



# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Moléculas bioactivas de origen animal y vegetal para modular la función endotelial, homeostasis e inflamación en condiciones patológicas. Biopéptidos y oxilipinas.

Autora:

Sara M<sup>a</sup> Martínez Sánchez

Directores:

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Dra. Dña. Silvia Montoro García

Murcia, enero de 2020





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Moléculas bioactivas de origen animal y vegetal para modular la función endotelial, homeostasis e inflamación en condiciones patológicas. Biopéptidos y oxilipinas.

**Autor:**

Sara M<sup>a</sup> Martínez Sánchez

**Directores:**

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Dra. Dña. Silvia Montoro García

Murcia, enero de 2020



La presente tesis adopta el formato de **COMPENDIO DE PUBLICACIONES**. En ella se recogen una síntesis de conceptos derivados de trabajos de revisión bibliográfica, estudios *in vitro* e *in vivo*. El compendio consta de tres artículos ya publicados y uno en vías de publicación. A continuación, se recogen los artículos ya publicados.

#### **ARTÍCULO 1:**

Martínez-Sánchez, S.M., Gabaldón-Hernández, J.A., Montoro-García, S. (2020). **Unravelling the Molecular Mechanisms Associated with the Role of Food-derived Bioactive Peptides in Promoting Cardiovascular Health**. *Journal of Functional Foods*, 64, 103645. DOI:10.1016/j.jff.2019.103645

Factor de impacto 2018 (JCR): 3.197; Categoría (JCR): FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY; Clasificación: 16/133 (Q1); Fecha de publicación: 2020.

#### **ARTÍCULO 2:**

Martínez-Sánchez, S. M., Minguela, A., Prieto-Merino, D., Zafrilla-Rentero, M. P., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2017). **The Effect of Regular Intake of Dry-Cured Ham Rich in Bioactive Peptides on Inflammation, Platelet and Monocyte Activation Markers in Humans**. *Nutrients*, 9(4). DOI:10.3390/nu9040321

Factor de impacto 2018 (JCR): 4.171; Categoría (JCR): NUTRITION & DIETETICS; Clasificación: 16/87 (Q1); Fecha de publicación: 2017.

#### **ARTÍCULO 3:**

Martínez-Sánchez, S. M., Pérez-Sánchez, H., Gabaldón, J. A., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2019). **Multifunctional Peptides from Spanish Dry-Cured Pork Ham: Endothelial Responses and Molecular Modeling Studies**. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). doi:10.3390/ijms20174204

Factor de impacto 2018 (JCR): 4.183; Categoría (JCR): BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY; Clasificación: 78/298 (Q1); Fecha de publicación: 2019.

**ARTÍCULO 4:**

Martínez-Sánchez, S., Domínguez-Perles, R., Montoro-García, S., Gabaldón-Hernández, J.A., Guy, A., Durand, T., Galano, J.M., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A. **Outlining the in vitro Bioaccessibility, Bioavailability and Bioactivity over the Endothelium of *Gracilaria longissima* Oxylipins.** (ENVIADO). *Food & Function*.

Factor de impacto 2018 (JCR): 3.241; Categoría (JCR): FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY; Clasificación: 31/135 (Q1).



# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández y la Dra. Dña. Silvia Montoro García como Directores de la Tesis Doctoral titulada "Moléculas bioactivas de origen animal y vegetal para modular la función endotelial, homeostasis e inflamación en condiciones patológicas. Biopéptidos y oxilipinas." realizada por Dña. Sara M<sup>a</sup> Martínez Sánchez en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 20 de enero de 2020.

D. José Antonio Gabaldón

Dña. Silvia Montoro García





## RESUMEN

**TÍTULO: Moléculas bioactivas de origen animal y vegetal para modular la función endotelial, homeostasis e inflamación en condiciones patológicas. Biopéptidos y oxilipinas.**

**Introducción:** Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayor causa de morbilidad y mortalidad en Europa. Los diferentes factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, diabetes, dislipemia y obesidad ejercen una importante influencia para el desarrollo de estas enfermedades. De entre los factores de riesgo modificables, la dieta es la que mayor influencia ejerce en la prevención. Los péptidos bioactivos (BPs) son pequeñas secuencias peptídicas que suelen contener entre 2 y 20 residuos aminoacídicos, se liberan mediante la hidrólisis de proteínas de alimentos ya sean de origen animal o vegetal, a través de múltiples procesos industriales o naturales: fermentación, curación o hidrólisis enzimática, entre otros. La gran capacidad de estas secuencias peptídicas para interactuar con distintas proteínas/receptores a lo largo del organismo se debe fundamentalmente a su bajo peso molecular, su alta biodisponibilidad, y a un comportamiento molecular flexible. Así, se han descrito BPs con diversas actividades como antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatorio, agonista opioide, antiobesogénicas... desarrollando múltiples funciones a la vez, lo cual ha llevado a acuñar el término de “péptidos multifuncionales”. Por otra parte, las oxilipinas son compuestos lipídicos vegetales de reciente descubrimiento que derivan de la ruta del ácido araquidónico. Se han descrito en diversos tipos de plantas entre las que se encuentran las algas y sus funciones están relacionadas con la desintoxicación, la respuesta al estrés, y la secreción de metabolitos secundarios en la planta. La oxidación no enzimática del ácido  $\alpha$ -linolénico, conduce a dos series de fitoprostanos (FitoPs) incluyendo 16 isómeros cada una, teóricamente sintetizados a partir de los lípidos de membrana de las células vegetales. Su similitud con las prostaglandinas humanas podría ser la base de su actividad en humanos, ya que han demostrado poseer capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora *in vitro*.

**Objetivos:** El principal objetivo de la presente Tesis ha sido evaluar los efectos de estos dos tipos de moléculas bioactivas (péptidos y oxilipinas) con una estructura química muy diferente en el sistema cardiovascular. Para ello, en la primera parte, se evaluaron los mecanismos de acción de los BPs derivados de jamón curado sobre la hemostasia y la disfunción endotelial mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*. Posteriormente, se han caracterizado cuali- y cuantitativamente las oxilipinas presentes en el alga roja comestible *Gracilaria longissima*. De igual manera, se ha evaluado su biodisponibilidad y su bioactividad mediante un modelo de disfunción endotelial *in vitro*.

**Resultados:** Se realizó un ensayo clínico, voluntarios (n=38) sanos prehipertensos fueron reclutados en un ensayo controlado aleatorio cruzado de dos brazos en el que recibieron 80 g/día de jamón de cerdo curado de >11 meses de proteólisis o 100 g/día de jamón cocido (producto placebo) durante 4 semanas cada uno. Tras el consumo regular del producto de intervención rico en BPs caracterizados, se observaron una notable variación de marcadores de membrana de activación plaquetaria (P-selectina) y de monocitos (MCP-1), así como una notable disminución de biomarcadores del estado inflamatorio (IL-6) y protrombótica (P-selectina soluble).

Mediante un posterior ensayo *in vitro*, se utilizaron cuatro péptidos (KPVAAP, KAAAATP, KPGRP y AAATP) previamente caracterizados en el jamón curado y con actividad inhibitoria de la ECA (IECA) previamente caracterizada. Se analizó el IC<sub>50</sub> de estos BPs para la ECA humana y se realizaron estudios *in silico* para confirmar la afinidad por esta enzima. Destacamos también que la incubación de células endoteliales humanas con estos BPs, previno significativamente la expresión de genes relacionados con la disfunción endotelial y la inflamación (eNOS, ICAM-1, VCAM-1, IL-6) y redujo la activación del NF- $\kappa$ B ( $p < 0,05$ ). En los acoplamientos *in silico* se confirmó que los cuatro BPs podrían interactuar con la subunidad reguladora NEMO del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el mismo sitio en que otros inhibidores caracterizados (región CC2-LZ) lo hacen. Este es el primer estudio que une enfoques experimentales y computacionales para demostrar que el NF-B es la diana real de BPs de origen alimentario.

Por último, se realizaron extractos hidrometanólicos del alga roja comestible *Gracilaria longissima* con el objetivo de caracterizar su contenido en oxilipinas. Para analizar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos FitoPs y FitoFs, se realizaron digestiones gastrointestinales *in vitro*. Posteriormente, se evaluó la permeabilidad y metabolismo de estos compuestos en un sistema celular en monocapa mediante un ensayo *in vitro* con células humanas colorectales Caco-2. Los compuestos que permanecieron tras la digestión presentaron una buena permeabilidad. La bioactividad de estos compuestos se evaluó en el mismo modelo de disfunción endotelial que para los BPs. Se midieron pues cambios en la expresión génica de los marcadores ICAM-1, VCAM-1, IL-6 y eNOS. Los extractos ricos en oxilipinas disminuyeron significativamente la expresión de ICAM-1 y la IL-6 en condiciones inflamatorias. El análisis de correlación realizado en esta Tesis podría esclarecer la relación de cada compuesto aislado con la actividad observada.

**Conclusiones:** Los péptidos multifuncionales del jamón curado de cerdo presentan un potencial uso terapéutico para atenuar el proceso inflamatorio aterosclerótico.

Por otro lado, las oxilipinas vegetales también parecen ejercer una actividad en el sistema cardiovascular humano, aunque es difícil establecer concretamente en qué dirección. En este sentido futuros enfoques de modelización podrían complementar los estudios *in vitro*.

**Palabras claves:** Biopéptidos, Jamón Curado, Oxilipinas, *Gracilaria sp.*, Disfunción Endotelial, ECA, Inflamación, Biodisponibilidad.



## ABSTRACT

**TITLE: Bioactive molecules of animal and vegetable origin to modulate endothelial function, homeostasis and inflammation in pathological conditions. Biopeptides and oxylipins.**

**Introduction:** Cardiovascular disease is the largest cause of morbidity and mortality in Europe. Different cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes, dyslipidemia and obesity have an important influence on the development of these diseases. Among the modifiable risk factors, diet has the greatest influence on the prevention of these diseases. Bioactive peptides (BPs) are small peptide sequences that usually contain between 2 and 20 amino acidic residues. They are released by the hydrolysis of food proteins, either of animal or vegetable origin, through multiple industrial or natural processes: fermentation, heating or enzymatic hydrolysis, among others. The ability of these BPs to interact easily with very distinct proteins/receptors in the body is mainly due to their low molecular weight, high bioavailability, and flexible molecular behavior. Thus, BPs with diverse activities such as antihypertensive, antioxidant, anti-inflammatory, opioid agonist, antiobesogenic... developing multiple functions at the same time have been described, which has led to the term "multifunctional peptides". On the other hand, oxylipins are recently discovered vegetable lipidic compounds that derive from the arachidonic acid route. They have been described in various types of plants among which algae are found and their functions are related to detoxification, stress response, and the secretion of secondary metabolites in the plant. The non-enzymatic oxidation of  $\alpha$ -linolenic acid, leads to two series of phytoprostanes (PhytoPs) including 16 isomers each, theoretically synthesized from the plant cell membrane lipids. Their similarity to human prostaglandins could be the basis of their activity in humans, as they have been shown to possess anti-inflammatory and immunomodulatory capacity *in vitro*.

**Objectives:** This Thesis aims to investigate the effects of these two types of bioactive molecules (peptides and oxylipins) with a very different structure on the cardiovascular system. To this end, in the first part, the mechanisms of action of BPs derived from cured ham on hemostasis and endothelial dysfunction were evaluated by means of *in vivo* and *in vitro* assays. Subsequently, the oxylipins present in the edible red algae *Gracilaria longissima* were characterized qualitatively and quantitatively. Their bioavailability and bioactivity have also been evaluated using an *in vitro* endothelial dysfunction model.

**Results:** A clinical trial was conducted, healthy mild-hypertensive volunteers (n=38) were recruited into a two-arm randomized controlled crossover trial in which they received 80 g/day of dry-cured pork ham with >11 months of proteolysis or 100 g/day of cooked ham (placebo product) for 4 weeks. After

regular consumption of this intervention product rich in characterized BPs, a remarkable variation of platelet activation membrane markers (P-selectin) and monocyte (MCP-1) was observed, as well as a remarkable decrease of biomarkers of inflammatory (IL-6) and thrombotic (soluble P-selectin) status.

By means of a subsequent *in vitro* test, four peptides (KPVAAP, KAAAATP, KPGRP and AAATP) previously characterized in the cured ham and with previously confirmed ACE inhibitory activity (ACEI) were used. We analyzed the IC<sub>50</sub> of these BPs for human ACE and conducted studies *in silico* to further explain the affinity for this enzyme. It should also be noted that the incubation of human endothelial cells with these BPs significantly prevented the expression of genes related to endothelial dysfunction and inflammation (eNOS, ICAM-1, VCAM-1, IL-6) and reduced the activation of NF- $\kappa$ B ( $p < 0.05$ ). By *in silico* couplings it was confirmed that the four BPs could interact with the NEMO regulatory subunit of the NF- $\kappa$ B transcriptional factor in the same site as other characterized inhibitors (CC2-LZ region) do. This is the first study that put together experimental and computational approaches to demonstrate that NF- $\kappa$ B is a real target of food-borne BPs.

