

tion. Four main groups have been identified: **i)** dynamic vesicles, mobilized during the first 10 s of stimulation, **ii)** delayed vesicles, the most abundant group, with displacement changes after 20-40 s of stimulation (**Figure 1E**); **iii)** uncoupled vesicles, which undergo mobility changes during the final period of stimulation; and **iv)** stable vesicles (no detectable mobility). Preliminary electrophysiological recordings indicate that cultured oxytocinergic neurons show slow depolarization kinetics, which could underlie the slow dynamics of OXT vesicles and their partial dependence to calcium influx. Our results revealed the existence of different groups of OXT vesicles, which are distinctly mobilized in response to the same stimulus, exposing an unknown feature that may be relevant for the fine tuning of behavior.

POLIFENOLES DE LA DIETA COMO POTENCIALES COADYUVANTES EN PATOLOGÍAS CARDIOMETABÓLICAS

DIETARY POLYPHENOLS AS POTENTIAL COADJUVANTS IN CARDIOMETABOLIC PATHOLOGIES

Jara Pérez-Jiménez

Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid

Las patologías cardiometabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2, las enfermedades cardiovasculares o el hígado graso no alcohólico han mostrado un enorme incremento durante las últimas décadas, convirtiéndose en un importante problema de salud pública. Aunque son patologías multifactoriales, que involucran múltiples procesos bioquímicos, se han mostrado a asociaciones fuertes y consistentes (tanto directas como inversas) entre su aparición y determinados hábitos alimentarios. Por esta razón, existe un gran interés en esclarecer de qué manera determinados componentes de la dieta pueden contribuir a la prevención o modulación de estas patologías.

Los polifenoles son un amplio grupo de compuestos químicos presentes en los alimentos de origen vegetal. Son potentes antioxidantes que inicialmente se conocían solo por esa actividad, pero investigaciones posteriores han demostrado que, de hecho, exhiben múltiples mecanismos de acción una vez ingeridos: inhibición enzimática, acciones epigenéticas, modulación de vías de señalización. Globalmente, estos efectos conducen a mejoras en la homeostasis de los glúcidos, la inflamación o el estrés oxidativo. Además, los polifenoles han presentando fuertes interacciones con la microbiota colónica en dos sentidos: estimulación del crecimiento de especies beneficiosas y generación, debido a la acción de las mismas, de nuevos metabolitos fenólicos biodisponibles, que son agentes clave en los efectos sobre la salud de los polifenoles.

Nuestro grupo de investigación se dedica al estudio de los polifenoles no extraíbles, que son compuestos fenólicos o bien de alto peso molecular o bien de bajo peso molecular asociados a macromoléculas como la fibra dietética. Hemos estudiado estos compuestos desde varias perspectivas: caracterización analítica de alimentos y subproductos ricos en polifenoles no extraíbles, evaluación de su ingesta en diferentes poblaciones, estudio de su metabolismo y evaluación de sus efectos en la salud. En este sentido, hemos realizado varios ensayos clínicos en sujetos con riesgo cardiometabólico, encontrando que estos compuestos son capaces de mejorar el perfil lipídico en sujetos con hipercolesterolemia, o la insulina en ayunas en sujetos con al menos dos factores de síndrome metabólico. Además, hemos explorado el papel potencial del perfil de la microbiota y los miARNs circulantes en la respuesta a la suplementación con polifenoles no extraíbles, con objeto de poder explicar la alta variabilidad interindividual observada. Nuestro objetivo actual es determinar si la suplementación aguda con polifenoles no extraíbles, utilizando materiales alimenticios seleccionados ricos en estos compuestos, es capaz de mejorar la homeostasis de la glucosa postprandial en sujetos con diabetes tipo 2.

Por tanto, la evidencia científica actual, obtenida por nuestro grupo de investigación y muchos otros que trabajan en el tema, muestra que los polifenoles son constituyentes dietéticos prometedores que pueden ser utilizados como coadyuvantes en patologías como la diabetes tipo 2, permitiendo un retraso en las múltiples alteraciones bioquímicas asociadas con la progresión de la enfermedad.

Agradecimientos: Agencia Estatal de Investigación (AGL2014-55102-JIN, RTI2018-095059-B-I00), con cofinanciación de fondos FEDER (UE).

