RJ, Puddey IB, Sipsas S, Hodgson JM. Lupin and soya reduce glycaemia acutely in type 2 diabetes. *Br J. of Nutr.* 2011;106: 1045-1051. doi:10.1017/S0007114511001334.

Driss Alami, SB. Aprovechamiento de hueso de aceituna. Bioabsorción de iones metálicos. [Tesis Doctoral]. Universidad de Granada; 2010.

Edgerton DS, Ramnanan CJ, Grueter CA, Johnson KMS, Lautz M, Neal DW, Williams PE, Cherrington AD. Effects of Insulin on the Metabolic Control of Hepatic Gluconeogenesis In Vivo. *Diabetes* 2009; 58: 2766–2775. doi: 10.2337/db09-0328.

Elayo. Productos del Aceite de Oliva. Castillo de Locubín. Jaen. [internet] [cited 2019 Ago 1]. Available from www.elayo.es

Elliott AG, Delay Ch, Liu H, Phua Z, Rosengren KJ, Benfield AH, Panero JL, Colgrave ML, Jayasena AS, Dunse KM, Anderson MA, Schilling EE, Ortiz-Barrientos D, Craik DJ, Mylne JS. Evolutionary origins of a bioactive peptide buried within preproalbumin. *Plant. Cell* 2014; 26: 981–995. doi: 10.1105/tpc.114.123620.

Estrada JM. *La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades.* Diputación de Sevilla 2011:30-32.

Estruch R, Ros E, Salas Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez Gracia R, Ruiz Gutiérrez V, Fiol M, Lapreta J, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N.Engl. J. Med.* 2013; 368: 1279-90. doi: 10.1056/NEJMoa1200303.

Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB, Tridandapani S. Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Inflammatory Response Is Regulated by SHIP. *J. of Immunol.* 2004; 173(1): 360-366. doi: 10.4049/jimmunol.173.1.360.

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura). [Internet] Datos de cultivos mundiales aceituna. [Cited 2019 Abr 22]. Available from: www.fao.org/faostat/es/#data/QC

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura). [Internet] [Cited 2019 Ago 25] Available from: www.fao.org/seeds/es

Fröjdö S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta* 2009; Feb,1792(2): 83-92. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.019.

Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 2005; 54(5): 1340-1348. doi: 10.2337/diabetes.54.5.1340.

Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995; 35: 165–94. doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.001121.

Gaforio JJ, Visioli F, Alarcon de la Lastra C, Castañer O, Delgado-Rodríguez M, Fitó M, Hernández AF, Huertas JR, Martínez-González MA, Menéndez JA, et al. Virgin Olive Oil and Health: Summary of the III International Conference on Virgin Olive Oil and Health Consensus Report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients* 2019; 11, 2039: 1-35. doi: 10.3390/nu1192039.

García-Ortiz. Civantos C. Aprovechamiento del Alperujo como enmienda Orgánica en el Olivar 2016. [Tesis Doctoral]. Universidad de Jaén.

Gepts P, Beavis WD, Brummer Ch, Shoemaker RC, Stalker T, Weeden NF, Young ND. Legumes as a Model Plant Family. *Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference.* *Plant Physiol.* 2005; 137: 1228-1235. doi: 10.1104/pp.105.060871.

Gobierno de España. Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivo 2018. [Internet] Gobierno de España. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. [Cited 2019 May 5]. Available from: www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/.

Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [Internet]. [Cited 2019 May 28]. Available from: www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/.

Gobierno de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [Internet] [cited 2019 Abr 18] Available from: www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/default.aspx

Gobierno de España. Real Decreto 679/2016, de 16 de Diciembre, por el que se establece la norma de calidad de las aceitunas de mesa. [Internet]. *Boletín Oficial del Estado*, 17 de Diciembre de 2016, núm 304. [cited 2020 Dic 3] Available from www.boe.es/boe/dias2016/12/17/pdfs/BOE-A-2016-11953.pdf

Gómez F and Iris L. En: G. Blanca, B. Cabezudo, M. Cueto, C. Salazar, C. Morales Torres, editores. *Flora Vascular de Andalucía Oriental*. 2º ed. Universidades de Almería, Granada, Jaén y Málaga, Granada 2011: 1211-1215.

Gómez-Gálvez FJ, Hidalgo JC, Hidalgo JJ, Vega V, y Rodríguez Jurado DJ. Control de *Verticillium* en Olivo. Uso de Desinfectantes en Sistemas de Riego Localizado. *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Junta de Andalucía.* Córdoba 2018: 1-12.

Gómez-Gálvez FJ. Potencial de la desinfección química del agua de riego y/o suelo para el control de la Verticilosis del olivo. [Tesis Doctoral]. Universidad de Córdoba 2018.

Gurzov EN, Ortis F, Cunha DA, Gosset G, Li M, Cardozo AK, Eizirik DL. Signaling by IL-1 β +IFN- γ and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2009; 16(11): 1539-1550. doi: 10.1038/cdd.2009.99.

Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018; Jan,19(1): 31-44. doi: 10.1038/nrm.2017.89.

Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather K.J, Powers AC, Rhodes CJ, Sussel L, Weir GC. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *Diabetes Care* 2014; 37(6): 1751–1758. doi: 10.1210/jc.2014-1425.

Hünig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A, Tiefenthaler G A. Monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 73–86. doi: 10.1084/jem.169.1.73.

Hurrle S, Hsu WH. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed J.* 2017; Oct,40(5): 257-262. doi: 10.1016/j.bj.2017.06.007.

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 2018; 54(4): 287-293, doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.

Imai Y, Dobrian AD, Morris MA, Nadler JL. Islet inflammation: A unifying target for diabetes treatment?. *Trends Endocrinol. Metab.* 2013; 24(7): 351–360. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.007.

INTEA. Grupo de Fabricación y venta de maquinaria industrial. [Internet] [cited 2019 Abr 30] Available from: www.gripointea.com

Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, Klip A. Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends Endocrinol. Metab.* 2017; 28: 597–611. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.002.

Jenab M, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Casagrande C, Overvad K, Olsen A, Stripp C, Tjonneland A, Boutron-Rualult MC et al. Association of Nut and Seed Intake with Colorectal Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2004; 13(10): 1595-1603

Jenab M, Sabaté J, Slimani N, Ferrari P, Mazuir M, Casagrande C, Deharveng G, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K et al. Consumption and portion sizes of tree nuts, peanuts and seeds in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts from 10 European countries. *Br. J. Nutr.* 2006; 96. Sup 2: 12-23. doi: 10.1017/BJN20061859.

Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* 2016; Jul 15,48(7): e245. doi: 10.1038/emm.2016.81.