Finally, methanolic extracts were prepared from the edible red algae *Gracilaria longissima* in order to characterize its oxylipin content. The bioaccessibility and bioavailability of these PhytoPs and phytofurans (PhytoFs) were performed with *in vitro* gastrointestinal digestions. Subsequently, the permeability and metabolism of these compounds were evaluated in a monolayer cell system by means of another *in vitro* test with human colorectal Caco-2 cells. The compounds that remained after digestion showed good permeability. The bioactivity of these compounds in the endothelial dysfunction model already mentioned was also assessed. Finally, the bioactivity of the hydromethanolic extracts was evaluated by measuring changes in gene expression of the markers ICAM-1, VCAM-1, IL-6 and eNOS. The oxylipin-rich extracts significantly decreased the expression of ICAM-1 and IL-6 under inflammatory conditions. The correlation analysis performed in this Thesis could clarify the relationship of each isolated compound with the observed activity.

**Conclusions:** The multifunctional peptides of dry-cured pork ham might have a potential therapeutic use to attenuate the atherosclerotic inflammatory process.

On the other hand, vegetable oxylipins also seem to exert an activity in the human cardiovascular system, although it is difficult to establish specifically in which direction. In this sense, future modelling approaches could complement *in vitro* studies

**Keywords:** Biopeptides, Cured ham, Oxylipins, *Gracilaria spp.*, Endothelial dysfunction, ACE, Inflammation, Bioavailability.

## AGRADECIMIENTOS

Cuando se llega al final de un camino, es inevitable mirar atrás para agradecer a todas aquellas personas que han formado parte de él de una forma u otra. “Yo soy yo y mis circunstancias”, decía Ortega y Gasset, y sin esas circunstancias el resultado podría haber sido bien distinto.

Empezaré por el principio, gracias a Dios quien nos regala la vida y la libertad de decidir qué hacer con ella. Gracias a aquellos que me trajeron al mundo y que me transmitieron los valores necesarios para moverme por esta vida. Gracias mamá y papá por enseñarme que el amor es la fuerza para llegar a todo y por apoyarme en cada decisión. Gracias mamá por enseñarme el amor por el conocimiento, la naturaleza, “el arjé” de las cosas, la ilusión por todo, la curiosidad es la base del conocimiento científico. Gracias papá por enseñarme el valor de la constancia, el trabajo bien hecho y la honradez, tan necesarios para lograr cualquier empresa. Gracias a cada uno de mis hermanos: Mar, Abel, Jaim e, Daniel, David y Ángela, sin vosotros no sería la persona que soy ahora.

A la Universidad Católica de Murcia, por acogerme en el programa de doctorado y proveerme de una beca para la realización de la tesis.

A mis directores, Silvia Montoro y José Antonio Gabaldón por la oportunidad que me brindaron y por estar pendientes de mí en todo momento.

Silvia, gracias por darme la oportunidad de empezar. Me siento muy afortunada porque no me pudo tocar mejor persona al lado para este proyecto, quien me ha apoyado en todos los momentos tanto profesionales como personales, de quien he tenido la suerte de aprender, codo con codo, en el trabajo diario. Te has convertido en mucho más que mi directora de tesis. Gracias, gracias, gracias, no hay páginas en una tesis que puedan mostrar la gratitud que siento.

A José Antonio Gabaldón, quien me dio la oportunidad de continuar, me acogió en un grupo de investigación consolidado donde aprendo todos los días. Gracias a los dos, sobre todo por este último mes de trabajo duro, me he sentido tremendamente acompañada y apoyada.

A mis tutoras de doctorado, Sonia y Pepa, por estar siempre pendientes de mis dudas.

A mis compañeros de día a día, los del comienzo: Estefanía, Isa, José, Vicente a los que siempre guardaré un cariño especial y las que siguieron Teresa, María, Rebeca, Victoria, Cristina, Cindy, José, Ramiro, Iván, por ser compañeros de fatigas y estar en los buenos y malos momentos que nos brinda el precioso trabajo al cual nos dedicamos. Teresa, gracias por esa alegría y esa disposición que me han levantado en los momentos más oscuros. Ya lo dijiste un día “lo

mejor del doctorado el compartirlo con vosotras” doy gracias por haberos encontrado. María gracias por esas charlas profundas y reparadoras.

A Gabi y José, por toda la ayuda prestada en el día a día del laboratorio.

Al IMIB y CEBAS por acogerme en las estancias nacionales en las que tanto aprendí.

A Toñi y Juana del SAI, por poner a mi disposición el equipamiento necesario con esas ganas y ese cariño.

Gracias a mi familia en la fe, mi comunidad, que hemos encontrado en Murcia, habéis sido un pilar para nosotros en tantos momentos...

Y, por último, precisamente por ser lo más importante, a Migue, mi compañero de vida, mi marido. Has sabido entender en qué consiste este trabajo y apoyarme siempre. Gracias a nuestras preciosas hijas Marinela, Irene y a quien viene de camino, que tanto nos enseñan cada día. Sois mi motor por el que hago todas las cosas. Gracias por hacerlo posible, por estos años que han sido los más intensos, pero a la vez hermosos de nuestra vida. Nos hemos hecho grandes, fuertes. Esta tesis es el resultado de una etapa investigadora que ha llevado inmersa la etapa de crecimiento personal más grande de nuestra vida. Con vosotros todo, siempre.



**“Da siempre lo mejor de ti... y lo mejor vendrá”  
Madre Teresa de Calcuta**



## ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES	
RESUMEN/ABSTRACT	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE DE FIGURAS .....	21
ÍNDICE DE ANEXOS.....	23
SIGLAS Y ABREVIATURAS .....	25
<b>I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
1.IMPORTANCIA DE LA NUTRICIÓN EN LA SALUD	
CARDIOVASCULAR.....	29
2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	33
2.1. Efectos antihipertensivos.....	36
2.2. Inflamación, ruta del NF- $\kappa$ B y estrés oxidativo.....	47
2.3. Diferenciación de adipocitos y control glucémico.....	52
2.4. Enfoques <i>in-silico</i> .....	55
3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN EL JAMÓN CURADO.....	57
4. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ORIGEN VEGETAL.....	60
4.1 Fitoprostanos y Fitofuranos.....	61
<b>II OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>III. COMPENDIO DE ARTÍCULOS.....</b>	<b>73</b>

<b>ARTÍCULO 1.....</b>	<b>75</b>
Martínez-Sánchez, S.M., Gabaldón-Hernández, J.A., Montoro-García, S. (2020). <b>Unravelling the Molecular Mechanisms Associated with the Role of Food-Derived Bioactive Peptides in Promoting Cardiovascular Health.</b> <i>Journal of Functional Foods</i> , 64, 103645.	
<b>ARTÍCULO 2.....</b>	<b>91</b>
Martínez-Sánchez, S. M., Minguela, A., Prieto-Merino, D., Zafrilla-Rentero, M. P., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2017). <b>The Effect of Regular Intake of Dry-Cured Ham Rich in Bioactive Peptides on Inflammation, Platelet and Monocyte Activation Markers in Humans.</b> <i>Nutrients</i> , 9(4).	
<b>ARTÍCULO 3.....</b>	<b>105</b>
Martínez-Sánchez, S. M., Pérez-Sánchez, H., Gabaldón, J. A., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2019). <b>Multifunctional Peptides from Spanish Dry-Cured Pork Ham: Endothelial Responses and Molecular Modeling Studies.</b> <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 20(17).	
<b>ARTÍCULO 4.....</b>	<b>123</b>
Martínez-Sánchez, S., Domínguez-Perles, R., Montoro-García, S., Gabaldón-Hernández, J.A., Guy, A., Durand. T., Galano, J.M., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A. <b>Outlining the in vitro Bioaccessibility, Bioavailability and Bioactivity over the Endothelium of <i>Gracilaria longissima</i> Oxylipins.</b> (ENVIADO). <i>Food &amp; Function</i> .	
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>139</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>157</b>
<b>VI. LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>161</b>
<b>VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>165</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Mecanismos de acción propuestos para los BPs en el sistema cardiovascular. Estos compuestos pueden afectar a las condiciones como la inflamación, obesidad o incluso la diabetes. (Li, Liu et al. 2018).</i> .....	36
<b>Figura 2.</b> <i>Esquema simplificado de la regulación de la presión arterial. Modificado de Gallego, Mora et al. 2018.</i> .....	37
<b>Figura 3.</b> <i>Estructura química de PGE2 y E1-FitoP que comparten la capacidad de polarizar la respuesta inmune al TH2 pro-alérgico (Medina, Gil-Izquierdo et al. 2018).</i> .....	62
<b>Figura 4.</b> <i>Estructura química de la prostaglandina A1 y deoxy-J2 y de los FitoPs A1, B1, y deoxy-J1 compartiendo la capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria mediada por NF-kB. (Medina, Gil-Izquierdo et al. 2018).</i> .....	63
<b>Figura 5.</b> <i>Relación de FitoProstanos y FitoFuranos caracterizados en el alga roja <u>Gracilaria longissima</u> en la presente tesis.</i> .....	149



**ÍNDICE DE ANEXOS**

<b>ANEXO-1: COMITÉ ÉTICO PARA EL ENSAYO CLÍNICO.....</b>	<b>183</b>
<b>ANEXO-2: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS.....</b>	<b>185</b>





## SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ALA: Ácido  $\alpha$ -linolénico  
Ang II: Angiotensina II  
ARNm: Transcrito primario del ácido ribonucleico  
AT<sub>1</sub>R: Receptor de Angiotensina I  
AT<sub>2</sub>R: Receptor de Angiotensina II  
BP: Biopéptido  
BSA: Albúmina Sérica Bovina  
CAT: Catalasa  
CMLV: Células del músculo liso vascular  
COX: Ciclooxygenasa  
CV: Cardiovascular  
DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium  
DMSO: Dimetilsulfóxido.  
ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina  
ECV: Enfermedad Cardiovascular  
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria  
eNOS: Óxido Nítrico Sintasa Endotelial  
FitoF: Fitofurano  
FitoP: Fitoprostano  
FRCV: Factores de Riesgo Cardiovascular  
FBS: Suero fetal bovino  
FSC/SSC: Forward-scattered light/ Side-scattered light  
AH: Ácido hipúrico  
HHL: Hipuril Histidil Leucina  
HsIL-6: High-Sensitivity Interleukin-6  
IC<sub>50</sub>: Concentración Inhibitoria 50  
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1  
IECA : Actividad inhibitoria de la ECA  
IKK: I $\kappa$ B kinase  
IL-6: Interleukina-6

IMC: Índice de Masa Corporal  
iNOS: Óxido Nítrico Sintasa Inducible  
LPS : Lipopolisacárido Bacteriano  
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1  
MDA: Malón dialdehído.  
MIF: Mean Fluorescence Intensity  
Mon: Monocito  
NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción Nuclear - $\kappa$ B  
nNOS: Óxido Nítrico Sintasa Neuronal  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
 $\alpha$ -LDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas  
PBS: Phosphate Buffer Saline  
PGE2: Prostaglandina E2  
PPAR- $\gamma$ : Receptor proliferador de peroxisomas  $\gamma$   
PVDF: Polyvinylidene Difluoride  
RCV: Riesgo Cardiovascular  
RHE: Ratas con hipertensión espontánea  
SDF1: Factor derivado del estroma-1  
SRA: Sistema Renina-Angiotensina  
TLR4: Toll-Like Receptor 4  
TNF-  $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ .  
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

# **I - INTRODUCCIÓN**



## I-INTRODUCCIÓN

### 1. IMPORTANCIA DE LA NUTRICIÓN EN LA SALUD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la mayor causa de morbilidad y mortalidad en Europa, siendo responsables de más de 3,9 millones de muertes al año, o, dicho de otro modo, el 45% de todas las muertes causadas por enfermedad (Wilkins et al. 2017).

Los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) tradicionales son bien conocidos por la población general: hipertensión, dislipemia, *diabetes mellitus*, tabaco y obesidad. No en vano, en gran parte de la población occidental se ha generalizado el sobrepeso y la obesidad, suponiendo un problema socio-sanitario muy grave (Gutierrez-Fisac, Lopez et al. 2004). La obesidad mórbida presenta grandes repercusiones metabólicas, mecánicas y estéticas, y aparece asociarse con otras enfermedades graves, a un aumento de la mortalidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la obesidad se considera como la epidemia del siglo XXI (OMS, 2000), dado que está produciendo un gran impacto sobre la morbimortalidad, la calidad de vida y el gasto sanitario (Grundy, 2008).

No obstante, existen también causas genéticas, así como la edad, que no pueden ser modificadas y que contribuyen al desarrollo de la patología cardiovascular. Así, el envejecimiento de la población en los países desarrollados es una realidad incuestionable, derivada en gran medida de los avances alcanzados en política sanitaria, seguridad alimentaria y desarrollo sociocultural. De hecho, se espera que el porcentaje de personas con más de 65 años en 2050 alcance el 33,2% de la población total, posicionando a España como el segundo país con más personas longevas del mundo tras Japón, superando la esperanza de vida los 80 años. La OMS, describe a la población de edad avanzada como uno de los colectivos más vulnerables desde el punto de vista nutricional, debido a

diferentes factores de riesgo, entre ellos la disminución de la ingesta, que aceleran el desarrollo de ciertas patologías. Durante el envejecimiento, se producen una serie de cambios fisiológicos —pérdida de masa muscular, menor tasa metabólica y simultáneamente, reducción de la actividad física—, que modifican sus requerimientos nutricionales. Además de los cambios fisiológicos, también influye en las carencias nutricionales, la falta de información en el ámbito de la nutrición, las discapacidades, la falta de autonomía, los escasos medios económicos, el desinterés por la alimentación, la soledad, el aislamiento social o el deterioro cognitivo.