Cardiometabolic pathologies, such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases or non-alcoholic fatty liver disease have widely increased during last decades, becoming a major public health problem. Although they are multifactorial pathologies, involving several biochemical processes, they have shown strong and consistent associations (both in direct and inverse modes) with certain dietary habits. For this reason, there is a wide interest in the elucidation on how specific dietary constituents may contribute to the prevention or modulation of these pathologies.

Polyphenols are a wide group of chemical compounds present in food of vegetal origin. They are potent antioxidants but, although they were initially known just because of that activity, further research has shown that, indeed, they exhibit several mechanisms of action once ingested: enzyme inhibition, epigenetic actions, modulation of signalling pathways. Overall, these effects lead to improvements in glucid homeostasis, inflammation or oxidative stress. Additionally, polyphenols have strong interactions with colonic microbiota in two senses: stimulation of the growth of beneficial species and, due to the action of these microbes, generation of new bioavailable metabolites, which are key agents in the health effects of polyphenols.

Our research team is devoted to the study of non-extractable polyphenols, which are either high molecular weight or low molecular weight phenolic compounds associated with macromolecules such as dietary fibre. We have studied these compounds from several perspectives: analytical characterization of foods and byproducts rich in non-extractable polyphenols, evaluation of their intake in different populations, characterization of their metabolic fate and assessment of their health effects. In this sense, we have conducted several clinical trials in subjects at cardiometabolic risk, finding that these compounds are able to improve lipid profile in hypercholesterolemia subjects or fasting insulin in subjects with at least two factors of metabolic syndrome. Moreover, we have explored the potential role of microbiota profile and circulating miRNA in the response to non-extractable polyphenol supplementation, with the aim of understanding the high inter-individual variability which was observed. Our current aim is to determine whether the acute supplementation with non-extractable polyphenols, using selected food materials rich in these compounds, is able to improve postprandial glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes.

Therefore, current scientific evidence, obtained by our research team and many others working on the topic, show that polyphenols are promising dietary constituents able to be used as coadjuvants in pathologies such as type 2 diabetes, allowing a delay in the multiple biochemical alterations associated with the progression of the disease.

Acknowledgments: Spanish Research Agency (AGL2014-55102-JIN, RTI2018-095059-B-I00), with co-funding from FEDER funds (EU).

PAPEL DE LOS MICRORNAS EN LA RESPUESTA A UNA SUPLEMENTACIÓN CON ORUJO DE UVA EN EL CONTROL GLUCÉMICO

INVOLVEMENT OF MICRORNAS IN THE RESPONSE TO GRAPE POMACE SUPPLEMENTATION REGARDING GLUCOSE HOMEOSTASIS

Léniz A^{1,2,3,4}, Matínez-Maqueda D⁵, Fernández-Quintela A^{2,3,4}, Pérez-Jiménez J⁵, Portillo M^{2,3,4}

¹ Araba Integrated Health Care Organization, Basque Health Service (Osakidetza)

² Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy and Lucio Lascaray Research Center, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria, Spain

³ Bioaraba Health Research Institute, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

⁴ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBER-OBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain

⁵ Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de síntomas caracterizado por hipertensión, niveles altos de triglicéridos y bajos de HDL, obesidad e hiperglucemia. Aunque no se trate de una enfermedad *per se*, es un importante contribuyente al desarrollo de otras patologías como la diabetes de tipo 2 o los eventos cardiovasculares, presentando una prevalencia estimada del 30% en la sociedad occidental. Los mecanismos que originan el SM no han sido descritos en su totalidad. Se sabe que algunas moléculas bioactivas presentes en la dieta tienen efectos beneficiosos en el debut y el pronóstico de este síndrome. Entre dichas moléculas cabe destacar los compuestos fenólicos presentes en uvas.

Los microRNAs (miRNAs) son fragmentos (18-22 nucleótidos) de RNA no codificantes que actúan modificando el proceso de traducción o degradando el mRNA. Pueden regular hasta el 30% de las reacciones metabólicas del organismo y se pueden encontrar en la circulación sanguínea, considerándose por ello biomarcadores de fácil acceso.