Jiang R, Jacobs D, Mayer-David E, Szklo M, Herrington D, Jenny NS, Kronmal R and Barr RG. Nut and Seed Consumption and inflammatory Markers in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am. J. Epidemiol.* 2006; 163:222-231. doi: 10.1093/aje/kwj033

Jiménez J. C., Alché J. D., Wang W. y Rodríguez-García M. I. El contenido proteico mayoritario del alpeorujo corresponde a proteínas de almacenamiento de semillas tipo 11S. En: *El Aceite de Oliva. Actas*

del Simposium Científico-Técnico del año 2005. Ponencias y Comunicaciones. Fundación del olivar. Jaén 2005. ISBN 978-84-934503-0-4. Tomo I: 365-376.

Jiménez JC, Alché JD, Wang W y Rodríguez-García MI. (2007). El contenido proteico mayoritario del alpeorajo corresponde a proteínas de almacenamiento de semillas tipo 11S. En: El Aceite de Oliva. Actas del Simposium Científico-Técnico del año 2005. Ponencias y Comunicaciones. Fundación del olivar. Jaén 2007; 1: 365-376. ISBN 978-84-934503-0-4.

Jimenez-Lopez JC, Lima-Cabello E, Melser S, Foley RC, Singh KB, Alche JD. Narrow leafed lupin b-conglutin proteins epitopes identification and molecular features analysis involved in cross-allergenicity to peanut and other legumes. *Genomics Comput. Biol.* 2016a. 2(1), e29. doi: 10.18547/gcb.2016.vol2.iss1.e29.

Jimenez-Lopez JC, Lima-Cabello E, Melser S, Foley RC, Singh KB, Alché JD. Lupin Allergy: Uncovering Structural Features and Epitopes of β -conglutin Proteins in *Lupinus Angustifolius* L. with a Focus on Cross-allergenic Reactivity to Peanut and other Legumes. *Lecture Notes in Computer Science* 2015; 9043: 96-107. doi: 10.1007/978-3-319-16483-0_10.

Jimenez-Lopez JC, Melser S, DeBoer K, Thatcher LF, Kamphuis LG, Foley RC, et al. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) β 1- and β 6-conglutin proteins exhibit antifungal activity, protecting plants against necrotrophic pathogen induced damage from *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phytophthora nicotianae*. *Frontiers in Plant Science* 2016b; 7:1856.

Jiménez-López JC, Zafra A, Palanco L, Florido JF, Alché JD. Identificación y evaluación de la alergenicidad potencial de las vicilinas 7S en semilla de olivo (*Olea Europaea* L.) *Biomed Res.* 2016d: 1-16. doi: 10.1155/2016/4946872.

Jimenez-Lopez JC., Foley RC, Brear E, Clarke VC, Lima-Cabello E, Florido JF, Singh KB, Alché JD, Smith PMC. Characterization of narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius* L.) recombinant major allergen IgE-binding proteins and the natural β -conglutin counterparts in sweet lupin seed species. *Food Chemistry* 2018. 244:60-70. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.015.

Jones JL, Fernández ML, McIntosh MS, Wadie N, Calle MC, Kalynych C, Vukich C, Varona J, Ackermann D, Kim JE, et al. A mediterranean-style low-glycemic-load diet improves variables of metabolic syndrome in women, and addition of a phytochemical-rich medical food enhances benefits on lipoprotein metabolism. *J. Clin. Lipidol.* 2011; 5: 188-196. doi: 10.1016/j.jacl.2011.03.002.

Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. El sector del Aceite de Oliva y de la Aceituna de mesa en Andalucía. Sevilla 2008.

Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. [Internet] [cited 2019 Ene 12] Available from: www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturapescaaydesarrollorural/consejeria/sobre-consejeria/estadisticas/paginas/agrarias-superficies-producciones.html

Junta de Andalucía. Consejería de Hacienda, Industria y Energía. Agencia Andaluza de la Energía. La Bioenergía en Andalucía. [Uptated 2018 Dic 12] [cited 2019 May 19] Available from: www.agenciaandaluzadelaenergia.es/es/documentacion/tipo-de-documento/informes-y-estudios/la-bioenergia-en-andalucia

Junta de Andalucía. Estudio del Sector del Aceite de Oliva en Andalucía. Junta de Andalucía 2017. [Internet] [Cited 2019 May 28].

Available from: www.extenda.es/estudios-sectoriales/.

Kabadi UM. Major Pathophysiology in Prediabetes and Type 2 Diabetes: Decreased Insulin in Lean and Insulin Resistance in Obese. *J. Endocrinol.Soc.* 2017; 1(6): 742-750. Published 2017 May 10. doi:10.1210/js.2016-1116.

Kanzaki M, Pessin JE. Insulin Signaling: GLUT4 Vesicles Exit via the Exocyst. *Current Biology*. 2003; 13(14): R574-R576. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00478-0.

Kapellakis IE, Tsagarakis K and Crowther JC. Olive oil history, production and by- product management. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2008; 7:1-26. doi 10.1007/s11157-007-9120-9.

Katz L, Manamley N, Snyder WJ, Dodds M, Agafonova N, Sierra-Johnson J, Cruz M, Kaur P, Mudaliar S, Raskin P, Kewalramani R, Pellacani A. AMG 151 (ARRY-403), a novel glucokinase activator, decreases fasting and postprandial glycaemia in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab*. 2016; Feb,18(2): 191-5. doi: 10.1111/dom.12586.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang S-K. IL-17 cytokine family. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2004; 114(6): 1265-1273. doi: 10.1016/j.jaci.2004.10.019.

Keys A, Grande-Covián F. Role of dietary Fat in Human Nutrition. Diet and the Epidemiology of Coronary Heart Disease. *Am. J. of Public Health* 1957: 1520-1530.

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH et al. The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol* 1986; 124:903-915. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114480.

Kotronarou N and Mendel M. European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law (IMPEL) Olive Oil Project. Report adopted at IMPEL Plenary Meeting. Roma 2003.

Kouznetsova VL, Hauptschein M, Tsigelny IF. Glucose and Lipid Transporters Roles in Type 2 Diabetes. *Integr. Obes. Diabetes* 2017; 3: 1–6. doi: 10.15761/IOD.1000192.

Krebesová R, Castro AJ, Alché JD. Identificación de las proteínas presentes en el aceite de oliva virgen extra y determinación de su origen tisular. En: *El Aceite de Oliva. Actas XVII Simposio Expoliva 2015. Fundación del olivar*. ISBN. 978-84-938900-5-6.

Kumar N, Dey CS. Restoration of impaired p38 activation by insulin in insulin resistant skeletal muscle cells treated with thiazolidinediones. *Mol. Cell Biochem*. 2004; 260: 55–64. doi: 10.1023/B:MCBI.0000026054.60072.48.

Lawrence T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*. 2009; 1(6), a001651.

Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2012; May 23;13(6): 383-96. doi: 10.1038/nrm3351.

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab*. 2011; Apr 6,13(4): 376-388. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.009.

Lima E, Alché V, Zafra A, Benavente JM, Carmona S, Palma Y, Pan M, Pedrosa C, Sánchez- Rivas JP, Jiménez-López JC, Marco FM, Alché JD. Antiinflammatory effects of flours purified from olive seeds in diabetic patiens. *High school students for agricultural science research* 2015; 4:13-22 ISSN 2340-9746.

Lima-Cabello E, Alché JD, Jimenez-Lopez JC. Narrow-leafed lupin main allergen beta-conglutin (Lup an 1) detection and quantification assessment in natural and processed foods. *Foods* 2019a; Oct 18;8(10). pii: E513. doi: 10.3390/foods8100513.

Lima-Cabello E, Alché JD, Morales-Santana S, Clemente A, Jimenez-Lopez JC. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seeds gamma-conglutin is an anti-inflammatory protein promoting insulin resistance improvement and oxidative stress amelioration in pancreatic cells. *Antioxidants* 2019b; 9(1). pii: E12. doi: 10.3390/antiox9010012.

Lima-Cabello E, Alche V, Foley RC, Andrikopoulos S, Morahan G, Singh KB, Alche JD, Jiménez-López JC. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) B-conglutin proteins modulate the insulin signaling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration. *Mol Nutr. Food Res.* 2017a; 61 (5). doi: 10.1002/mnfr.201600819.

Lima-Cabello E, Alché V, Jimenez-Lopez JC, Alché JD. Efectos antiinflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en cultivos celulares pancreáticos. Libro de abstracts III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. Editorial Universidad de Jaén 2018a: 60-67. ISBN: ISBN: 978-84-09-07676-5.

Lima-Cabello E, Alché V, Jimenez-Lopez JC, Pérez-Lázaro A, Gómez-Jiménez FJ, Castro AJ, Alché JD. Evaluación de distintos métodos para la evaluación de biomarcadores esenciales en experimentos de incubación ex vitro de sangre de pacientes con componentes del aceite de oliva. Libro de abstracts III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. Editorial Universidad de Jaén 2018b: 68-75. ISBN: 978-84-09-07676-5.

Lima-Cabello E, Alché V, Zafra A, Sanchez Rivas JP, Jimenez-López JC, Marco FM, Alche JD. Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos. Comunicación en Symposium EXPOLIVA. Jaén 2017b.

Lima-Cabello E, Alché V, Zafra A, Sánchez-Rivas JP, Jimenez-Lopez JC, Marco FM, Alché JD. Efectos antiinflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos. En: El aceite de oliva. Actas Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2017, Fundación del olivar-EXPOLIVA (Eds.), Jaén (Spain) 2017c, pp. SAL-05. ISBN: 987-84-46839-1-6.

Lima-Cabello E, Berral JM, Florido F, Alche JD, Jimenez-Lopez JC. The Function of Conglutin Proteins from the "Sweet Lupin" Group in Food Allergies. In: Legumes for Global Food Security (Alfonso Clemente, Jose C. Jimenez-Lopez Eds.). Nova Science Publishing, Inc. 2017d:249-275. ISBN: 978-1-53612-265-7. Indexed in SCOPUS.

Lima-Cabello E, Jimenez-Lopez JC, Florido FJ, Alché JD. La oleuropeína presente en el aceite de oliva modula la inducción inflamatoria inducida por alérgenos purificados del polen del olivo en pacientes alérgicos. Libro de abstracts III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. Editorial Universidad de Jaén 2018c: 76-84. ISBN: ISBN: 978-84-09-07676-5.

Lima-Cabello E, Morales-Santana S, Foley RC, Melsner S, Alché V, Siddique KHM, Singh KB, Alché JD, Jimenez-Lopez JC. Ex vivo and in vitro assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius*. *J. Funct. Foods* 2018d; 40:510-519. doi: 10.1016/j.jff.2017.11.040.

Lima-Cabello E, Morales-Santana S, León J, Alché V, Clemente A, Alché JD, Jimenez-Lopez JC. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β -conglutins reverse back the induced insulin resistance in pancreatic cells. *Food & Function* 2018e; 9: 5176-5188. doi: 10.1039/c8fo01164h.

Linnaeus C. The System of Nature, or the three Kingdoms of Nature, systematically proposed in classes, orders, genera and species. Leyden (Neederland) 1735.

Liu J, Cao S, Kim S, Chung EI, Homma Y, Guan X, Jimenez V, Ma X. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr. Immunol. Rev.* 2005; 1(2): 119–137.

Liu X.L., Yu H.D., Guan Y., Li J.K., Guo F.Q. Carbonylation and loss-of-function analyses of SBPase reveal its metabolic interface role in oxidative stress, carbon assimilation and multiple aspects of growth and development in Arabidopsis. *Mol. Plant.* 2012; 5: 1082–1099. doi: 10.1093/mp/sss012.

Lopez-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, Raffaele de C, Badimón-Maestro L, Covas MI, Estrich E, Ordovás JM, Soriguer FC, Abla R, et al. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr. Metab. Cardio. Diseas.* 2010; 20(4): 284-294. doi: 10.1016/j.numecd.2009.12.007.

Lozano J, Segura A, y Fernández A. Composición del aceite de oliva. En *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*. Fernandez-Gutierrez A, y Segura A, eds. Fundación UNICAJA. Málaga 2009: 195-224.

Luaces P, Pérez AG, Sanz C. Efecto del deshuesado de la aceituna sobre el aroma del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites* 2004; 55: 174-179.

Luchetti F. “Introduction”, in *Handbook of Olive Oil*. Harwod J and Aparicio R eds. (Springer New York) 2000:7-9 doi: 10.1007/978-1-4757-5371-4.

M'rani-Alaoui M, Lima-Cabello ME, Jimenez-Lopez JC, Alché JD. Histological characteristics of the argan seed and presence of 7S-type seed storage proteins as hallmarks of development. *Actes du 5ème congrès international de l'arganier*. Agadir (Mároc) 2019: 222-228.

Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2014; Feb 13;7: 55-64. doi: 10.2147/DMSO.S48260.

Maestri D, Barrionuevo D, Bodoira R, Zafra A, Jimenez-Lopez JC, Alché JD. Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea ueropaea* L.) seeds. *J. Food Sci Technol.* 2019; 56(9): 4359-4370. doi: 10.1007/s13197-019-03904-5.

Marwaha AK, Tan S, Dutz JP. Targeting the IL-17/IFN- γ axis as a potential new clinical therapy for type 1 diabetes. *Clin. Immunol.* 2014; 154(1): 84-89. doi: 10.1016/j.clim.2014.06.006.