En estos procesos deletéreos es fundamental el control de la dieta y la práctica regular de actividad física, potenciando el envejecimiento activo, con el fin de mejorar al máximo la salud y su capacidad funcional, contribuyendo a que los individuos adopten estilos de vida más saludables, especialmente con la perspectiva de mejorar las condiciones frente a la mayor incidencia en trastornos crónicos y otras patologías asociadas a la edad adulta y la obesidad, destacando entre ellas el deterioro global del sistema vascular y su implicación directa en la generación de otras patologías, como la ECV, que constituyen las principales preocupaciones del segmento de población entre los 40-65 años.

Los principales FRCV contribuyen a la patogénesis de la aterosclerosis, ya que promueven el estrés oxidativo y una subsecuente disfunción endotelial, iniciada con una cascada de eventos como son la liberación y expresión de mediadores vasoactivos, respuestas inflamatorias, y remodelado vascular. Discutiremos en detalle la patología molecular de las ECV más adelante.

La OMS estima que el consumo de 400 g/día de frutas y verduras podrían prevenir gran parte de las enfermedades crónicas (Hertog, Feskens et al. 1993), entre las que destacan las ECV, el cáncer, la *diabetes mellitus* y la obesidad. Así, diferentes estudios epidemiológicos apuntan a ciertas moléculas presentes en vegetales y frutas (vitaminas, antioxidantes, compuestos fenólicos y pigmentos vegetales), como responsables del efecto protector frente al daño celular, constituyendo una gran promesa para mejorar la salud y prevenir las ECV y algunos tipos de cáncer (Benavente-García and Castillo 2008).

En este sentido, la nutrición es considerada una de las herramientas más efectivas y constituye la primera línea de tratamiento para combatir los FRCV modificables como son:

- **Hipertensión arterial.** Se recomienda mantener los niveles por debajo de 120 y 80 mm de mercurio (mmHg) de presión sistólica y diastólica, respectivamente. Si bien entre 130/80 y 140/90 mmHg se diagnostica al sujeto como pre-hipertensos, cuando estos valores superan los 140/90 mmHg se considera que el sujeto presenta hipertensión arterial. Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que cuanto menores son las cifras de presión arterial, menor es el daño vascular y por lo tanto, menor riesgo cardiovascular (RCV) (Wang, Lee et al. 2006).
- **Diabetes mellitus.** Los pacientes con diabetes presentan de 2 a 4 veces más riesgo de morbimortalidad cardiovascular si los comparamos con individuos con los mismos FRCV pero sin diabetes (Bertoluci and Rocha 2017). El informe de la OMS sobre la Diabetes de 2016 estimó una prevalencia mundial de diabetes en adultos de 422 millones de personas en 2014, pasando del 4,7% en 1980 al 8,5% en 2014, con el mayor incremento en los países de ingresos medios y bajos (OMS, 2016).
- **Dislipemia.** Existe una relación positiva muy significativa entre los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas transportadoras de colesterol y el RCV (Grundy, Cleeman et al. 2004).
- **Obesidad.** La obesidad consiste en un exceso de acumulación de grasa. Se considera sobrepeso un índice de masa corporal (IMC) >25 Kg/m<sup>2</sup> y obesidad >30 Kg/m<sup>2</sup>. Existe una relación entre el IMC y la mortalidad. Fundamentalmente, el cúmulo de grasa abdominal se relaciona con un mayor riesgo coronario, por lo que la medida del diámetro de la cintura nos da una idea más precisa del RCV (Despres, Lemieux et al. 2008).

Por otro lado, la apreciada “Dieta Mediterránea” representa un ejemplo de alimentación y hábitos de vida saludables para el sistema cardiovascular. Ésta ha demostrado tener efectos anti-inflamatorios, antioxidantes y antiateroscleróticos, así como producir cambios favorables para la salud a través de la microbiota intestinal (Tuttolomondo, Simonetta et al. 2019). La definición de esta dieta es

heterogénea y, debido a su complejidad, puede considerarse como una exposición con miles de nutrientes y fitoquímicos. La dieta mediterránea se compone de una ingesta diaria de productos vegetales (frutas, verduras, legumbres, cereales y semillas), cantidades moderadas de productos lácteos y grasas saturadas, un alto consumo de pescado, moderadas cantidades de aves y bajo consumo de carnes rojas, con el aceite de oliva como principal fuente de grasa. Un reciente estudio nacional llevado a cabo en la Universidad Católica de Murcia (UCAM), relaciona la baja adherencia a la dieta mediterránea con una mayor incidencia de hipertensión arterial (Aleman, Rentero et al. 2016).

Por tanto, una alimentación inadecuada, unida a factores genéticos y baja actividad física aumenta de manera muy significativa la prevalencia de FRCV y suponen enormes costes para los sistemas sanitarios, estimados en billones de euros en Europa (Candari 2017). La sociedad entiende cada vez más que “somos lo que comemos”, por lo que en la última década ha crecido el interés por mejorar los hábitos dietéticos e incorporar alimentos funcionales o complementos alimenticios que mejoren la salud en general. Por ejemplo, alimentos que contienen además de los nutrientes básicos, moléculas biológicamente activas relacionadas con estrategias de prevención/promoción de la salud y con un potencial uso terapéutico y en determinadas condiciones (colesterol y glucemia elevados, ejercicio...), están poco a poco haciéndose hueco en el mercado. El tamaño del mercado mundial de alimentos funcionales se estimó en 161.490 millones de dólares en 2018 (Market Research Report 2019). Esto es un gran impulsor para la industria alimentaria que trabaja para conseguir alimentos funcionales que satisfagan las necesidades de un consumidor cada vez más exigente y que busca alimentos más saludables.

Así, muchas moléculas han sido estudiadas por sus potenciales efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular, entre las que destacan los esteroides vegetales, los compuestos fenólicos (Rangel-Huerta, Pastor-Villaescusa et al. 2015) y los péptidos. Un buen ejemplo de compuestos bioactivos con un potencial mercado son los ácidos grasos poliinsaturados y esteroides de plantas, ambos han dado lugar a alegaciones nutricionales aprobadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Los probióticos y prebióticos también son



considerados alimentos funcionales y han encontrado, igualmente, un nicho en el mercado actual en el contexto de una dieta funcional.

No obstante, la elaboración de alegaciones sanitarias dirigidas al consumidor debe cimentarse en base a un conocimiento científico y a una regulación legal. Esto limita mucho el número de alimentos funcionales comercializados, dado que es necesario que se demuestre primero un efecto *in vivo* significativo.

## 2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS.

Los péptidos bioactivos (BPs) son secuencias peptídicas que suelen contener entre 2 y 20 residuos de aminoácidos, y han sido ampliamente caracterizados a partir de diversas fuentes alimenticias: vegetales y animales, carne curada de cerdo, leche, salmón incluso cereales, legumbres, o algas (Udenigwe and Howard 2013, Daskaya-Dikmen, Yucetepe et al. 2017, Toldra, Reig et al. 2018). Estos péptidos se liberan mediante la hidrólisis de proteínas, a través de múltiples procesos industriales o naturales: fermentación, curación o hidrólisis enzimática, entre otros. Los BPs, si bien se encuentran en estado inactivo dentro de la proteína precursora, una vez liberados pueden ejercer distintas funciones fisiológicas en el organismo (Zambrowicz et al., 2013). La capacidad de estas pequeñas secuencias peptídicas para interactuar fácilmente con proteínas/receptores muy distintos en el organismo se debe fundamentalmente a su bajo peso molecular, su alta biodisponibilidad, y a un comportamiento molecular flexible (Figura 1). De hecho, en el organismo se encuentran de manera constitutiva otros péptidos endógenos que actúan como hormonas, neurotransmisores o péptidos reguladores. Ello da buena cuenta del potencial que presentan estas cortas secuencias peptídicas sobre diversas dianas en el organismo humano.

En los últimos años ha crecido el interés por la búsqueda de alimentos ricos en BPs beneficiosos para la salud, bien para su ingesta directa a través de la dieta, o para complementarla con estos BPs, utilizándolos como ingredientes en el desarrollo de alimentos funcionales. Se les atribuyen numerosas actividades entre las que destacan sus efectos sobre el sistema cardiovascular:

- **Efecto antihipertensivo.** La Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial. Los primeros péptidos estudiados como inhibidores de la ECA fueron encontrados en veneno de serpiente (Ondetti, Williams et al. 1971), y desde entonces numerosos estudios han ido enfocados a encontrar péptidos con dicha actividad *in vitro* (Miguel, Contreras et al. 2009, He, Malomo et al. 2013, Heo, Ko et al. 2017).
- **Efecto antioxidante.** El metabolismo oxidativo produce radicales libres que dañan las estructuras celulares provocando el deterioro del organismo y favoreciendo la aparición de enfermedades crónicas. Se han encontrado numerosos péptidos con capacidad de captar radicales libres, principalmente aquellos que poseen grupos hidrofóbicos. Varios estudios han mostrado que péptidos con capacidad de captar radicales *in vitro* también actúan en los sistemas reguladores oxidativos de la célula, analizado pues mediante técnicas *ex vivo* (Escudero, Aristoy et al. 2012, Huang, Shen et al. 2012).
- **Efecto antimicrobiano.** Se han descrito numerosos péptidos inhibitorios del crecimiento de microorganismos en alimentos de origen vegetal y animal. Son capaces de desestabilizar la membrana celular bacteriana y aumentar su permeabilidad (Reddy, Yedery et al. 2004).
- **Efecto de agonista/antagonista opioide.** Las características físico-químicas de los péptidos hacen que puedan acoplarse a receptores del sistema opioide, imitando los efectos de sus agonistas/antagonistas naturales. Se han encontrado sobre todo en proteínas de la leche, pudiendo modificar la permeabilidad intestinal o inducir el sueño, tener capacidad antisecretora o estimulante de la secreción de insulina o somatostatina (Teschmacher, Koch et al. 1997, Meisel 2005).
- **Efecto antiplaquetario.** Múltiples péptidos han mostrado un efecto sobre la agregación plaquetaria en etapas preclínicas de desarrollo de fármacos, constituyendo una posible alternativa terapéutica a los antiagregantes convencionales como la aspirina y el clopidogrel (Rengasamy, Khan et al. 2019).
- **Efecto antidiabético y antiobesidad.** Debido a sus propiedades, los BPs también pueden imitar la función de mediadores involucrados en el control

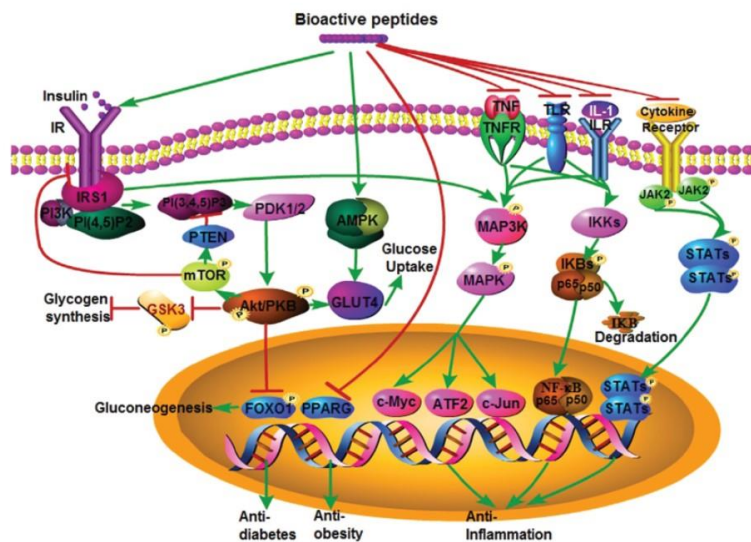
de la glucemia, actuando como incretina miméticos, inhibiendo la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), y sobre la acumulación de grasa (Ibrahim, Serem et al. 2018, Kumar 2019).

- **Efecto antiinflamatorio.** Se ha evidenciado que numerosos péptidos endógenos actúan como antiinflamatorios, y podrían considerarse alternativas seguras y sin los numerosos efectos adversos que presentan algunos tratamientos convencionales (corticoides) para enfermedades inflamatorias crónicas (La Manna, Di Natale et al. 2018). Además, péptidos derivados de diversos alimentos han demostrado actuar en algunas de las rutas de la inflamación, como veremos a lo largo de esta Tesis (Majumder, Chakrabarti et al. 2013, Zielinska, Baraniak et al. 2017, Salaga, Binienda et al. 2018)

Como resultado de esta versatilidad, los BPs parecen ejercer varias de estas actividades al mismo tiempo, de manera que recientemente ha aparecido el término de “multifuncional” (Lammi, Aiello et al. 2019). Sin embargo, cabe destacar que los mecanismos moleculares mediante los cuales ejercen estas acciones biológicas en el organismo humano, no han sido del todo descritos *in vivo*. Por lo que la mayoría de estas actividades biológicas han sido estudiadas en condiciones aisladas y modelos celulares (*in vitro*) y, en casos menos frecuentes, mediante ensayos *in vivo* con animales, habitualmente roedores.