Por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el posible papel de los miRNAs en los mecanismos de acción que median en los efectos beneficiosos del orujo de uva (subproducto de vinificación rico en polifenoles) en el control glucémico de pacientes con riesgo cardiometabólico y su papel en la variabilidad interindividual de la respuesta al producto.

Para ello, se llevó a cabo un estudio de intervención aleatorizado y cruzado en el que se suplementó con orujo de uva la dieta habitual de 49 sujetos con al menos dos factores de SM durante un periodo de 6 semanas. A continuación, los participantes fueron clasificados entre respondedores y no respondedores según la mejora observada en los niveles de insulina (**Figura 1**). Se extrajeron muestras de sangre antes y después de la suplementación, se aisló el mRNA de las muestras y se determinó la expresión de miRNAs mediante secuenciación de nueva generación en una submuestra. Los cambios observados se confirmaron en todas las muestras mediante RT-PCR y se buscaron dianas de los miRNAs mediante análisis bioinformático.

Se observó que el miR-222 y el miR-30c, que están relacionados con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, disminuyeron su expresión tras la suplementación en sujetos respondedores, considerándose importantes mediadores en el aumento de la glucólisis, captación de glucosa y captación de glucosa por el músculo (**Figura 2**). Además, los respondedores presentaron mayores concentraciones de miR-122 y consecuentemente, lo que se traduciría en menores niveles de piruvato quinasa y receptor de la adiponectina 1 (**Figura 3**).

Por tanto, se puede concluir que los miRNAs miR-222 y miR-30c tienen un papel fundamental en los efectos beneficiosos de una suplementación con extracto de uvas en el control glucémico de personas con SM. Además, el miR-222 se puede considerar un biomarcador de respuesta de estos pacientes al tratamiento con orujo de uva.

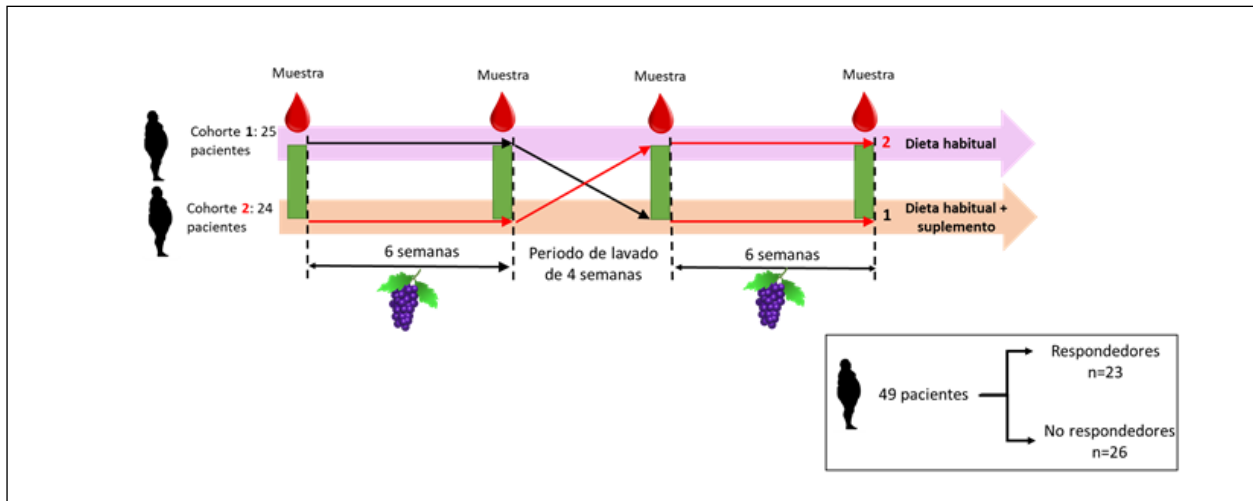


Figura 1. Diseño experimental del estudio de intervención aleatorizado y cruzado. Modificado de Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