Mascort J, Carrillo R. 2019. Patología Digestiva. In Martín-Zurro A, Cano-Pérez JF and Badía G, editors. *Problemas de salud en la consulta de atención primaria*. 8º ed. Elsevier: 635-636.

McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Front. Endocrinol.* 2013; 4: 52. doi: 10.3389/fendo.2013.00052.

McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, Corbett JA. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1996; 211(1): 24-32. doi: 10.3181/00379727-211-43950d.

Meloni AR, DeYoung MB, Lowe C, Parkes DG. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic β -cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes Obes. Metab.* 2013; Jan;15(1): 15-27. doi: 10.1111/j.1463-1326.2012.01663.x.

Mendoza J.A. Separación de las fases sólida y líquida. Proceeding of: International Seminar on “Scientific Innovations and their application in Olive Farming and Olive Oil technology”. Firenze (Italy) 1999.

Mielke T. Global supply, demand and price outlook of oil & fats in 2018/19. [Internet]. Oil World. Presentation at GLOBOIL in Mumbai on 28 Sept 2018. [cited 2019 Abr 12] Available from: www.oilworld.biz/t/sample/sample_34.pdf

- Millán-Linares MC, Millán F, Pedroche J, Yust MM. GPETAFLR: A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. *J. Funct. Food.* 2015; 18: 358-367. doi: 10.1016/j.jff.2015.07.016.
- Millán-Linares MC, Yust MM, Alcaide-Hidalgo JM, Millán F, Pedroche J. Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chem.* 2014; 151: 141-147. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.053.
- Molina JL, Jiménez B, Ruiz F, García F, López F, Salmerón E. *Agronomía y poda del Olivar. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca; Sevilla 2010: 9-23.*
- Möller NP, Scholz-Ahrens, KE, Roos N, Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008; 47: 171–182. doi: 10.1007/s00394-008-0710-2.
- Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metabol. Syndr. Obes.Target Ther.* 2014; 7: 25–34. doi: 10.2147/DMSO.S37649.
- Movafagh A, Heydary H, Mortazavi-Tabatabaei SA, Azargashb E. The Significance Application of Indigenous Phytohemagglutinin (PHA) Mitogen on Metaphase and Cell Culture Procedure. *Iran J. Pharm. Res.* 2011; 10: 895–903.
- Naamane N, van Helden J, Eizirik DL. In silico identification of NF-kappaB-regulated genes in pancreatic beta-cells. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 55. doi: 10.1186/1471-2105-8-55.
- Ndiaye F, Vuong T, Duarte J, Aluko RE, Matar C. Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds. *Eur. J. Nutr.* 2012; 51(1): 29-37. doi: 10.1007/s00394-011-0186-3.
- Nogiec C, Burkart A, Dreyfuss JM, Lerin C, Kasif S, Patti ME. Metabolic modeling of muscle metabolism identifies key reactions linked to insulin resistance phenotypes. *Mol. Metab.* 2015; 4(3): 151-163. Published 2015 Jan 2. doi:10.1016/j.molmet.2014.12.012.
- Nordmann TM, Dror E, Schulze F, Traub S, Berishvili E, Barbieux Ch, Böni-Schnetzler M, Donath MY. The Role of Inflammation in β -cell Dedifferentiation. *Sci. Rep* 2017; 7: 6285. doi: 10.1038/s41598-017-06731-w.
- O'flynn K, Russul-saib M, Linch DC. Different pathways of human T-cell activation revealed by PHA-P and PHA- M. *Immunology* 1985; 57: 55-60.
- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Ann. Rev. Physiol.* 2010; 72: 219–246. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846.
- Olivarera los Pedroches, S.C.A. Planta de Compostaje de Alperujo OrganOlipe. [Internet] [cited 2019 Ago 5] Available from: www.olipe.com/compostaje_organolipe
- Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P, Serra F, Rodríguez AM and Ribot J. *El libro Blanco de los Esteroles Vegetales*, 2ª Ed. 2005: 77
- Pang B, Shin DH, Park, KS, Kim SJ. Differential pathways for calcium influx activated by concanavalin A and CD3 stimulation in Jurkat T cells. *Pflugers Arch.* 2012; 463(2): 309-318. doi: 10.1007/s00424-011-1039-x.
- Pani B, Singh BB. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium.* 2009; Jun,45(6): 625-33. doi: 10.1016/j.ceca.2009.02.009.

Parra F, Casas A. Origen y Difusión de la domesticación y la agricultura en el Nuevo Mundo. En: Casas A, Torres-Guevara J, Parra F, editores. Domesticación en el continente americano. Mexico 2016; 1:159-187.

Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. Nat. Rev. Endocrinol. 2017; Oct,13(10): 572-587. doi: 10.1038/nrendo.2017.80.

Prusinski J. White lupin (*Lupinus albus L.*)-Nutritional and health values in human nutrition_ a review. Czech J. Food Sci. 2017; 35 (2):95-105. doi: 10.17221/114/2016-CJFS

Puddu A, Sanguineti R, Mach F, Dallegrì F, Viviani GL, F. Montecucco F. Retinal Pigment Epithelial Cells Express a Functional Receptor for Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1). Mediat. Inflamm. 2013; 750540. doi: 10.1155/2013/975032.

Rallo L. El futuro del Olivar. Agromar. 2007; 38: 9-11.

Ramadan JW, Steiner SR, Christina M, O'Neill C, Nunemaker S. The central role of calcium in the effects of cytokines on beta-cell function: implications for type 1 and type 2 diabetes. Cell Calcium. 2011; 50(6): 481-490. doi: 10.1016/j.ceca.2011.08.005.

Rapaport HF. Botánica y morfología. En: Barranco D, Fernández- Escobar R and Rallo L, editores. El cultivo del Olivo 6º ed. Madrid. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa 2008: 37-62.

Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. Biochim. Biophys Acta. 2014; Sep;1840(9): 2709-29. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.017.

Rodrigues IM, Coelho JFJ, Carvalho MG. Isolation and valorization of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. J. Food Eng 2012; 109: 337-346. doi: 10.1016/j.jfoodeng2011.10.027.

Rodríguez-Ariza MO, Montes E. On the Origen and domestication of *Olea europaea L.* (olive) in Andalucía, Spain, based on the biogeographical distribution of its finds. Veget Hist Archaeobot 2005; 14: 551-561. doi 10.1007/s00334-005-0012-z.

Romero N, Saavedra J, Tapia F, Sepúlveda B, Aparicio R. (2016). Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. J Sci Food Agric; 2016;96: 583-592. doi: 10.1002/jsfa.7127.

Ros E and Hu FB. Consumption of Plant Seeds and Cardiovascular Health. Epidemiological and Clinical Trial Evidence. Circulation 2013; 128: 553-565. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001119.