Evidentemente, los estudios de mayor repercusión para la industria alimentaria son estudios clínicos con humanos, ya que sí podrían confirmar la amplia variedad de dianas biológicas de estos BPs. En algunos casos, determinados resultados *in vivo* se relacionaron también con ensayos observacionales, donde individuos que consumieron pequeñas dosis diarias de lactotripéptidos en su dieta, presentaron menor riesgo de desarrollar ECV en comparación con aquellos que consumieron menores dosis (Turpeinen et al., 2013). Más aún, los péptidos antihipertensivos identificados en leche fermentada se comercializan desde hace años en Japón (Nakamura et al., 1995). No obstante, es importante mencionar que los BPs también están sujetos a modificaciones significativas durante la digestión y absorción gastrointestinal, lo cual complica

los esfuerzos para identificar los metabolitos responsables del potencial efecto en humanos.



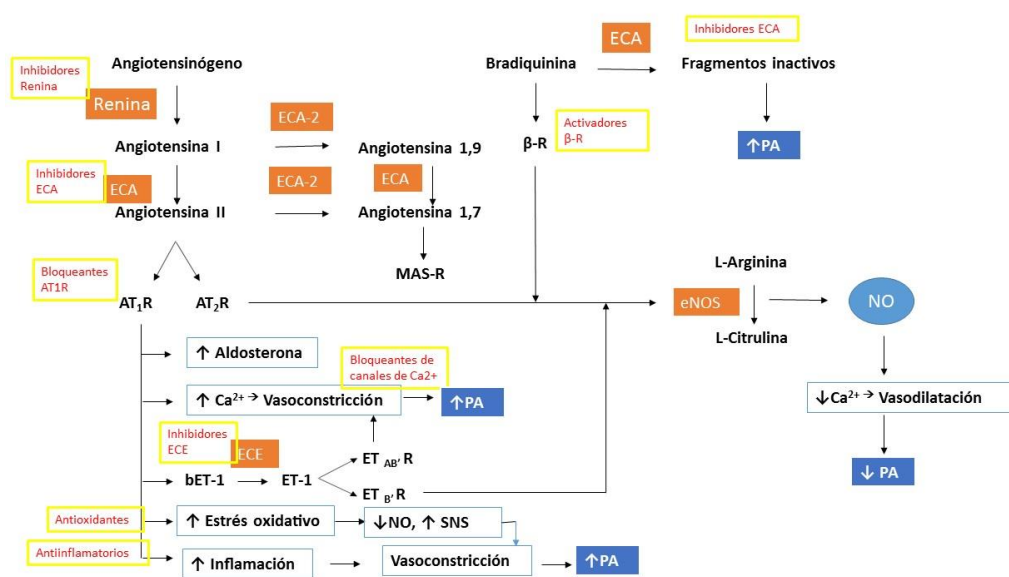
**Figura 1.** Mecanismos de acción propuestos para los BPs en el sistema cardiovascular. Estos compuestos pueden afectar a las condiciones como la inflamación, obesidad o incluso la diabetes. (Li, Liu et al. 2018).

A continuación, se detallan los mecanismos de acción más relevantes producidos por BPs derivados de alimentos, sobre el sistema cardiovascular.

## 2.1 Efectos antihipertensivos

Diversos estudios con roedores e *in vitro*, han permitido postular los mecanismos potenciales por los cuales, los BPs derivados de alimentos, pueden ejercer efectos reductores de la presión arterial. Entre estos mecanismos se encuentran, de manera resumida: la inhibición de la ECA (Martin and Deussen 2019), la inhibición de la renina (Aluko 2019), la vasodilatación mediada por óxido nítrico (ON) (Hirota, Nonaka et al. 2011), y el aumento de la respuesta antioxidante (Beltran-Barrientos, Hernandez-Mendoza et al. 2018).

La renina, mediante la hidrólisis específica de angiotensinógeno, desempeña un papel clave en el control de la presión arterial, ya que genera angiotensina I. La angiotensina I es un decapeptido, que finalmente es convertido por la ECA en Angiotensina II (Ang II), el principal efector del Sistema Renina-Angiotensina (SRA). La Angiotensina II es también un activador potencial de las cascadas oxidativas e inflamatorias (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema simplificado de la regulación de la presión arterial. Modificado de (Gallego, Mora et al. 2018).

De hecho, la ECA es una diana bien identificada en estrategias antihipertensivas, y explica por qué los estudios de actividad biológica de los BPs se han limitado, casi exclusivamente, a ensayos que cuantifican la inhibición *in vitro* de la ECA (Vercruyse, Van Camp et al. 2005, Bosch, Scigliuolo et al. 2014, Daskaya-Dikmen, Yucetepe et al. 2017). Generalmente, estos BPs son considerados sustratos competitivos para la ECA siendo los residuos hidrofóbicos en el extremo C-terminal los principales responsables de la interacción con la proteína diana. No obstante, la identificación de actividades biológicas para otras angiotensinas, el descubrimiento de nuevos receptores y vías enzimáticas, en

particular en el eje angiotensina-(1-7)/Ang II/receptores confirma que se trata de un sistema con una regulación *in vivo* muy compleja (Santos, Ferreira et al. 2013). La angiotensina 1-7 es el producto de conversión de angiotensina I por la ECA-2. Se une al receptor metabotrópico *Mas* acoplado a proteína G. Se considera un antagonista fisiológico de la Ang II, pudiendo contrarrestar varios de los efectos producidos por ésta.

### 2.1.1. Ensayos clínicos

Desafortunadamente, el consumo de BPs derivados de alimentos y los efectos producidos sobre el tono vascular han sido poco estudiados en humanos. Entre estos estudios clínicos destacan los lactotripéptidos, por su potente efecto hipotensivo (BPs derivados de lácteos). Su consumo regular reduce eficazmente la presión arterial en seres humanos, e incluso se han comercializado en Europa y Japón (Evolus<sup>®</sup> y Ameal S<sup>®</sup>) (Aihara, Kajimoto et al. 2005, Cadee, Chang et al. 2007). Pero antes de llegar a su comercialización, se necesitaron dos décadas de estudios *in vitro* e *in vivo* para proporcionar suficiente conocimiento científico que lo avalara (Fekete, Givens et al. 2013, Hidayat, Du et al. 2017). Así, numerosos estudios epidemiológicos apoyan que el consumo de leche y productos lácteos contribuye a reducir la incidencia de enfermedades metabólicas (Lee, Lee et al. 2018). En un estudio reciente, la suplementación con proteína de suero en individuos con pre-hipertensión redujo significativamente la presión arterial sistólica y diastólica ambulatoria de 24 horas (Fekete, Giromini et al. 2016). Además, en un estudio de intervención nutricional, se investigaron los efectos beneficiosos potenciales de hidrolizados de proteínas derivadas de la ovoalbúmina de huevo en la presión arterial y en la salud cardiovascular (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02223169). Sin embargo, tras una intervención de ocho semanas ingiriendo esta fracción de hidrolizado de proteína de huevo, no se obtuvo ningún efecto significativo sobre los marcadores de RCV (Lucey, Heneghan et al. 2019). Otros estudios con BPs derivados de huevo obtenidos tras digestiones enzimáticas, también han mostrado un efecto cuantificable en un modelo animal, observándose una reducción de la presión arterial junto con una reducción plasmática de Ang II (Majumder, Chakrabarti et al. 2013, Jahandideh, Majumder et al. 2014). Por lo que se deduciría que la inhibición de la

vasoconstricción -inducida por Ang II-, podría ser uno de los mecanismos antihipertensivos de algunos péptidos derivados de la leche y el huevo (Chakrabarti, Liao et al. 2017).

Un estudio en humanos llevado a cabo en la Universidad Católica de Murcia previo a la realización de esta Tesis, evaluó el efecto derivado del consumo regular de jamón curado de cerdo rico en BPs inhibidores de la ECA. Pese a suponer un aporte adicional de cloruro sódico (1,5 g/día), el consumo regular de jamón curado, no afectó a la presión arterial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02585089). Curiosamente, estos datos ponen en duda la creencia popular, y generalmente considerada también en la clínica, de que el jamón curado es un “alimento restringido” para individuos con la tensión arterial elevada. En este estudio, el consumo de jamón curado rico en BPs se extendió cuatro semanas, no modificando positiva/negativamente la presión arterial de los sujetos, ni incrementando la excreción de sodio (Montoro-García, Zafrilla-Rentero et al. 2017), resultados que suponen un hallazgo clínicamente relevante.

En este caso concreto, la ausencia de efectos adversos puede ser debida al complejo sistema de regulación de la presión arterial que, impiden que pequeños cambios en la ingesta de sodio/BPs, puedan alterar la homeostasis del individuo. Además, como se ha explicado anteriormente, el efecto de los BPs no parece estar limitado a la inhibición de la ECA, y se deben considerar otros mecanismos antihipertensivos (Ang II, renina etc). En esta línea, la Comisión Técnica de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, consideró un concentrado de péptidos de camarón (>87% de péptidos), como un nuevo alimento funcional basado en dos ensayos clínicos distintos, uno de ellos realizado en voluntarios con hipertensión leve/moderada (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01583582). Aunque, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la presión arterial entre los grupos sometidos al tratamiento, concentrado de péptidos de camarón (1,200 mg/día) *vs.* placebo, tras un período de ocho semanas de ensayo (no ha sido publicado, identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01583582).

Los BPs se encuentran en una gran variedad de alimentos, incluyendo también alimentos de origen vegetal. Kwak y colaboradores analizaron los niveles de presión arterial de 100 individuos pre-hipertensos, y encontraron que la

suplementación dietética con péptidos de soja negra durante ocho semanas, redujo significativamente la presión arterial sistólica y el estrés oxidativo, en términos de niveles plasmáticos de Malon-dialdehído (MDO), y actividad superóxido dismutasa (SOD) (Kwak, Kim et al. 2013) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01674491). Otro estudio, evaluó los efectos hipotensores derivados de la administración de leche de soja fermentada en ratas con hipertensión espontánea (RHE) (Bao and Chi 2016). Además, se encontró actividad inhibitoria de la ECA en la leche fermentada y descremada de camella, y se testó en RHE con un considerable descenso de la presión arterial (Yahya, Alhaj et al. 2017). En un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo y cruzado en humanos, de tres semanas de duración —pero con sólo siete voluntarios—, la presión arterial sistólica disminuyó significativamente en el grupo que ingirió un hidrolizado de proteína de guisante (Li, Prairie et al. 2011). Basado en resultados anteriores con RHE (Girgih, Alashi et al. 2014), un ensayo clínico pretendía analizar el posible efecto de un hidrolizado de proteína de semilla de cáñamo rico en BPs sobre la presión arterial sistólica y diastólica ambulatoria (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03508895), pero no se han encontrado datos publicados al respecto.

Lafarga y col. desarrollaron un pan funcional que contenía BPs con actividad inhibitoria de la ECA (IECA) *in vitro*, y actividad antihipertensiva testada en RHE (*in vivo*) (Lafarga, Gallagher et al. 2016). Tras el estudio preliminar en el modelo animal, el mismo producto fue utilizado en un ensayo clínico, dónde este pan funcional produjo una leve mejoría en la presión arterial sistólica (Cicero, Fogacci et al. 2018) (ClinicalTrials.gov Identificador: NCT02197910).

De nuevo, es importante destacar que los efectos *in vitro* observados no se correlacionan siempre con la eficacia clínica de los BPs, ya que esto último depende de dos factores críticos: su resistencia a la degradación por las peptidasas gastrointestinales, y su absorción en el torrente sanguíneo en cantidades suficientes para llegar a sus dianas terapéuticas (Gianfranceschi, Gianfranceschi et al. 2018). En ese sentido, la mayoría de los ensayos anteriores incluyen el impacto de la digestión gastrointestinal y los procesos de absorción epitelial de los BPs derivados de alimentos, antes de las intervenciones *in vivo*.



### 2.1.2. Bloqueo de los receptores de AT.

En la búsqueda de mecanismos antihipertensivos alternativos, más allá de la IECA, el bloqueo del receptor AT1 (AT1R) también se utiliza ampliamente para reducir la presión arterial en el contexto clínico. El AT1R es un receptor de membrana acoplado a una proteína G, que media la mayoría de los efectos patológicos de la Ang II en células del músculo liso vascular (CMLVs). De hecho, los bloqueadores AT1R también se usan como terapia antihipertensiva porque presentan menores efectos secundarios que los tradicionales IECA como el captopril o el enalapril, entre otros (Contreras, de la Parte et al. 2003). Estudios *in vitro* con células han mostrado que los BPs provenientes de alimentos afectarían al SRA, provocando una disminución en la expresión de las proteínas AT1R y Ang II (Figura 2).