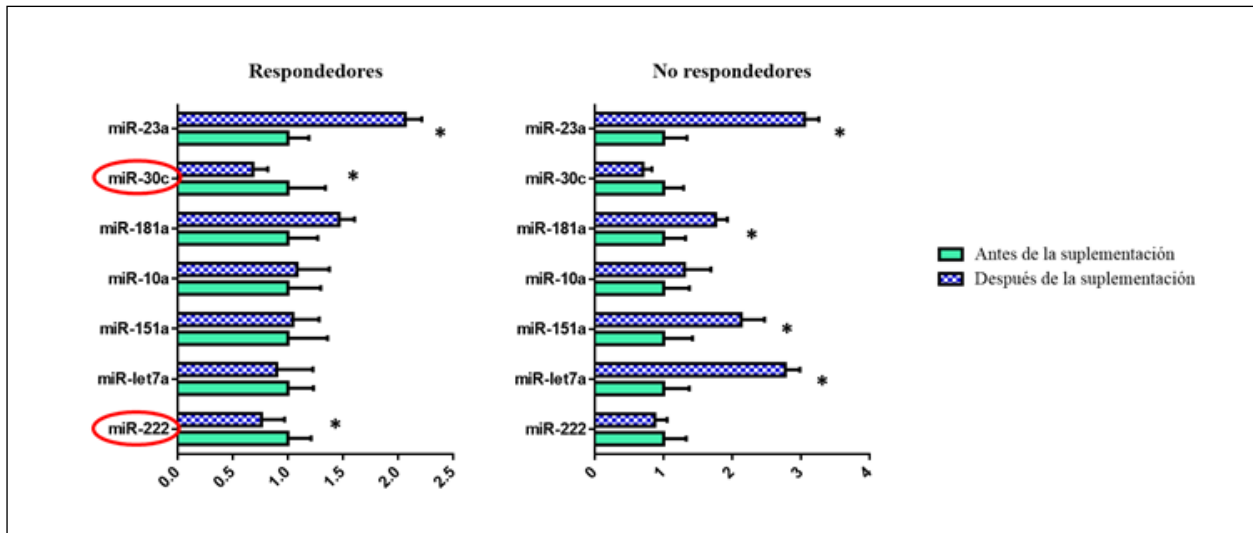


Figura 2. Diferencias en la expresión de miRNAs antes y después de la suplementación en respondedores y no respondedores, en función de la reducción de los niveles de insulina basal tras la suplementación. *P<0,05. Modificado de Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

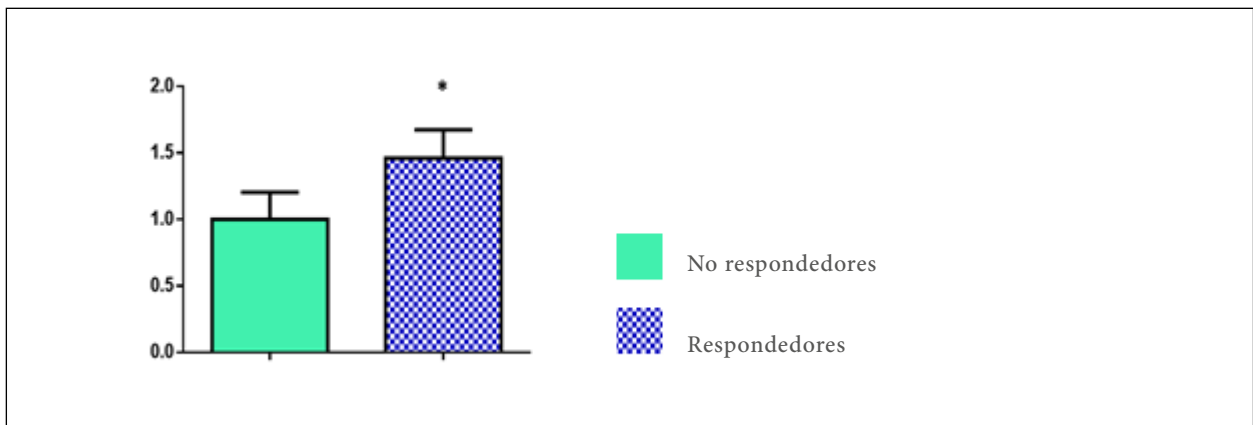


Figura 3. Diferencias en la expresión de miR-222 entre sujetos respondedores y no respondedores, según su reducción de la insulina basal tras la suplementación. *P<0,05. Modificado de Ramos-Romero S, Léniz A et al. Mol Nutr Food Res.2021 Jan;65(2):e2000113.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (MINNECO-FEDER, AGL2014-55102-JIN), Universidad del País Vasco GIU18-173 e Instituto de Salud Carlos III (CIBERobn).