Russell MA and Morgan NG. The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β -cell. Islets 2014; 6(3): e950547. doi: 10.4161/19382014.2014.950547.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Estruch R, Ros E, Covas MI, Ibarrola-Jurado N, Corella D, Arós F, Gómez-García E, Ruiz-Gutiérrez V, et al. Prevention of Diabetes with Mediterranean Diets. Ann.Intern Med. 2014; 160: 1-10.

Salim T, Sershen CL, May EE. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. PLoS One 2016; 11(6), e0153289. doi: 10.1371/journal.pone.0153289.

Sanchez-Rodriguez E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremera B, de la Torre R, Fito M, Covas MI, Vilchez P, et al. Effects of virgin olive oils differing in

their bioactive compound contents on biomarkers of oxidative stress and inflammation in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* 2019; 11(3): 561; doi: 10.3390/nu11030561.

Sanchez-Rodriguez E, Lima-Cabello E, Biel-Glesson S, Fernandez-Navarro JR, Calleja MA, Roca M, Espejo-Calvo JA, Gil-Extremuera B, Soria-Florido M, de la Torre R, et al. Effects of virgin olive oils differing in their bioactive compound contents on metabolic syndrome and endothelial functional risk biomarkers in healthy adults: A randomized double-blind controlled trial. *Nutrients* 2018; 10(5). pii: E626. doi: 10.3390/nu10050626.

Schlegel Pianta, Ulrich. *Una máquina deshuesadora de frutos y especialmente aceitunas*. Madrid. Oficina Española de Patentes 1962; num 274685.

Schwingshackl L, Schwedhelm C, Galbete C, Hoffmann G. Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2017; 9:1063. doi: 10.3390/nu9101063.

Sekine N, Ishikawa T, Okazaki T, Hayashi M, Wollheim CB, Fujita T. Synergistic activation of NF- κ B and inducible isoform of nitric oxide synthase induction by interferon- γ and tumor necrosis factor- α in INS-1 cells. *J. Cell Physiol.* 2000; 184(1): 46–57. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1<46::AID-JCP5>3.0.CO;2-L.

Seven Countries Study [Internet] [cited 2020 Oct 12] Available from www.sevencountriesstudy.com

Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacol.* 2007; 15: 252–259. doi: 10.1007/s10787-007-0013-x.

Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol. Neurosci.* 2015; Dec 18;8: 77. doi: 10.3389/fnmol.2015.00077.

Sonar, S.A. and Lal, G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 2019; 10: 710. doi: 10.3389/fimmu.2019.00710.

Stuart CA, Howell MEA, Cartwright BM, McCurry MP, Lee ML, Ramsey MW, Stone MH. *Physiol. Rep.* 2014; 2, e12236.

Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Tanizawa Y. Interorgan Crosstalk Contributing to β -Cell Dysfunction. *J. Diabetes Research* 2017; Article ID 3605178. doi: 10.1155/2017/3605178

Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2015; 6(3): 456-480. doi:10.4239/wjd.v6.i3.456.

Thichanpiang P, Harper SJ, Wongprasert K, Bates DO. TNF- α -induced ICAM-1 expression and monocyte adhesion in human RPE cells is mediated in part through autocrine VEGF stimulation. *Mol. Vis.* 2014; 20: 781–789.

Tiefenthaler G, Hünig T. The role of CD2/LFA-3 interaction in antigen- and mitogen-induced activation of human T cells. *Int. Immunol.* 1989; 1(2): 169-75. doi: 10.1093/intimm/1.2.169.

Tizón-Rodríguez, MM. Efectos antiinflamatorios de los extractos de germinados de olivo en cultivos celulares inducidos. [Trabajo Fin de Master]. Máster en Genética y Evolución. Universidad de Granada, 2019.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2014; 1843(11): 2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.

Union europea. Reglamento (UE) N° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* (20-12-2013):347-671.

Union europea. Comisión Europea. CORDIS. Resultados de Investigaciones de la UE. [internet] [Cited 2019 Ago 4]. Available from: <https://cordis.europa.eu/search>

Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy* 1996; 8: 243–249. doi: 10.1007/BF01877210.

Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Aït-Yahia S, et al. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 231-242. doi: 10.1002/1521-4141(200201)32:1<231::AID-IMMU231>3.0.CO;2-8.

Varzakas T, Zakyntinos G, and Verpoort F. Plant food residues as source of nutraceuticals and functional foods. *Foods* 2016; 5,88:5-32. doi: 10.3390/foods5040088.

Vavilov NI. The law of homologous series in variation. *Journal of Genetic* 1922; Vol 12,1:47-89.

Vossen P. Olive oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils. *HortScience* 2007; Vol 42(5): 1093-1100.

Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Int. J. Endocrinology* 2010; Article ID 515136. doi: 10.1155/2010/515136.

Wang W, Alché JD, Rodríguez-García MI. Characterization of olive seed storage proteins. *Acta Phys. Plant.* 2007; 29 (5): 439-444

Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front. Immunol.* 2017; 8: 930. doi: 10.3389/fimmu.2017.00930.

Zafra A, Jimenez-Lopez JC, CarmonaR, Claros G, Alché JD. Transcriptome-based identification of a seed olive legumin (11S globulin). Characterization of subunits, 3D modelling and molecular assessment of allergenicity. *Lecture Notes in Computer Science* 2016; 9656: 59-70. doi: 10.1007/978-3-319-31744-1_6.

Zafra A, M'rani-Alaoui M, Lima E, Jimenez-Lopez JC, Alché JD. Histological features of the olive seed and presence of 7S-type seed storage proteins as hallmarks of the olive fruit development. *Frontiers in Plant Science.* 2018. 9, 1481.

Zafra A, M'Rani-Alaoui M, Lima-Cabello E, Olmo JM, Jimenez-Lopez JC, Alché JD. Caracterización anatómica e histológica de la semilla del olivo como marcador de desarrollo del fruto y fuente alimentaria de alto potencial. En: *El aceite de oliva. Actas Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2019, Fundación del olivar-EXPOLIVA* (Eds.), Jaén (Spain), 2019; pp. SAL-1019. ISBN: 978-84-946839-2-3.

Zafra A, Zienkiewicz A, Clemente A, Al-lach S, Fernández-Márquez A, Martín-Aznarte I, Rueda A, Salmerón C, Jimenez-Lopez JC, Castro AJ, et al. Aislados proteicos de semillas de olivo: composición química, propiedades funcionales y caracterización proteica. En: *El aceite de oliva. Actas Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2013, Fundación del olivar-EXPOLIVA* (Eds.), Jaén (Spain) 2013; pp. IND-25, ISBN: 987-84-938900-0-1

Zafra Alvarez, A. Análisis histológico, proteómico y transcriptómico de la semilla del olivo. [Tesis Doctoral]. Universidad de Jaén 2019b.