En esta línea, los tripéptidos IQP y VEP, así como un hidrolizado de *Spirulina platensis* fueron testados en RHE. En ambos ensayos, las fracciones peptídicas disminuyeron la presión arterial de las ratas, aparentemente mediado por cambios de expresión génica en el eje SRA, más concretamente, en el riñón. Así se cuantificó una disminución en los transcritos de AT1R, Ang II, ECA y un aumento de ECA-2, Ang (1-7), Mas y AT2R (Pan, She et al. 2015, Zheng, Wang et al. 2017). Estos cambios destacables en el SRA promoverían los efectos antihipertensivos observados *in vivo*, de nuevo, en sinergia con la inhibición de la ECA. Un aspecto muy importante de este estudio es que demuestra que los BPs son absorbidos en el tracto gastrointestinal, se distribuyen y llegan a las células diana en concentración suficiente para ejercer su efecto. Con respecto a la modulación en la expresión de los receptores Ang II, un péptido inhibidor de la ECA derivado de la proteína de soja (LSW), también mostró un efecto sinérgico sobre el tono vascular en CMLVs de ratas hipertensas. Además de la tradicional inhibición de la ECA, el tratamiento peptídico contrarrestó el aumento de la expresión AT1R en las células estimuladas con Ang II, lo cual, efectivamente, sugiere un mecanismo de acción adicional (Lin, Liao et al. 2017). En este último caso, el tratamiento con LSW redujo significativamente la fosforilación del factor de transcripción p50, pero no del p65. Profundizando en estas observaciones, p50

y p65 son las subunidades del factor de transcripción NF-kB, que se translocan al núcleo para llevar a cabo las funciones de este factor, como explicaremos más adelante (sección 2.2). Además, LSW inhibió las vías de fosforilación Src y ERK1/2, apoyando una vez más el papel regulador de estos BPs en las cascadas de activación intracelular.

Existen evidencias científicas de que los BPs derivados de la leche y el huevo antagonizan los receptores de unión a Ang II en modelos animales. Así, los péptidos derivados de la lactoferrina RRWQWR, LIWKL y RPYL redujeron la presión arterial en RHE y la vasoconstricción *ex vivo* en segmentos arteriales de arteria carótida de conejo (Fernandez-Musoles, Castello-Ruiz et al. 2014). Además, el péptido derivado del huevo RVPSL, también redujo la presión arterial en RHE y disminuyó significativamente los niveles de transcrito primario del ácido ribonucleico (ARNm) de AT1R, ECA y renina, junto con los niveles séricos de Ang II (Yu, Yin et al. 2014). Parece por lo tanto evidente, que el tratamiento con los BPs disminuye la expresión de los principales efectores vasoconstrictores. Seguidamente, un péptido derivado del huevo, RVPSL, es eficazmente translocado desde el lumen hasta el lado basolateral de un epitelio formado por células de colon, Caco-2, para unirse a sus receptores diana (Ding, Wang et al. 2016). En un estudio correctamente diseñado, se analizó el efecto del péptido IRW, un péptido inhibidor de la ECA derivado del huevo, en arterias mesentéricas de RHE. Los investigadores postularon que tras el consumo de este péptido se producían cambios en el transcriptoma, y confirmaron un aumento de la expresión de la ECA-2 (enzima encargada de la conversión de la Ang II a Ang 1-7, la cual inhibe las acciones de la Ang II) (Majumder, Liang et al. 2015). Otros autores hidrolizaron la clara de huevo y le administraron esta mezcla a RHE. De nuevo, se observó una reducción de la presión arterial, mediada principalmente por una menor expresión de AT1R pero mayor de AT2R. Los receptores AT2R actuarían con efectos antagónicos a los AT1R, induciendo vasodilatación (Jahandideh, Chakrabarti et al. 2016). En resumen, los anteriores estudios ponen pues de manifiesto que los nuevos enfoques transcriptómicos y proteómicos son necesarios para poder descifrar el papel funcional de estos BPs.

Por tanto, los mecanismos de acción de los BPs sobre el sistema cardiovascular parecen mucho más complejos que la mera unión estructural a la

enzima ECA. Dado que el AT1R es responsable de los efectos patológicos más conocidos causados por la Ang II en el organismo, estos cambios transcripcionales implicarían otra forma, potencialmente novedosa, de atenuar la resistencia vascular periférica. Sin embargo, se necesitan más ensayos clínicos que apoyen esta hipótesis.

### 2.1.3. *Inhibición de la renina*

Los BPs derivados de alimentos, afectan a otro mecanismo de regulación de la presión arterial: la inhibición de la renina. La renina es una enzima que cataliza un paso inicial de la vía SRA. Su inhibición tiene como resultado menores niveles circulatorios de Ang II y AT1R. Es probable que la doble inhibición (ECA y renina) muestre un efecto sinérgico en la reducción de la presión arterial. Curiosamente, en el amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), un pseudocereal rico en minerales y proteínas, se han descrito numerosos péptidos inhibidores de la renina. Esta inhibición es de tipo competitivo, basado en un efecto dosis-respuesta (Quiroga, Aphalo et al. 2017). Por el contrario, He et al., encontraron que tanto la renina como la ECA son inhibidas, de manera no competitiva, por un péptido (GHS) derivado de la colza (He, Malomo et al. 2013). Otro enfoque razonable que justifica la complejidad del sistema de regulación de la presión arterial es el hecho de que la Rapakinina, un péptido derivado de la proteína de colza, interactúa con el receptor IP de las prostaglandinas, y con el receptor de colecistoquinina-1 (CCK-1) (Yamada, Iwasaki et al. 2010). Así, se observó una vasodilatación de las arterias mesentéricas de las RHE *ex vivo* y en ratas Wistar normotensas en presencia de Rapakinina. Dado que el efecto vasodilatador se vio disminuido al añadir un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX) y también por un antagonista del receptor IP, los autores sugirieron que este efecto vasodilatador podría estar mediado por la prostaglandina I<sub>2</sub> y su receptor IP. Además, dado que un antagonista del receptor de CCK-1 también disminuía este efecto, esta actividad podría también estar mediada por el CCK-1 y su receptor. Otro grupo de investigadores describió que la expresión renal de los niveles de transcrito de renina, se vio reducida en aproximadamente un 50%, en RHE alimentadas con un hidrolizado de proteína de guisante y, por lo tanto, los niveles reducidos de Ang II serían una consecuencia de los bajos niveles de renina (Li, Prairie et al. 2011).

Además, la hidrólisis proteolítica de la macroalga roja *Palmaria palmata*, permitió también obtener un péptido inhibidor de la renina, IRLIIVLMPILMA. Este BP ha sido evaluado *in vitro* (Fitzgerald, Mora-Soler et al. 2012), reduciendo incluso la presión arterial en RHE tras administrarlo por vía oral durante 24 horas (Fitzgerald, Aluko et al. 2014). De manera similar, los hidrolizados de semillas de cáñamo (*Cannabis sativa*), también muestran inhibición de la renina en ensayos *in vitro*, además de la ECA, y dieron lugar a una disminución *in vivo* de la presión arterial en RHE, cuando se administraron por vía oral (Malomo, Onuh et al. 2015).

En un estudio posterior, se evaluó el efecto de los BPs procedentes de semillas de amaranto en el miocardio de RHE. No se encontraron efectos inotrópicos negativos significativos y, en consecuencia, se asumió que en un sistema complejo *in vivo*, el corazón no se ve alterado por estos BPs, y que los efectos hipotensivos sólo serían atribuibles a una disminución de la resistencia periférica (Fritz, Vecchi et al. 2011). De acuerdo con esa misma hipótesis, Lafarga y col. mostraron que un hidrolizado de albúmina sérica bovina presentaba actividad IECA y anti-renina, lo que efectivamente, contribuye a una menor resistencia periférica de manera sinérgica. Este hidrolizado a base de papaína sólo se ensayó *in vitro* (Lafarga, Aluko et al. 2016). Recapitulando, la evidencia científica señalaría que tanto la ECA como la renina, deben ser tenidas en cuenta al considerar los posibles efectos hipotensores de los BPs en el sistema SRA.

#### 2.1.4. Vía del óxido nítrico

El NO producido por el endotelio tiene una doble acción, si bien actúa directamente sobre el tono vascular, también es capaz de regular la homeostasis (remodelación arterial, estado oxidativo). No obstante, la mayoría de los estudios se centran en el efecto vasodilatador de este gas liberado por el endotelio. Del mismo modo, la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOS3), es el principal agente relajante derivado del endotelio, ya que de ella depende la liberación de NO. La NOS presenta tres isoformas bien caracterizadas y codificadas por diferentes genes; la isoforma originalmente identificada en el cerebro (NOS neuronal o nNOS), macrófagos (NOS inducible o iNOS) y células endoteliales (eNOS) (NOS1, NOS2 y NOS3, respectivamente). Los mecanismos de activación de la eNOS están complejamente regulados, como resultado del control

fisiológico de los distintos lechos vasculares. Intracelularmente, la activación de la eNOS ocurre tras la fosforilación de los residuos de serina (S617, S1179, S635 y S1179), por la proteína quinasa Akt/proteína quinasa C (PKC), y depende de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Fulton, Gratton et al. 1999).

Los datos publicados en la literatura revelan que muchos BPs inducen vasodilatación debido a la activación del sistema nitrérgico. Aunque las isoformas de la eNOS y la nNOS se definen como constitutivas, a diferencia de la iNOS, su expresión se ha visto regulada por determinados BPs. Así, O'Keeffe y FitzGerald han analizado recientemente los cambios transcriptómicos en células endoteliales incubadas con un hidrolizado de suero, determinando un aumento en la expresión de eNOS y otros genes vasomoduladores (O'Keeffe and FitzGerald 2018). Del mismo modo, se ha observado que el consumo de un extracto derivado de proteína de suero de leche, aumentó la liberación de NO endotelial, mejorando además la vasodilatación mediada por el flujo de la arteria braquial en personas sanas y con sobrepeso (Ballard, Bruno et al. 2009, Ballard, Kupchak et al. 2013). Otro péptido miristoilado de 13 aminoácidos, que imitaba una región pseudo-sustrato de la PKC endógena, fue capaz de activar la eNOS dependiente de la vía PI3K/Akt en segmentos aislados de arteria pulmonar (Krotova, Hu et al. 2006). Es importante destacar que este péptido sintético no es de origen alimentario, pero permite señalar mecanismos de acción subyacentes para los BPs derivados del suero.

La PKC pertenece a una familia de serinas/treoninasas cinasas, que están involucradas en distintos mecanismos de señalización celular (cáncer, apoptosis, inflamación, etc). En la última década, se ha utilizado como proteína diana para la síntesis de inhibidores específicos. Así, un decapeptido de la cianobacteria *Spirulina platensis* ha sido evaluado recientemente *in vivo*. Carrizzo y col. administraron GIVAGDVTPI a ratones *knock-out* para eNOS, y observaron una mayor vasodilatación relacionada con mayores niveles de nitritos séricos (Carrizzo, Conte et al. 2019). Más allá de lo anterior, los autores demostraron la implicación de la vía Akt/PKC/eNOS mediante el uso de inhibidores farmacéuticos específicos *ex vivo*. En definitiva, los BPs alimentarios afectarían a la producción de NO dependiente de la eNOS. Sin embargo, las vías que regulan dichos niveles no han sido hasta la fecha, completamente elucidadas.

Además de la eNOS, se conoce poco sobre la regulación de la iNOS y menos aún del posible efecto causado por BPs. La expresión es inducida en gran medida por el factor transcripcional NF- $\kappa$ B, un importante mediador de la respuesta inflamatoria inducible por citoquinas. El tripéptido PAY, procedente de la proteína del salmón (subproducto de origen animal) tras ser sometido a hidrólisis con pepsina, demostró suprimir significativamente la expresión de las proteínas iNOS y ciclooxigenasa-2 (COX-2), en células estimuladas por lipopolisacárido (LPS), simulando así condiciones de sepsis inflamatoria. Estas proteínas son las principales responsables de la producción de NO y prostaglandina E2 (PGE2) en condiciones de sepsis e inflamación, respectivamente. Se ha postulado que los bajos niveles de NO en el lugar donde se produce la inflamación, contribuyen positivamente a la reparación del tejido, lo cual sugiere que PAY podría ser un candidato interesante para prevenir el estrés níttrico en las zonas inflamadas (Ahn, Cho et al. 2015). Los BPs derivados de peces también han mostrado efectos inhibidores sobre la iNOS y, en consecuencia, en la liberación de NO. Tras la adición de 2 mg/mL de un extracto proteico de sardina en conserva (<10 kDa), se registró una disminución significativa en la producción de NO, así como de especies reactivas de oxígeno (ROS), en las células endoteliales estimuladas por factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Vieira, Van Camp et al. 2018). De manera contradictoria, un nuevo enfoque terapéutico para la rinosinusitis crónica (patología inflamatoria relacionada con bajos niveles nasales de NO), mostró que los péptidos de bajo peso molecular ricos en arginina, derivados de la protamina (obtenida a partir de esperma de salmón), y aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (*Food and Drug Administration*, FDA), aumentaron significativamente la producción de NO tanto en macrófagos de ratones (RAW 264.7), como en células epiteliales LA4, a través de la inducción de iNOS (Balijepalli, Comstock et al. 2015). Si bien los resultados anteriores son prometedores, desafortunadamente no aportan concreción sobre las dianas moleculares de estos BPs. Desde un punto de vista terapéutico, la modulación del estado oxidativo con BPs que inducen la liberación de NO supondría una estrategia clínica muy interesante, pero aún no se han descrito todas las vías de regulación, como por ejemplo la sobreexpresión de la eNOS en las células endoteliales.