Metabolic syndrome (MetS) is a cluster of risk factors characterized by hypertension, high triglyceride and low HDL levels, obesity and hyperglycaemia. Despite the fact that it is not a disease by itself, it is a major contributor to the appearance of cardiovascular diseases or type 2 diabetes mellitus, presenting an estimated prevalence of 30% in Western.

Mechanistic processes underlying the development of MetS have not been fully elucidated. Some bioactive molecules naturally present in the diet have demonstrated to have beneficial effects in the management of the progression of the MetS; such is the case of phenolic compounds, which can be found in grapes.

MicroRNAs (miRNAs) are small (usually 18-22 nucleotides long) non-coding RNAs able either to modify the translation process or to degrade mRNA. Almost 30% of human biochemical processes are estimated to be regulated by miRNAs. They can be found in peripheral blood, being considered easily accessible biomarkers.

Thus, the aim of this study was to analyse the potential involvement of miRNAs in the mechanisms of action underlying the positive effect of a grape pomace (a polyphenol-rich byproduct from wine making) supplementation in patients with cardiometabolic risk and their role in the inter-individual variability in the response to that supplementation.

To achieve that objective, an intervention randomized cross-over study was carried out,

where the habitual diet of 49 subjects with at least two MetS factors was supplemented with grape pomace for 6 weeks. Then, participants were classified between responder and non-responders, according to the reduction in fasting insulin after the treatment (Figure 1). Blood samples were extracted before and after the supplementation and were frozen until further analysis. mRNA was isolated from the samples and miRNA expression was determined through Next Generation Sequencing in a reduced number of individuals (n=6 per group). Differential expression of miRNAs changes were confirmed by RT-PCR in the whole cohort, and miRNAs' targets were assessed by bioinformatics analysis.

It was observed that miR-222 and miR-30c, which are known to be related to insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, were downregulated after the supplementation in responder subjects, being important contributors to the increase of glycolysis and glucose uptake in skeletal muscle (Figure 2). Furthermore, patients who showed a positive response to the treatment presented higher concentration of miR-222, and thus, lower levels of pyruvate kinase and adiponectin receptor 1 (Figure 3).

Therefore, it can be concluded that miR-222 and miR-30c play a pivotal role in the beneficial effects in glucose homeostasis of a grape pomace supplementation in subjects with MetS. Moreover, miR-222 can be proposed as a biomarker to predict the response of these patients to the nutritional treatment with grape pomace.

Acknowledgements: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINNECO-FEDER, grants AGL2014-55102-JIN), University of the Basque Country (GIU18-173) and Carlos III Research Institute (CIBERobn).