Zeisel SH. Regulation of “Nutraceuticals”. Science 1999; Vol 285: 1853-1855. doi: 10.1126/science.285.5435.1853.

Zienkiewicz A, Jiménez-López JC, Zienkiewicz K, Alché JD, Rodríguez-García MI. Development of cotyledon cells during olive (*Olea europaea L*) *in vitro* seed germination and seedling growth. Protoplasma 2011a; 248: 751-765. doi: 10.1007/s00709-010-0242-5.

Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Ben Ali S, Castro AJ, Rodríguez-García MI, Alché JD Evaluación de la digestibilidad *in vitro* de proteínas de almacenamiento de semillas del tipo 11S en el olivo. En: Actas del XV Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2011. Foro del olivar y el medio ambiente OLI-18. Edición: Fundación del Olivar 2011b. ISBN: 978-84-938900-0-1.

Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Rejón JD, Alché Jde D, Castro AJ, Rodríguez-García MI. Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. J Exp Bot. 2014; 65(1):103-15. doi: 10.1093/jxb/ert355.

Zohary D and Spiegel-Roy P. Beginnings of fruit growing in the Old World. Science 1975; 187:319-327.

8. ANEXOS

8.1 Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
AKT	Protein quinasa B
ANOVA	ANalysis Of VAriance, análisis de la varianza
AOV	Aceite de Oliva Virgen
AOVE	Aceite de Oliva Virgen Extra
AOVO	Aceite de Oliva Virgen Optimizado
ASEMESA	Asociación Española de Exportadores e industriales de Aceitunas de Mesa.
BMI	Body Mass Index, índice de masa corporal
CAT	Catalasa
CCL	Chemokine, citoquina quimiotáctica
CCR	Chemokine Receptor, receptor de citoquina quimiotáctica
CO₂	Dióxido de carbono
COI	Consejo Oleícola Internacional
CORDIS	COmmunity Research and Development Information Service, Servicio de información para la comunidad de investigación y desarrollo
CSE	Council of Science Editors, Consejo de Editores Científicos
DHA	DocosaHexaenoic Acid, ácido docosahexaenoico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbeco
DTT	DiThioThreitol, ditiotreitól
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid, ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	EicosaPentaenoic Acid, ácido eicosapentaenoico
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrición, investigación prospectiva europea en cáncer y nutrición
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations, Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
FOO	Functional Olive Oil; aceite de oliva funcional
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor, factor estimulante de colonias de granulocitos
GLUT	GLUcose Transporter Protein, proteína transportadora de glucosa
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
GSH	Glutatión reducido
HRP	HorseRadish Peroxidase, peroxidasa de rábano picante
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule, molécula de adhesión intercelular.
IL	Interleuquina o Interleucina
IMC	Índice de Masa Corporal
IMPEL	European Union Network for the IMplementation and Enforcement of Environmental Law, red de la Unión Europea para la implementación y la aplicación de la ley ambiental.
INF-γ	INterFeron gamma, interferon gamma
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase, óxido nítrico sintasa inducible
IO	IONomicine, ionomicina
IR-C	Insulin Resistant Cells, células resistentes a insulina
IRS	Insulin Receptor Substrate, sustrato receptor de insulina
LPS	LipoPolySaccharide from <i>E. coli</i> , lipopolisacárido de <i>E. coli</i>
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1, proteína quimiotáctica del monocito 1
MIP	Macrophage Inflammatory Protein, proteína inflamatoria de macrófago.

MIP-1β	Macrophage Inflammatory Protein 1 β , proteína inflamatoria del macrófago 1 β
miRNA	micro RiboNucleic Acid, micro ácido ribonucleico
MTT	3-(4,5- diMeTilTiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol) bromide, bromuro de 3-(4,5- diMeTilTiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol)
NF-kB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Nitric Oxyde, óxido nítrico
NOS	Nitric Oxide Synthase, óxido nítrico sintasa
OVOO	Optimized Virgin Olive Oil, aceite de oliva virgen optimizado
PANC-1	human PANcreatic cancer Cell line, línea celular de cáncer de páncreas humano
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, célula mononuclear de sangre periférica.
PBS	Phosphate Buffered Saline, tampón fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PGE2	ProstaGlandin E2, prostaglandina E2
PHA	PhytoHaemAgglutinin; fitohemaglutinina
PI3K	PhosphatidyIInositol 3 kinase, fosfoinositol 3 quinasa
PIC	Protease Inhibitor Cocktail, cóctel inhibidor de proteasas
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, ácido forbol 12-mirístico 13-acético,
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride, Ffluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride, polifluoruro de vinilideno
Q-PCR	Quantitative Polimerasa Chain Reaction, reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa
RAW 264.7	Murine macrophage-like cell line, linea celular con afinidad a macrofago murino.
RIPA	RadiolImmunoPrecipitation Assay, ensayo de radioinmunoprecipitación
ROS	Reactive Oxygen Species, especies de oxígeno reactivo
SCS	Seven Countries Study, estudio siete países
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate, dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with SDS, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SOD	SuperOxide Dismutase, superóxido dismutasa
T2D	Type-2 Diabetic patients; pacientes diabéticos tipo 2
TBS	Tris Buffered Saline, tampón Tris salino
TBS-T	Tris Buffered Saline - Tween [®] 20, tampón Tris salino con Tween [®] 20
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha; Factor de necrosis tumoral alfa
TRIS	TRIS (hydroxymethyl)aminomethane, trisminometano
VOO	Virgin Olive Oil; aceite de oliva virgen

8.2 Figuras y Tablas

FIGURAS

Figura 1	Distribución mediterránea de olivos primigenios y olivos relacionados.	Pag. 12
Figura 2	Olivo de la variedad picual. Terrenos calizos en Villanueva de las Torres	Pag. 13
Figura 3	Partes de una drupa de olivo	Pag. 14
Figura 4	Producción mundial de aceites vegetales. Datos de Oil World.	Pag. 16
Figura 5	Distribución de la producción mundial de olivo. Base de datos de FAO, 2017	Pag. 16
Figura 6	Producción mundial de aceite de oliva. COI 2018	Pag. 17
Figura 7	Tipos de Extracción oleícola en 1999. Número de almazaras.	Pag. 21
Figura 8	Tipos de molturación de aceituna en países europeos	Pag. 21
Figura 9	Fraccionamiento industrial de la aceituna	Pag. 23
Figura 10	Esquema de la distribución histológica de la semilla de olivo	Pag. 24
Figura 11	Deshuesadora industrial	Pag. 25
Figura 12	Semillas maduras de <i>O. Europaea</i> cv. 'picual' y productos de su transformación.	Pag. 42
Figura 13	Diagrama gráfico de los grupos de intervención diseñados en el proyecto NUTRAOLEUM, y esquema de recogida de las muestras.	Pag. 44
Figura 14	La sangre de los sujetos sanos fue incubada con LPS, PHA, PMA+IO, gráfica de IL-1 β (A) e iNOS (B)	Pag. 86
Figura 15	La sangre de sujetos diabéticos fue incubada con LPS, PHA, PMA+IO, gráfica de IL-1 β (A) e iNOS (B)	Pag. 86