La vasoconstricción dependiente de endotelio está controlada por diversos mecanismos, siendo también atribuible a otros péptidos vasoactivos endógenos llamados endotelinas. Se han descrito tres isoformas de endotelinas (ET-1, ET-2, ET-3). Los BPs derivados de hidrolizados de glutelina-2, proveniente de la semilla de la palma aceitera, VIEPR, LPILR, ADVFNPR y VVLYK, ejercen una actividad inhibitoria de la ECA, pero también han sido propuestos como potenciales inhibidores del contenido intracelular de ET-1. La mayor capacidad de inhibición se encontró para el péptido VVLYK a una concentración de 1 mg/mL, de acuerdo con su mayor efecto IECA. Además, estos cuatro BPs presentaron un efecto protector significativo frente al daño inducido por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en células endoteliales humanas EA.hy926 (Zheng, Li et al. 2017).

## 2.2 Inflamación, ruta del NF- $\kappa$ B y estrés oxidativo.

La inflamación juega un papel fundamental en el cambio fenotípico de un endotelio proaterogénico. Así, en modelos *in vitro*, tanto las citoquinas como el TNF- $\alpha$ , las interleuquinas 6 y 1 (IL-6 o IL-1 $\beta$ ) o el LPS, inducen la expresión de integrinas en la membrana endotelial tales como el ICAM-1 (*Intercelular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular celular adhesion molecule-1*) y E-selectina (CD62E). Ello se produce principalmente a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Ledebur and Parks 1995). En condiciones basales, el NF- $\kappa$ B es retenido en el citoplasma unido a su proteína inhibidora, la I kappa B-alpha (I $\kappa$ B- $\alpha$ ). Tras su degradación, el NF- $\kappa$ B es translocado al núcleo donde la subunidad p65 debe ser fosforilada, unirse eficientemente al ácido desoxirribonucleico (ADN) e inducir una respuesta transcripcional proinflamatoria.

En un estudio reciente, se caracterizaron once nuevos péptidos procedentes de un hidrolizado de zeína (proteína del maíz). Entre ellos, tres mostraron una fuerte actividad antiinflamatoria al inhibir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales humanas Ea.hy926, estimuladas con TNF- $\alpha$  (Liang, Chalamaiah et al. 2018). A pesar de que en este estudio no se señaló la vía de regulación de estos péptidos, si parece al menos evidente que debe involucrar la vía del NF- $\kappa$ B. Otros estudios también sugieren que la regulación debe estar

mediada por la vía del proliferador de peroxisomas-activador receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ), un factor de transcripción que antagoniza la capacidad proinflamatoria de NF- $\kappa$ B. De hecho, Marcone y col. (2015) demostraron que un hidrolizado de leche rico en BPs inhibió la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), IL-8, VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina. Curiosamente, estos cambios fueron similares a los observados en células endoteliales tratadas *in vitro* con troglitazona, un ligando del PPAR- $\gamma$ . Los autores evidenciaron que el inhibidor específico del PPAR- $\gamma$ , el GW9662, bloqueó también los efectos del hidrolizado de BPs en las mismas condiciones *in vitro* (Marcone, Haughton et al. 2015). En la misma línea, Majumder y col. observaron que los tripéptidos de huevo, IRW e IQW, pueden prevenir la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 estimulada por el TNF- $\alpha$  (Majumder and Wu 2015). Estos autores revelaron que IRW inhibe la translocación al núcleo de ambas subunidades p50 y p65, mientras que IQW solo inhibía la translocación de p50, regulando eficientemente la expresión de ICAM-1, aunque no la de VCAM-1. Además, un hidrolizado de bajo peso molecular (<10 kDa) de proteína de sardina disminuyó significativamente la expresión de marcadores de inflamación endotelial como NO, MCP-1, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), IL-8, ICAM-1 y ROS en comparación con células endoteliales estimuladas con TNF- $\alpha$  (Vieira, Van Camp et al. 2018). Sin embargo, a pesar de la cantidad de datos experimentales, es importante mencionar que aún no se han definido completamente el (los) mecanismo(s) antiinflamatorio(s), de estos BPs. Además, el hecho de que la mayoría de los BPs estén presentes en extractos no caracterizados, limita la confirmación de posibles moléculas diana como el NF- $\kappa$ B o el PPAR- $\gamma$ .

Los receptores *toll like* (TLRs), son proteínas transmembrana tipo I activadas indirectamente por LPS, por lo que están directamente implicados en la respuesta inmunológica e inflamatoria. En particular, la polimerización del TLR4 produce una rápida activación del NF- $\kappa$ B, y la consecuente transcripción de citoquinas dependientes, como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ . Así, dos péptidos diseñados específicamente, han conseguido bloquear con éxito el sitio de acoplamiento de la proteína TLR4 y, por lo tanto, inhiben la señalización inflamatoria aguas abajo de TLR4 (Toshchakov, Piao et al. 2013). Otras investigaciones relevantes, describen que los BPs derivados del arroz también son capaces de unirse al TLR4, disminuyendo la fosforilación de p65 y comprometiendo así la liberación de la



caspasa-3 (Liang, Lin et al. 2018). De acuerdo con otros resultados recientes, un péptido derivado de la proteína de colza WDHHAPQLR (RAP), ha sido capaz de reducir la expresión de Bax y caspasa-3, y aumentar la expresión de Bcl-2 en las células endoteliales inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Xu, Zhang et al. 2018). De manera que estos BPs podrían estar también implicados en rutas de apoptosis.

Por otro lado, la lunasina es un péptido de 43 residuos al cual se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y reductoras de colesterol circulante. Se encuentra principalmente en la albúmina 2S de la soja (Galvez and de Lumen 1999), aunque también se ha encontrado en otros cereales y plantas herbáceas (Jeong, Jeong et al. 2010, Maldonado-Cervantes, Jeong et al. 2010). Sus efectos sobre la presión arterial son contradictorios, pero estudios más recientes muestran que la lunasina podría ejercer una disminución dosis-dependiente, de la secreción proinflamatoria de MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$  en macrófagos humanos RAW264.7 estimulados con LPS (Hsieh, Chou et al. 2017). Otros estudios aportan resultados similares, revelando que la lunasina también posee una capacidad antiinflamatoria al inhibir el MCP-1, el inhibidor activador del plasminógeno-1 (PAI-1), y la producción de leptina en células RAW264.7 estimuladas por TNF- $\alpha$  y LPS. Explorando en detalle los mecanismos moleculares de acción, Cam y González de Mejía fueron pioneros en realizar técnicas de inmunoprecipitación *in vitro* y analizar la interacción entre la lunasina y el receptor de integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3. Estos autores evidenciaron que la lunasina se unía eficientemente a la integrina  $\alpha$ V $\beta$ 3 en macrófagos humanos estimulados con LPS, lo que reducía la activación de la vía de NF- $\kappa$ B mediada por Akt, y contrarrestaba la respuesta proinflamatoria (liberación de citoquinas proinflamatorias) (Cam and de Mejía 2012). Además, se ha descrito que la lunasina aislada de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), es la responsable de la inhibición de la expresión de NO, TNF- $\alpha$  e IL-6 en la línea celular RAW264.7 estimulada por LPS (Ren, Zhu et al. 2017). Otros modelos *in vitro* muestran un efecto antioxidante para este largo péptido, ya que también minimiza el daño a los lípidos al disminuir la adhesión de monocitos THP-1 a la superficie vascular *in vitro*, inducida por lipoproteínas oxidadas de baja densidad (ox-LDL) (Zhu, Li et al. 2017). Este efecto parece estar mediado por una disminución significativa de moléculas de adhesión (VCAM-1 y E-selectina, pero no ICAM-1). Mecanísticamente, los autores confirman que la lunasina actuaría sobre la vía MEK5/ERK5 y en el factor de transcripción *Krüppel Like Factor*

(KLF2). Además, el tratamiento con lunasina podría revertir los efectos de las ox-LDL en la expresión de eNOS y PAI-1, genes diana del KLF2. Otro estudio experimental reciente va más allá, e indaga en la capacidad de la lunasina para proteger el endotelio. Así, los autores mostraron que la lunasina protege las células endoteliales Ea.hy926 del estrés oxidativo mediante la sobreexpresión de la hemo oxigenasa-1 (HO-1), la cual induce una potente respuesta antioxidante en la que está implicado el factor eritroide 2 (Nrf2) (Gu, Ye et al. 2019). Más concretamente, la vía PI3K/Akt también parece estar implicada en la activación de Nrf2/HO-1 dependiente de lunasina. Por último, los mismos autores mencionan la posible función citoprotectora de la lunasina en ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>), alimentados con una dieta rica en grasa, al inhibir la progresión de la placa aterosclerótica (Gu, Ye et al. 2019).

Por todo ello, se han descrito diversos mecanismos de acción para la lunasina (MEK5/ERK5, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B), lo cual apunta a que podría ejercer una amplia gama de funciones en la fisiología vascular (Figura 1). A pesar de que algunos estudios sí han utilizado un modelo animal, se desconoce hasta qué punto la ingesta regular de lunasina, podría prevenir la progresión de aterosclerosis en un contexto clínico, requiriendo para ello el desarrollo de nuevas investigaciones.

La regulación oxidativa y la inflamación están indudablemente relacionadas con la homeostasis. Así, se han descrito numerosos péptidos que previenen el daño oxidativo y la oxidación de los lípidos, principalmente de aquellos procedentes de la leche. Tonolo et al. analizaron los efectos de péptidos derivados de la leche en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo con terc-butil-hidroperóxido (TbOOOH) (Tonolo, Moretto et al. 2019). Los péptidos RHPHPLSFM y VLPVPEK fueron capaces de preservar la viabilidad celular, mientras que ARHPHLSF y VPYPQR redujeron el nivel de peroxidación de lípidos. Al igual que ocurría con la lunasina, la respuesta antioxidante descrita parecía estar mediada por el factor transcripcional Nrf2. En condiciones de estrés oxidativo, el Nrf2 se transloca al núcleo, donde promueve la activación de la transcripción de enzimas antioxidantes, al unirse al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en las regiones promotoras de los genes diana (Capítulo III, Figura 2). Así, un tripéptido derivado del baijiu chino, PHP, mostró efectos protectores en células

HepG2 sometidas a estrés oxidativo (Wu, Sun et al. 2018). El pretratamiento con PHP suprimió la generación de ROS, malondialdehído (MDA) y glutatión oxidado (GSSG), además de prevenir la disminución del glutatión reducido (GSH), induciendo además las actividades de las enzimas antioxidantes celulares catalasa (CAT), SOD y glutatión peroxidasa (GSH-PX). Una vez más, todos estos efectos parecen ser el resultado de una regulación al alza, de la Nrf2. En otro estudio, dos péptidos presentes en el queso *Stracchino*, EAMAPK y AVPYPO, fueron sintetizados y evaluados *in vitro*. Ambos BPs mostraron actividad antioxidante en un amplio rango de concentraciones (5-150 µg/mL). Así, redujeron la liberación de ROS, aumentaron de la expresión de SOD (Bautista-Exposito, Penas et al. 2019), y de nuevo la activación de Nrf2, con la consecuente expresión de HO-1 (Pepe, Sommella et al. 2016). En cuanto a los datos *in vivo*, un hidrolizado de semillas de cáñamo también disminuyó la SOD y la catalasa, lo cual se correlacionó con menores niveles de peróxidos totales en RHE (Girgih, Alashi et al. 2014). En un estudio similar, se utilizó lenteja fermentada rica en péptidos, entre otros compuestos, y se observaron efectos citoprotectores en macrófagos RAW264.7 tratados con TbOOH. La lenteja fermentada previno, por tanto, el estrés oxidativo mediante la activación de la fosforilación SAPK/JNK, la translocación nuclear de Nrf2 y la expresión de enzimas antioxidantes (Bautista-Exposito, Penas et al. 2019). Por lo tanto, los BPs derivados de alimentos han sido evaluados en dos vías estrechamente relacionadas, como son la inflamación y el estrés oxidativo, situando las vías NF-κB y Nrf2 en el epicentro de cada respuesta (Artículo I, Figura 2).