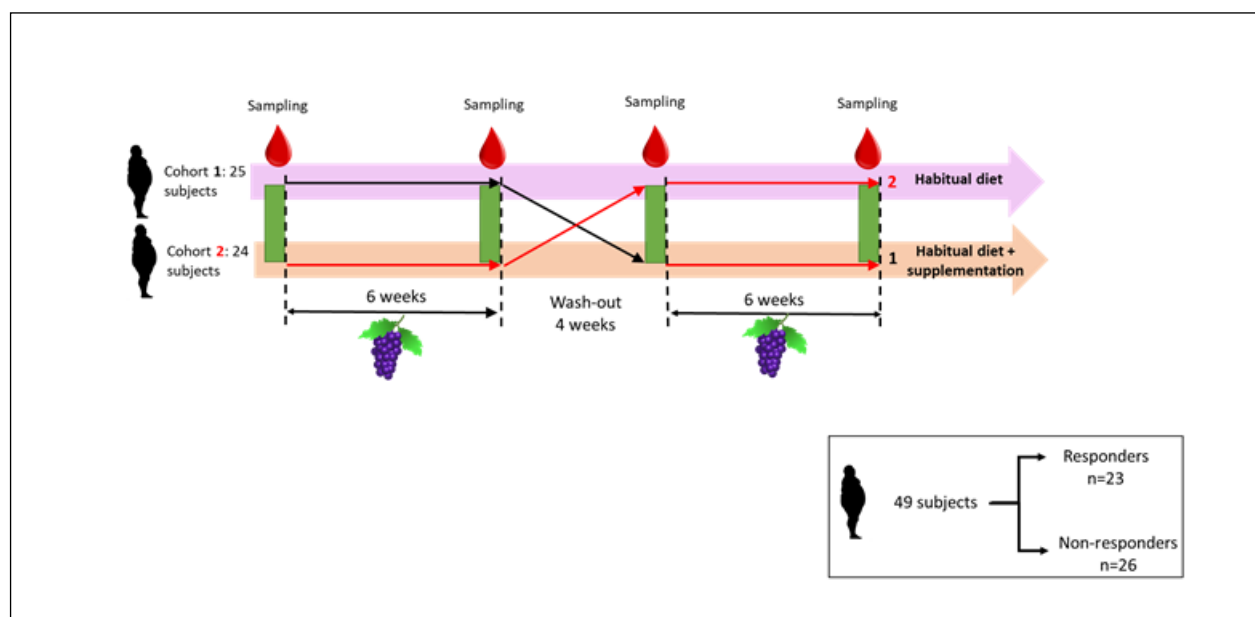


Figure 1. Experimental design of the randomized cross-over study. Modified from Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

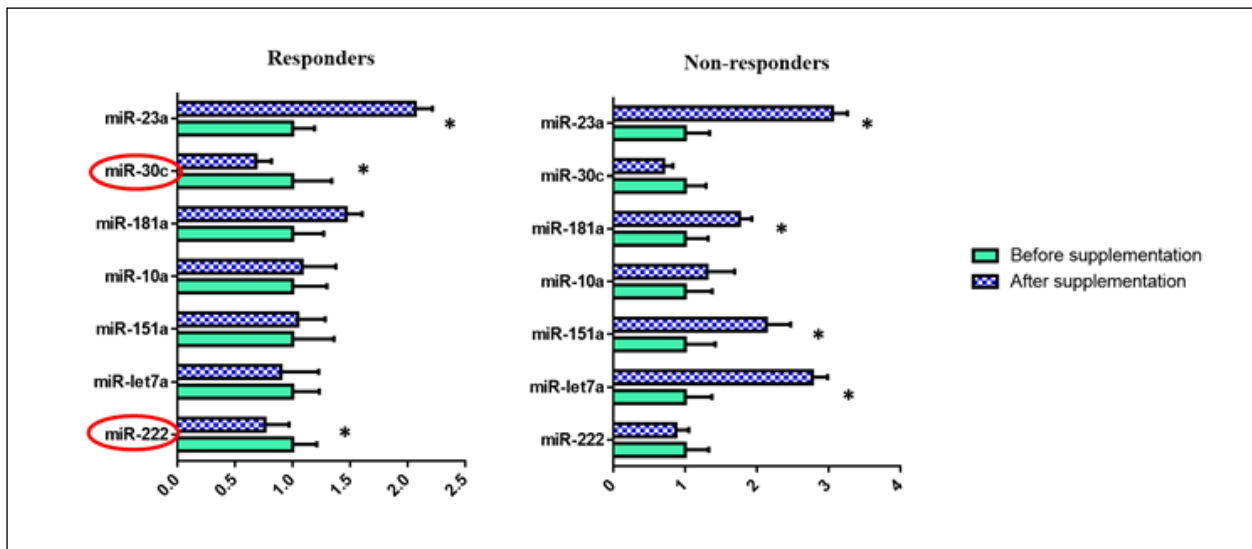


Figure 2. Differentially expressed miRNAs before and after supplementation in responder and non-responder subjects based on fasting insulin reduction after supplementation..

* $P < 0,05$. Modified from Léniz A et al. Foods 2021, 10, 2059.