TABLAS:

Tabla 1	Tabla comparativa sobre superficies y rendimientos de cultivo por comunidad autónoma. Datos de Gobierno de España.	Pag. 18
Tabla 2	Características de los aceites de oliva administrados en el estudio NUTRAOLEUM.	Pag. 41
Tabla 3	Características del grupo de estudio sobre efectos antiinflamatorios de harinas purificadas de semilla de olivo en pacientes diabéticos	Pag. 85

8.3 Resoluciones Comité de Ética de la Investigación



D. Miguel Ángel Calleja Hernández Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Centro de Granada (CEI-GRANADA)

CERTIFICA

Que este Comité ha analizado la propuesta de la Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental, Alejandro Otero (FIBAO) para que se realice el Protocolo de Investigación titulado: "Nuevos Procesos en la Industria Almazarera Andaluza para la Elaboración de Nuevos Productos de Alto Valor Biológico con Aplicaciones en Salud Humana. El Estudio Nutraoleum" y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del proyecto en relación con los objetivos del estudio.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este centro.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el Dr. Blas Gil Extremera del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario San Cecilio de Granada como investigador principal en el mismo y colaboradores.

Lo que firmo en Granada a cuatro de diciembre de dos mil trece.

Dr. Miguel Ángel Calleja Hernández

Firmado.

DICTAMEN ÚNICO EN LA COMUNIDAD AUTÓNOMA DE ANDALUCÍA

D/D^a: Juan Morales Arcas como secretario/a del CEI de Granada.

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de (No hay promotor/a asociado/a) para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Evaluación de la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de componentes agroalimentarios alternativos procedentes del procesamiento de la aceituna.

Protocolo, Versión:
 HIP, Versión:
 CI, Versión:

Y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se ajusta a los principios éticos aplicables a este tipo de estudios.

La capacidad del/de la investigador/a y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Están justificados los riesgos y molestias previsibles para los participantes.

Que los aspectos económicos involucrados en el proyecto, no interfieren con respecto a los postulados éticos.

Y que este Comité considera, que dicho estudio puede ser realizado en los Centros de la Comunidad Autónoma de Andalucía que se relacionan, para lo cual corresponde a la Dirección del Centro correspondiente determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Lo que firmo en GRANADA a 09/05/2017

D/D^a: Juan Morales Arcas, como Secretario/a del CEI de Granada



Código Seguro De Verificación:	62b08bd827fde9955209eb426ff1b6d97872c268	Fecha:	09/05/2017		
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.				
Firmado Por	Juan Morales Arcas				
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/62b08bd827fde9955209eb426ff1b6d97872c268	Página	1/2		

CERTIFICA

Que este Comité ha ponderado y evaluado en sesión celebrada el 25/07/2016 y recogida en acta 7/2016 la propuesta del/de la Promotor/a (No hay promotor/a asociado/a), para realizar el estudio de investigación titulado:

TÍTULO DEL ESTUDIO: Evaluación de la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de componentes agroalimentarios alternativos procedentes del procesamiento de la aceituna.

Protocolo, Versión:

HIP, Versión:

CI, Versión:

Que a dicha sesión asistieron los siguientes integrantes del Comité:

Presidente/a

D/D^a. Fidel Fernández Quesada

Vicepresidente/a

D/D^a.

Secretario/a

D/D^a. Juan Morales Arcas

Vocales

D/D^a. Jesús Martínez Tapias

D/D^a. Juan Ramón Delgado Pérez

D/D^a. MARIA ESPERANZA DEL POZO GAVILAN

D/D^a. MAXIMILIANO OCETE ESPINOLA

D/D^a. Joaquina Martínez Galán

D/D^a. AURORA BUENO CAVANILLAS

D/D^a. Paloma Muñoz de Rueda

D/D^a. Manuel Gálvez Ibáñez

D/D^a. MARÍA DEL PILAR GONZÁLEZ CARRIÓN

D/D^a. Juan de Dios Luna del Castillo

D/D^a. Pilar Gujosa Campos

D/D^a. JUAN ROMERO COTELO

D/D^a. FRANCISCO LUIS MANZANO MANZANO

D/D^a. MIGUEL LÓPEZ GUADALUPE

Que dicho Comité, está constituido y actúa de acuerdo con la normativa vigente y las directrices de la Conferencia Internacional de Buena Práctica Clínica.

Lo que firmo en GRANADA a 09/05/2017.



Código Seguro De Verificación:	62b08bd827fde9955209eb426ff1b6d97872c268	Fecha:	09/05/2017	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la Ley 59/2003, de 19 de diciembre, de firma electrónica.			
Firmado Por	Juan Morales Arcas			
Url De Verificación	https://www.juntadeandalucia.es/salud/portaldeetica/xhtml/ayuda/verificarFirmaDocumento.iface/code/62b08bd827fde9955209eb426ff1b6d97872c268		Página	



**D. FIDEL FERNANDEZ QUESADA, EN CALIDAD DE PRESIDENTE
DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE
LA PROVINCIA DE GRANADA (CEIM/CEI GRANADA)**

CERTIFICA:

Que este Comité, revisados los archivos, y la aplicación peiba reseña que el proyecto titulado: ***“Descifrando las bases genéticas del nexo de unión entre alergias alimentarias y diabetes tipo 2”*** de Código IN16_BAS_0062 y nº ***Peiba 0748-N-2017*** fue evaluado por este Comité, siendo el investigador principal en el mismo el Dr. Víctor Alche Ramírez del AGS Nordeste de Granada (C. Villanueva de las Torres) considerando que,

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el proyecto.

Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

Lo que firmo en Granada, a nueve de julio de dos mil dieciocho.


Fdo.: Fidel Fernández Quesada



8.4 Publicaciones y comunicaciones presentados a congresos derivados de la presente Tesis

Publicaciones indexadas en JCR/WOS

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Rhonda C. Foley, Sofianos Andrikopoulos, Grant Morahan, Karam B. Singh, Juan D. Alché, Jose C. Jimenez-Lopez. Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.) β -Conglutin Proteins Modulate the Insulin Signaling Pathway as Potential Type 2 Diabetes Treatment and Inflammatory-Related Disease Amelioration. **Molecular Nutrition and Food Research** 61(5). 2017 Feb 13. doi: 10.1002/mnfr.201600819. Impact Factor (JCR/WOS) 5.151, 5/133 (Q1-D1) Food Science & TEchnology.