En la misma línea, ciertos ensayos piloto con péptidos endógenos humanos también han mostrado actividades antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, un péptido C-terminal derivado de la trombina (GKY25), suprimió las respuestas proinflamatorias a través de la disminución de las fosforilaciones de las MAP Kinasas p38α y JNK1/2/3, en células estimuladas por LPS (Hansen, Kalle-Brune et al. 2015). Además, la γ-glutamil valina (γ-EV), un dipéptido dietético que se encuentra en los frijoles, y que forma un complejo con el receptor sensor de calcio (CaSR), reprimió la fosforilación de JNK, disminuyendo así la liberación de citoquinas proinflamatorias en una respuesta inflamatoria sistémica simulada (Chee, Majumder et al. 2017). Otro péptido (WFF25), fue capaz de unir el LPS y prolongar el tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT), en dosis altas

(Kalle, Papareddy et al. 2014). Dado que los fragmentos de péptidos de distinto origen (derivados de alimentos y de trombina), ejercen una plétora de actividades antiaterogénicas (reducción de la activación plaquetaria y de la formación de fibrina *in vivo*), se perfila así una interfaz entre la hemostasia y la inflamación. Los resultados de estos ensayos experimentales justificarían su posible aplicación terapéutica como agentes antitrombóticos.

Por lo tanto, dado el potencial de los BPs para regular las vías moleculares y celulares implicadas en la respuesta oxidativa y la inflamación, su ingesta dietética podría convertirse en una estrategia terapéutica beneficiosa para la salud cardiovascular. Sin embargo, todavía se necesitan nuevos enfoques científicos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

### 2.3 Diferenciación de adipocitos y control glucémico.

En las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos de acción comunes que afectan a la aterosclerosis, la inflamación y la obesidad. A continuación, indagaremos en ellos ya que numerosos marcadores modifican su expresión en el tejido adiposo y en el vascular. Estudios experimentales sugieren el papel destacado de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs), en la diferenciación de las células espumosas que se encuentran en la placa de ateroma. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares ( $\gamma$ ,  $\beta/\delta$ , y  $\alpha$ ), y ejercen numerosas actividades de protección cardiovascular, creando una interfaz entre la inflamación y la adipogénesis. Particularmente, el PPAR- $\gamma$  se ha visto altamente expresado en un ambiente inflamatorio sistémico, y su activación mejora eficientemente la respuesta inflamatoria en las células endoteliales (Hamblin, Chang et al. 2009). El aumento de la regulación de los PPARs dentro de los vasos ateroscleróticos, potencia la interacción con otros tejidos y la diferenciación de las células espumosas. Por ello, las líneas de investigación actuales se centran en el desarrollo de nuevas estrategias de inhibición de PPARs, encaminadas principalmente a reducir la diferenciación de adipocitos.

Así, se ha descrito que, en ausencia de acciones insulínicas, los tripéptidos IPP y VPP derivados de la leche promueven una diferenciación adipogénica

similar a la que ocurriría en presencia de insulina. Esta diferenciación se podría definir como un mecanismo de protección primaria contra la formación de células espumosas cargadas de lípidos. De hecho, datos experimentales mostraron la acumulación de lípidos intracelulares, aumento de la expresión de PPAR- $\gamma$  y secreción de una hormona protectora, la adiponectina, en la línea celular murina preadipocitaria 3T3-L1, derivada de fibroblastos embrionarios (Chakrabarti y Wu 2015). Estos tripéptidos participarían así en varios procesos de protección aterogénica, como la activación de reguladores transcripcionales (c-Jun y C/EBP $\alpha$ ), así como la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B. Además de estas propiedades descritas, los dos tripéptidos actuarían como compuestos multifuncionales, ya que también son capaces de promover la sensibilidad a la insulina y prevenir la resistencia posterior a la insulina en los preadipocitos 3T3-F442A (Chakrabarti, Jahandideh et al. 2018). Asimismo, el VPP aumentó la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en los adipocitos, y restauró la absorción de glucosa en los adipocitos tratados con TNF- $\alpha$  (Chakrabarti, Jahandideh et al. 2018). Desafortunadamente, los datos experimentales y clínicos que conecten el efecto de los BPs y la prevención de la resistencia a la insulina son bastante escasos.

La proteína hidrolizada de la clara de huevo (PHH) es un buen ejemplo de extracto multifuncional, ya que ejerce numerosas propiedades fisiológicas. Al aumentar la regulación de PPAR $\gamma$  y C/EBP- $\alpha$ , los BPs derivados del huevo favorecerían una mayor acumulación de lípidos, y la liberación de adiponectina en los preadipocitos (Hamblin, Chang et al. 2009, Jahandideh, Chakrabarti et al. 2017). Además, el tratamiento con PHH estimula la fosforilación de la quinasa 1/2 (ERK1/2), lo que le confiere propiedades miméticas con la insulina. El efecto mediado por la PHH contribuye, además, a una atenuación de las citoquinas proinflamatorias y de la COX-2, a través de la regulación de la fosforilación c-Jun en los adipocitos.

Se ha documentado una relación similar entre un péptido encontrado en el atún, llamado TP-D, y la disminución de la diferenciación de adipocitos en la línea celular 3T3-L1. El TP-D podría disminuir la activación de los factores de transcripción C/EBP, pero promovería la regulación de Wnt-10b, induciendo así acciones antiinflamatorias (Kim, Kim et al. 2015). Las lesiones ateroscleróticas sobre-expresan la hormona adiponectina, sin embargo, el tratamiento con TP-D

ha demostrado reducir la concentración de adiponectina total, lo que sugiere un importante papel regulador en la patogénesis de las ECV (Kim, Kim et al. 2015, Kim, Kim et al. 2015). Se ha evidenciado que los BPs GEY y GYG provenientes del péptido de seda E5K6, suprimen la acumulación de gotas de grasa intracelular en las células 3T3-L1, y la evidencia *in vivo* posterior reveló que el GYG mejora la tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos inducidos por la steptozotocina, de forma dosis dependiente (Han, Lee et al. 2016) (Artículo I, Figura 3). En general, todos estos resultados establecen una clara relación entre BPs y la diferenciación de adipocitos que, de nuevo, podría ser atractivo desde el punto de vista de la patología cardiovascular.

Numerosos ensayos clínicos apoyan la administración de fármacos incretín-miméticos, como son los agonistas del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1R) y los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV), como una estrategia eficaz en pacientes con ECV, ya que además de actuar como hipoglucemiantes, presentan efectos antiaterogénicos por su capacidad de estabilizar las placas ateroscleróticas (Gallego-Colon, Wojakowski et al. 2018). Desde una perspectiva más molecular, la DPP-IV es una ectoenzima presente en la superficie celular, que desempeña un papel importante en el metabolismo de la glucosa mediante el truncamiento e inactivación de las incretinas GLP-1, y el péptido insulintropico gastrointestinal (GIP) (Nargis and Chakrabarti 2018). Actuando de forma conjunta, GIP y GLP-1 estimulan la biosíntesis de la insulina, siendo una estrategia terapéutica recomendable frente a la *diabetes* tipo 2. Varios BPs derivados de alimentos han sido caracterizados por su actividad antidiabética, ya que actuarían como inhibidores de DPP-IV *in vitro*, contribuyendo potencialmente al control glucémico.

Así, los estudios *in vitro* amplían las actividades inhibitorias de los BPs más allá del efecto IECA y renina, inicialmente descritos en esta Tesis. Por ejemplo, hidrolizados de *Palmaria palmata* (Harnedy, O'Keeffe et al. 2015), *Salmo salar* (Neves, Harnedy et al. 2017) y de quinoa (Nongonierma, Le Maux et al. 2015), ejercen una demostrada acción anti-DPP-IV *in vitro*. En este último caso, este efecto se mantuvo después de la digestión gastrointestinal simulada, lo cual es una característica necesaria para futuras aplicaciones nutraceuticas (Vilcacundo, Martinez-Villaluenga et al. 2017). Otro estudio experimental con péptidos

derivados de la soja, Lup1 y Soy1, mostró una inhibición de la actividad de la DPP-IV de manera dosis-dependiente en células Caco-2 (Lammi, Bollati et al. 2018). Además, se ha identificado el IADHFL, un nuevo péptido inhibidor de la DPP-IV, en la carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*). Este BP afecta a la secreción de insulina de las células pancreáticas INS-1 de ratas tras el tratamiento con glucosa, mediante la regulación de genes asociados con la secreción de proinsulina y la diabetes (Zhang, Liu et al. 2018). Aunque estos estudios sugieren que los BPs derivados de los alimentos son potentes reguladores de la actividad de las células beta, aún no se ha profundizado en los posibles mecanismos subyacentes de actuación de esta potencial regulación.

#### 2.4 Enfoques *in-silico*

La estrecha relación entre inflamación, disfunción endotelial y FRCV (hipertensión, obesidad, diabetes...) es una evidencia actual, formalmente demostrada mediante numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*. Los datos aportados anteriormente sugieren, de manera general, que los BPs son compuestos multifuncionales, y ejercen una plétora de efectos antiaterogénicos por su capacidad de interactuar con varias dianas terapéuticas a la vez. En algunos casos concretos sí se han descrito sus potenciales mecanismos de acción, presumiblemente ligados a su comportamiento molecular flexible. Sin embargo, sólo unas pocas moléculas relevantes para las ECV se han confirmado como dianas moleculares de estos BPs. Así, poder descifrar cómo estas pequeñas secuencias peptídicas son absorbidas, reconocen e interactúan con otras proteínas relevantes, es de gran relevancia y un objetivo importante para la industria alimentaria y farmacéutica.

Dentro de este contexto, el interés por la información estructural de los BPs y sus posibles dianas ha crecido considerablemente en los últimos años. El rápido desarrollo de la bioinformática conlleva a una rápida acumulación de datos peptídicos organizados en numerosas bases de datos biológicas, como por ejemplo BioPep (Minkiewicz, Dziuba et al. 2008), StraPep (Wang, Yin et al. 2018), AHTPDB (Kumar, Chaudhary et al. 2015), Hemolytik (Gautam, Chaudhary et al. 2014), PeptideDB (Mooney, Haslam et al. 2013), EROP (Zamyatnin, Borchikov et

al. 2006), etc. Los enfoques bioinformáticos se aplican de manera rutinaria para comparar la actividad antihipertensiva, hipocolesterolémica o antidiabética de diferentes péptidos. Y numerosas publicaciones aúnan datos biológicos y estructurales, demostrando así el éxito de la integración de estas herramientas (Boachie, Okoro et al. 2019, Li, Lee et al. 2019, Montone, Zenezini Chiozzi et al. 2019)

La metodología computacional ha generado diversas estrategias para descifrar posibles dianas. Sin lugar a duda, una de las más eficaces es el diseño estructural de medicamentos (SBDD). Este novedoso enfoque, combina el uso de la información estructural de dianas macromoleculares y moléculas pequeñas, con el objetivo de comprobar su afinidad, o, dicho de otro modo, su capacidad de unión. De hecho, estudios de acoplamiento molecular han demostrado su valor para comprender los mecanismos moleculares de acción de diversos BPs (He, Aluko et al. 2014). Estas estrategias revelan a nivel molecular, las interacciones entre los BPs y sus dianas, confirmando la actividad biológica previa o posteriormente testada *in vitro*. Además, permiten realizar una primera criba en el análisis de la actividad biológica, identificar directamente los ligandos potenciales (candidatos), o incluso permitir el diseño de péptidos "*de novo*" con capacidad de interaccionar con zonas predeterminadas de estructuras diana. Por ejemplo, se llevaron a cabo enfoques *in silico* con 41 péptidos inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa para confirmar la afinidad (Ibrahim, Bester et al. 2018). Los péptidos con una mayor capacidad de interaccionar con la diana, determinada mediante ensayos simulación estructural, fueron sintetizados posteriormente y evaluados en ensayos *in vitro* para confirmar esta probable actividad antidiabética (Ibrahim, Serem et al. 2019). A través de la base de datos BIOPEP-UWM, se pudo predecir la actividad inhibidora de DPP-IV y ECA, de un elevado número de péptidos procedentes de huevas de mero gigante (Panjaitan, Gomez et al. 2018). No obstante, es importante reiterar que estos datos *in silico*, siempre deberían acompañarse de datos experimentales que los corroboren.

Mediante complejas simulaciones de acoplamiento, investigadores encontraron tres péptidos que potencialmente interaccionarían con la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa humana, en una librería de péptidos generados mediante digestión *ex vivo* (jugo gástrico humano) de la proteína del guisante.



Estos tres péptidos NALEPDNRIESEGG, NALEPDNRIES y PFVKSEPIPETNNE mostraron, además, su efecto sobre la biosíntesis del colesterol en células HepG2 (Kumar, Sharma et al. 2019). Estudios de acoplamiento molecular (*molecular docking*), también explicarían la actividad anticoagulante de un péptido inhibidor del factor XIIa de *Porphyra yezoensis* (Syed, Venkatraman et al. 2019).

No obstante, los estudios bioinformáticos se encuentran aún en una fase precoz, y en la actualidad no existen pruebas suficientes para confirmar todas las dianas moleculares de estas pequeñas biomoléculas. En un futuro cercano, es muy probable que aparezcan estudios originales con estructuras proteicas desconocidas, no descritas en la presente Tesis Doctoral y que, combinados con datos experimentales indispensables, podrían descifrar mecanismos de acción inéditos.