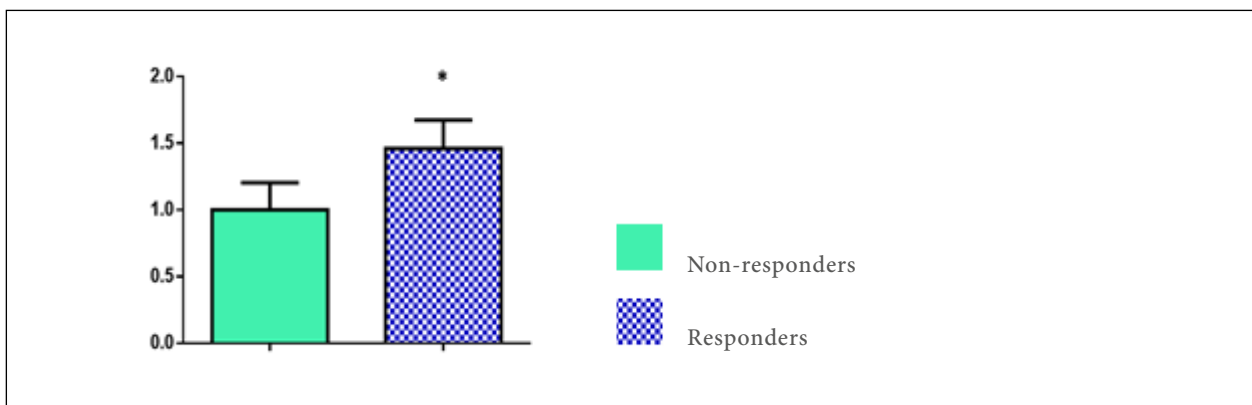


Figura 3. Differences in the expression of miR-222 between responder and non-responder subjects based on fasting insulin reduction after supplementation.

* $P < 0,05$. Modified from Ramos-Romero S, Léniz A et al. Mol Nutr Food Res.2021 Jan;65(2):e2000113.

EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL EFECTO DE LOS FLAVANOLES EN EL METABOLISMO POSTPRANDIAL DE SUJETOS CON DIABETES TIPO 2

PRELIMINARY EVALUATION OF FLAVANOL EFFECTS ON POSTPRANDIAL METABOLISM IN SUBJECTS WITH TYPE 2 DIABETES

Esther García-Díez¹, María Ángeles Martín^{1,2}, José Ignacio Vicente-Díez³, Sara García-Cabrera³, Sonia Ramos¹, Jara Pérez-Jiménez¹

¹ Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid

² CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid,

³ Centro de Salud Monóvar, Gerencia Asistencial de Atención Primaria, Servicio Madrileño de Salud, Madrid.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se ha convertido en la enfermedad metabólica con mayor prevalencia mundial. Su desarrollo se debe principalmente a defectos en la secreción o acción de la insulina. Esto provoca hiperglucemia crónica, cuyo mal control acaba originando una alteración del perfil lipídico (aumento de los triglicéridos y en ocasiones aumento del colesterol LDL y disminución del colesterol HDL), junto con inflamación y estrés oxidativo, procesos exacerbados en el estado postprandial. En la actualidad, existe un gran interés en el estudio de aproximaciones dietéticas para retrasar o modular las alteraciones asociadas a esta patología. Así, los polifenoles son compuestos antioxidantes presentes en alimentos de origen vegetal, existiendo una evidencia creciente sobre su potencial (tanto para los compuestos intactos como para los metabolitos colónicos) en la modulación de la DMT2 por

diversos mecanismos de acción, como la inhibición de enzimas digestivas, o la estimulación de la secreción de insulina.

Para probar los efectos de los polifenoles de la dieta -concretamente flavanoles de alto peso molecular- en el metabolismo postprandial de sujetos con DMT2, se ha diseñado un producto fácilmente incorporable a la dieta habitual. Se trata de una mezcla de cacao puro y harina de algarroba en una proporción 60:40. Presenta un alto contenido en polifenoles ($16,7 \pm 0,6$ g/100 g), donde aproximadamente el 70% son flavanoles, y en fibra dietética ($55,7 \pm 0,9$ g/100 g). El producto se ha validado en un análisis sensorial hedónico ($n=100$) donde se comparó con otros preparados comerciales con distintos porcentajes de cacao (22%, 70% y 100%). En este análisis, la mezcla de cacao y algarroba fue calificada como aceptable, con puntuaciones en algunos parámetros similares a las de productos comerciales, aumentando la calificación al realizar un segundo análisis sensorial en el que se proporcionaba información adicional sobre sus posibles efectos en salud.