Lima-Cabello E, Morales-Santana S, Foley RC, Melser S, **Alché V**, Siddique KHM, Singh KB, Alché JD, Jimenez-Lopez JC. (2018). Ex vivo and in vitro assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius*. **Journal of Functional Foods**. 40:510-519. doi: 10.1016/j.jff.2017.11.040. Impact Factor (JCR/WOS) 3.144, 18/129 (Q1) Food Science & Technology (datos de 2016).

Elena Lima-Cabello, Sonia Morales-Santana, Josefa León, **Víctor Alché**, Alfonso Clemente, Juan de Dios Alché and Jose Carlos Jimenez Lopez. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β -conglutins reverse back the induced insulin resistance in pancreatic cells. **Food & Function**. 2018. 9: 5176-5188. DOI: 10.1039/c8fo01164h. Impact Factor (JCR/WOS) 3.289, 20/133 (Q1) Food Science & Technology (datos de 2017).

Otras publicaciones

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Adoración Zafra, Juan Pedro Sánchez-Rivas, Jose Carlos Jimenez-Lopez, Francisco Manuel Marco, Juan de Dios Alché. Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos. En: El aceite de oliva. Actas Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2017, Fundación del olivar-EXPOLIVA (Eds.), Jaén (Spain), pp. SAL-05. ISBN: 987-84-46839-1-6

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Jose C. Jimenez-Lopez, Antonia Pérez-Lázaro, Francisco J. Gómez-Jiménez, Antonio J. Castro, Juan D. Alché. Evaluación de distintos métodos para la evaluación de biomarcadores esenciales en experimentos de incubación ex vitro de sangre de pacientes con componentes del aceite de oliva. Libro de abstracts III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. 2018. Editorial Universidad de Jaén. Pp. 68-75. ISBN: ISBN: 978-84-09-07676-5.

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Jose C. Jimenez-Lopez, Juan D. Alché. Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en cultivos celulares pancreáticos. Libro de abstracts III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. 2018. Editorial Universidad de Jaén. Pp. 60-67. ISBN: ISBN: 978-84-09-07676-5.

Comunicaciones a congresos

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Adoración Zafra, Juan Pedro Sánchez-Rivas, Jose Carlos Jimenez-Lopez, Francisco Manuel Marco, Juan de Dios Alché. Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en pacientes diabéticos. Simposium Científico-Técnico EXPOLIVA 2017. 10-12 mayo 2017. Comunicación oral.

Elena Lima-Cabello, Mohammed M'rani-Alaoui, **Victor Alché**, Jose Carlos Jimenez-Lopez, Juan de Dios Alché. Anti-inflammatory effects of polyphenol fractions purified from argan oils. First simposium international sous les effets bénéfiques de l'huile d'argan sur la santé humaine. Errachidia (Maroc). 4-6 mai 2017. Comunicación oral.

Lima-Cabello, E.; Morales-Santana, S.; **Alché, V.**; Clemente, A.; Alché, J.D.; Jiménez-López, J.C. Blue lupin seed β -conglutin proteins reverse back the induced insulin resistance in pancreatic cells. 23rd National Symposium for Applied Biological Sciences (NSABS). 8 Febrero 2018. Bruselas. Bélgica. Comunicación Póster.

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Jose C. Jimenez-Lopez, Antonia Pérez-Lázaro, Francisco J. Gómez-Jiménez, Antonio J. Castro, Juan D. Alché. Evaluación de distintos métodos para la evaluación de biomarcadores esenciales en experimentos de incubación ex vitro de sangre de pacientes con componentes del aceite de oliva. III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. Jaén, 18-20 mayo 2018. Comunicación oral.

Elena Lima-Cabello, **Victor Alché**, Jose C. Jimenez-Lopez, Juan D. Alché. Efectos anti-inflamatorios de harinas purificadas de semillas de olivo en cultivos celulares pancreáticos. III Congreso Internacional sobre Aceite de Oliva Virgen, Olivar y Salud. Jaén, 18-20 mayo 2018. Comunicación oral.

Lima-Cabello, E., **Alché, V.**, Sánchez-Rodríguez, E., Biel-Glesson, S., Fernandez-Navarro, J.R., Calleja, M.A., Espejo-Calvo, J.A., Gil-Extremera, B., de la Torre, R., Montserrat Fito, M., Covas, M.I., Vílchez, P., Martínez de Victoria, E., Gil, A., Mesa, M.D. and Alché, J.D. In vivo and ex vivo assessment of the effects of different virgin olive oils on oxidative stress markers and pro-inflammatory mediators. XII GEIRLI meeting. Barcelona, 4-5 julio 2019. Comunicación oral.

Aparte de las fuentes agroalimentarias primarias habituales, actualmente es un reto de cara a la mejora en la nutrición, el diseño de vías alternativas de procesamiento de los alimentos básicos, la reutilización de subproductos, o el aislamiento de componentes esenciales de los alimentos y su potencial adición a otros, o incluso a los originales en distintas dosis. Crear o mejorar alimentos para hacerlos más funcionales son estrategias en amplia evolución.

El presente trabajo se basa en un uso alternativo de dos alimentos de uso ya establecido.

Por un lado, aprovechamos la nueva tendencia empresarial de fraccionar la aceituna antes de su procesado en las almazaras, para estudiar estos nuevos productos, como las harinas de semilla de olivo, que tienen un alto contenido en componentes nutricionales y propiedades nutraceuticas.

Por otra parte, el consumo de algunas especies de altramuz, tanto en forma de semillas como de harinas, han demostrado propiedades antidiabéticas, así como una función saciante que puede servir como herramienta contra la obesidad.

En el caso de la aceituna se ha tomado como base el estudio NUTRAOLEUM, en que se analizan los efectos sobre personas sanas, alimentadas con tres tipos de aceites de oliva, uno de ellos, aceite de oliva virgen extra y los otros dos enriquecidos en distintas proporciones de otros compuestos procedentes de aceitunas. En esta tesis se estudia la optimización de medios de cultivo ex vivo de la sangre de estos pacientes, con inducción artificial de inflamación y posterior estudio de la señalización intercelular.

En el caso de altramuz, se utilizaron proteínas recombinantes de 5 tipos, purificadas mediante cromatografía de afinidad. Estas proteínas se ensayaron en distintos sistemas biológicos ex vivo con sangre de sujetos sanos, diabéticos y pacientes con síndrome metabólico, así como cultivos in vitro de células pancreáticas en distintos escenarios, unas basales y otras con inducción de tolerancia insulínica. Se estudió la señalización intercelular mediante cuantificación de citoquinas.