Esta mezcla de cacao y algarroba será evaluada en un ensayo clínico nutricional aleatorizado y cruzado con un tamaño muestral de 25 sujetos (variable principal, insulina postprandial). En el ensayo se recogerán muestras de sangre, orina y heces -además de cuestionarios de saciedad- con objeto de estudiar las modificaciones postprandiales a) tras un desayuno rico en grasa y azúcares (control); b) tras ingerir al mismo tiempo el desayuno y el producto; y c) tras tomar el producto diez horas antes del desayuno (asociadas al efecto de los metabolitos colónicos). El ensayo clínico está actualmente en fase de reclutamiento, habiéndose inscrito hasta el momento doce sujetos con las siguientes características basales (media \pm DS): edad, $60,5 \pm 5,1$ años; índice de masa corporal, $31,1 \pm 3,2$ kg/m²; hemoglobina glicosilada, $6,1 \pm 0,4$ %; todos ellos siguiendo tratamiento exclusivo con metformina como antidiabético.

Se espera que este ensayo clínico aporte resultados preliminares sobre el potencial de los polifenoles de alto peso molecular en la modulación de las alteraciones postprandiales presentes en la DMT2.

Agradecimientos: Agencia Estatal de Investigación (RTI2018-095059-B-I00), con cofinanciación de fondos FEDER (UE). Consejería de Educación, Juventud y Deporte de la Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo (PEJ-2020-AI/BIO-18529).

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) has become the metabolic disease with the highest worldwide prevalence. Its development is mainly due to defects in the secretion or action of insulin. This causes chronic hyperglycaemia, whose bad control may originate alterations in lipid profile (increase in triglycerides and sometimes also

in LDL cholesterol, together with a decrease in HDL cholesterol), together with inflammation and oxidative stress, processes that are exacerbated in the postprandial state. At present, there is great interest in the study of dietary approaches to delay or modulate the alterations associated with this pathology. In this context, polyphenols are antioxidant compounds present in foods of plant origin, with growing evidence on their potential (as intact compounds and as metabolites generated by the intestinal microbiota) for modulating T2DM by various mechanisms of action, such as the inhibition of digestive enzymes, or the stimulation of insulin secretion, among others.

In order to evaluate the effects of dietary polyphenols - specifically high molecular weight flavanols - on the postprandial metabolism of subjects with T2DM, a product easily incorporated into the usual diet was designed. It is a mixture of pure cocoa and carob flour in a 60:40 ratio. It has a high content in polyphenols (16.7 ± 0.6 g / 100 g), where approximately 70% are flavanols, and in dietary fiber (55.7 ± 0.9 g / 100 g). The product was validated in a hedonic sensory analysis ($n=100$) where it was compared with other commercial preparations with different percentages of cocoa (22%, 70% and 100%). In this analysis, the cocoa and carob mixture was rated as acceptable, with scores in some parameters similar to those of commercial products. Indeed, the rating was increased when performing a second sensory analysis in which additional information was provided on the potential health effects of the product.

This cocoa-carob mixture will be evaluated in a randomized, crossover nutritional clinical trial. For this, a sample size of 25 subjects has been established, taking postprandial insulin as the primary outcome. In the trial, blood, urine and faecal samples will be collected -in addition to satiety questionnaires- in order to study postprandial modifications a) after a high-fat high-sugar breakfast (control); b) after eating breakfast and the product at the same time; and c) after taking the product ten hours before breakfast (associated with the effect of the colonic metabolites). The clinical trial is currently in the recruitment phase, having enrolled twelve subjects with the following baseline characteristics (mean \pm SD): age, 60.5 ± 5.1 years; body mass index, 31.1 ± 3.2 kg / m²; glycated haemoglobin, 6.1 ± 0.4 %; all of them following exclusive treatment with metformin as antidiabetic drug.

This clinical trial is expected to provide preliminary results on the potential of high molecular weight polyphenols in modulating postprandial changes in T2DM.

Acknowledgments: Spanish Research Agency (RTI2018-095059-B-I00), with co-funding from FEDER funds (EU). Department of Education, Youth and Sports of Madrid Region (CM) and European Social Fund (PEJ-2020-AI/BIO-18529).