### 3. PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN EL JAMÓN CURADO

El jamón curado es uno de los productos más reconocidos de la gastronomía española, con características sensoriales apreciadas mundialmente (Jimenez-Colmenero, Ventanas et al. 2010). De hecho, junto con el jamón cocido constituyen el producto cárnico procesado más consumido en España.

Desde el punto de vista nutricional, la carne de cerdo constituye una fuente de proteínas de alta calidad (31 g por cada 100 de porción comestible). Presenta también un aporte graso moderado, en el que sobresalen los ácidos grasos insaturados y micronutrientes como vitaminas (tiamina, niacina, riboflavina y vitamina B), y minerales (hierro, zinc, fósforo). Por sus características de composición y color, ha sido incluido en el grupo de las carnes blancas por diferentes instituciones como la OMS y la Dirección General de Agricultura de la Comisión Europea. Por lo tanto, aparentemente constituye una carne que se podría incluir en el contexto de una dieta saludable, siempre dentro del grupo de carnes magras, recomendando una frecuencia de ingesta de tres a cuatro veces por semana.

Sin embargo, y a pesar de sus bondades, el jamón curado se considera una carne procesada, ya que es sometida a un proceso de curación en salazón, lo cual hace que se deba ingerir de manera controlada, especialmente en condiciones

fisiológicas alteradas como puede ser la hipertensión. En 2015, la Agencia para la Investigación del Cáncer (IARC), órgano de la OMS especializado en cáncer, emitió un informe en el que revelaba que un consumo elevado de carne roja y procesada se clasificaba como “potencialmente cancerígeno para los seres humanos” (grupo 2A). En España, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), abogaba por la prudencia en un comunicado publicado al día siguiente del anterior informe de la OMS, y afirmaba que el consumo de carne, alimento con un importante valor nutricional, debía ser moderado, de no más de dos veces por semana, ya que el consumo continuado y excesivo podría asociarse a problemas de salud. Así mismo, la AECOSAN hacía referencia a las bondades de una dieta variada, moderada y equilibrada, como es la mediterránea, rica en frutas, verduras, aceite de oliva, legumbres y pescado, con consumo limitado de carnes. Estos beneficios han sido evidenciados científicamente en numerosas publicaciones, y constituyen la base de las recomendaciones nutricionales de nuestro país (Marí, Alías et al.). Pero la alarma ya estaba creada en la población general, y en base a estas recomendaciones, el jamón curado al encontrarse dentro de este grupo quedaba relegado a un consumo ocasional.

Indudablemente, el jamón curado es un producto de mejor calidad que otro tipo de carnes procesadas como embutidos o salchichas, que aportan mayor cantidad de grasas, aditivos y otros ingredientes. A raíz de esta alarma, surgieron nuevos estudios clínicos en los que se intentaba desmitificar el consumo de este producto procesado. Entre ellos, un estudio realizado en la Universidad Católica de Murcia, evidenció la relación existente entre el consumo regular de jamón curado, y la disminución de colesterol LDL y glucosa basal, además de no aumentar niveles de presión arterial en individuos con pre-hipertensión (Montoro-García, Zafrilla-Rentero et al. 2017). Otros estudios también mostraron una mejora de la disfunción endotelial en individuos sanos (Saban-Ruiz, Fabregate-Fuente et al. 2017). Por otro lado, la grasa del jamón curado contiene un alto contenido en ácidos grasos mono- y poli-insaturados. Dependiendo de la alimentación del cerdo, el porcentaje de grasas insaturadas varía notablemente, aumentando con el consumo de bellotas (Fernandez, Ordonez et al. 2007). Es de destacar que el consumo de ácidos grasos mono- y poli-insaturados, ha sido ampliamente estudiado y se relaciona con una mejora del perfil lípido y una

disminución del riesgo cardiovascular (Jakobsen, O'Reilly et al. 2009, Marquez Contreras, Vazquez-Rico et al. 2018).

Por último, es importante resaltar que este producto cárnico presenta también un elevado contenido en BPs, generados en el proceso de curación y maduración del alimento. Efectivamente, durante la curación se produce una intensa proteólisis: las proteínas del músculo son degradadas a péptidos más pequeños (Mora, Fraser et al. 2013), muchos de los cuales han mostrado actividad IECA, actividad antioxidante (Escudero, Aristoy et al. 2012) y actividad inhibitoria de la DPP-IV *in vitro* (Gallego, Aristoy et al. 2014). Además la absorción intestinal ha sido también estudiada, y la mayoría de los BPs presentes en el jamón curado tienen una alta biodisponibilidad biológica (Gallego, Grootaert et al. 2016). Más recientemente, se ha evaluado la estabilidad de péptidos del jamón curado tras el proceso de cocinado. En España, utilizamos hueso de jamón cocido, una costumbre culinaria típica de la dieta mediterránea. Este proceso libera péptidos con actividad IECA, anti-DDP-IV y anti-factor de activación plaquetaria-acetil hidrolasa (Gallego, Mora et al. 2019). Ello sugiere que este producto cárnico pudiera tener un impacto positivo sobre la salud cardiovascular.

El valor gastronómico y palatal de este producto es incuestionable, y debiéramos dar gracias a la providencia por ello, un deleite para los sentidos y a la luz de los resultados experimentales, un estímulo para el corazón. No en vano, las evidencias descritas anteriormente revelan la riqueza del jamón curado en BPs, posicionándolo como un alimento con posibles efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular. Dicho de otra manera, consumir este producto en el contexto de una dieta saludable sería muy beneficioso, tanto para consumidores como para la industria cárnica, y por tanto para la economía española. Como hemos descrito anteriormente, por su versatilidad estructural, los BPs derivados de alimentos actuarían sobre distintas vías moleculares. En esta Tesis Doctoral, se analizarán los posibles efectos sobre el sistema cardiovascular, de los BPs derivados de uno de los productos más representativos y apreciados de la gastronomía española: el jamón curado.

#### 4. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ORIGEN VEGETAL

En el mundo existen unas 374.000 especies de plantas, de las cuales 308.312 son plantas vasculares (Christenhusz and Byng 2016). Las plantas y sus derivados naturales constituyen la mayor fuente de compuestos biológicamente activos, de dónde provienen el 30% de todas las moléculas del mercado farmacéutico, utilizadas para la promoción de la salud. Diversos estudios han evaluado las actividades biológicas de compuestos bioactivos derivados de especies vegetales, incluyendo numerosos compuestos derivados de las algas, con capacidad para intervenir en la patogénesis de enfermedades crónicas (Lordan, Ross et al. 2011).

Las algas, fundamentalmente las macroalgas, son un grupo heterogéneo de organismos fotosintéticos ampliamente utilizado como alimento para el consumo humano, especialmente en países orientales. En relación con estos organismos, diversos grupos de investigación han evaluado la actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y neuroprotectora de sus compuestos bioactivos, entre los que se encuentran, una vez más, los BPs. Las algas contienen además alginatos, fucanos y florotaninos (Fan, Bai et al. 2014, Unnikrishnan, Suthindhiran et al. 2015, Paiva, Lima et al. 2017), (Goncalves-Fernandez, Sineiro et al. 2019). Desde el punto de vista clínico, existen diversos estudios en humanos que relacionan el consumo de macroalgas rojas con una actividad antihipertensiva (Hata, Nakajima et al. 2001). Por ejemplo, el extracto acuoso de *Gracilaria lichenoides* redujo la tensión arterial en un modelo de hipertensión en ratas (de Almeida, Falcao et al. 2011). Por otro lado, se han descrito posibles actividades antidiabéticas y anticoagulantes para distintas moléculas bioactivas derivadas de organismos marinos (Nasri and Nasri 2013, Lopes, Andrade et al. 2017). Así, los polisacáridos de *G. rubra* presentan actividades antioxidantes e inmunomoduladoras (Tong et al 2017).

Si bien las macroalgas son importantes desde el punto de vista ecológico, también contribuyen positivamente en la economía de varias regiones del mundo, principalmente en Asia, aunque empiezan a ser relevantes en países costeros como España. Por su bajo contenido en calorías, aunque ricas en vitaminas, minerales, proteínas, polisacáridos y fibra, las algas comestibles se posicionan como alimentos muy atractivos para la industria agroalimentaria. Entre las algas rojas, el género *Gracilaria* crece en la costa occidental española. Concretamente,

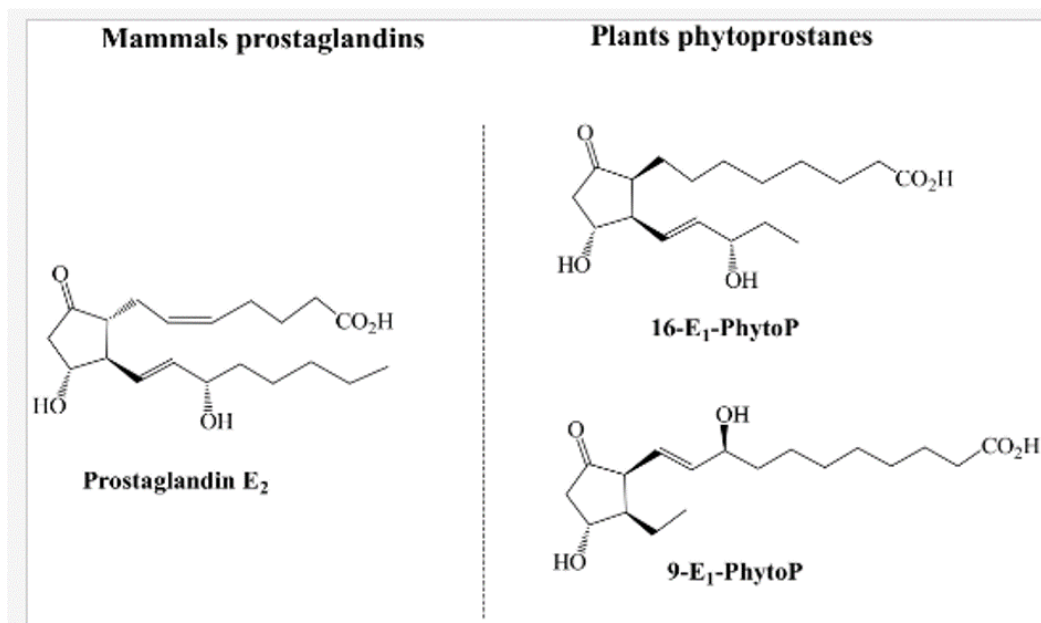
*Gracilaria longissima* es recolectada en la costa de Huelva y Galicia. Se trata de un alga comestible, ampliamente comercializada y constituye una fuente natural para la fabricación de agar. De las 160 especies taxonómicamente clasificadas que constituyen el género *Gracilaria sp.*, solo se han estudiado sus efectos biológicos en algunas de estas especies (De Almeida et al., 2011).

Es importante mencionar que además de los compuestos bioactivos tradicionalmente estudiados en el material vegetal, las algas presentan también componentes de naturaleza glicídica (carragenanos), compuestos peptídicos (Fleurence et al. 1999) y compuestos lipídicos (ácidos grasos poli-insaturados y saturados, terpenos, carotenoides, prostaglandinas), xantofilas y clorofilas, que podrían tener utilidad en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales y nutracéuticos. En relación con estos últimos, se ha descrito la existencia de derivados oxidativos del ácido linolénico (ALA, C18: 3, n-3), generados por reacciones de oxidación iniciadas por el ataque de especies reactivas de oxígeno en tejidos vegetales. Estos compuestos denominados fitoprostanos [FitoPs] o dinorisoprostanos y fitofuranos [FitoFs], se enmarcan dentro del grupo de las oxilipinas vegetales, con potenciales actividades biológicas (Barbosa et al., 2015).

#### 4.1 Fitoprostanos y fitofuranos

Los efectos de los FitoPs están condicionados por el estereoisómero en cuestión (Karg et al., 2007). La oxidación no enzimática del ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), conduce a dos series de FitoPs incluyendo 16 isómeros cada una, teóricamente sintetizados a partir de los lípidos de membrana de las células vegetales (Durand et al., 2011). Las actividades biológicas de los FitoPs han sido descritas en plantas, pudiendo trasladarse a posibles efectos en la salud humana. Al ser lípidos, atravesarían la membrana plasmática y nuclear, pudiendo ejercer su actividad sobre la expresión génica. De hecho, B1-FitoP y A1-FitoP han mostrado ser reguladores de la expresión génica en *Arabidopsis thaliana*, y en la planta del tabaco (Mueller, Hilbert et al. 2008). Más allá, los investigadores observaron que el 28% de esos genes regulados se encontraban relacionados con la desintoxicación, la respuesta al estrés, y la secreción de metabolitos secundarios en la planta (Gilles, Mariani et al. 2009).

La similitud de estos compuestos con las prostanoïdes humanos puede ser la base de la posible actividad biológica, que han demostrado en modelos animales. En humanos, se ha visto que las oxilipinas son capaces de polarizar células T CD4+, por lo que presentarían una capacidad inmunomoduladora a través del sistema inmunológico adaptativo, a una respuesta de los linfocitos TH2-helper (respuesta pro-alérgica) (Traidl-Hoffmann, Mariani et al. 2005). En el marco de esta vía, se ha descrito que el E1-FitoP es capaz de imitar la actividad biológica de la PGE2, cuya actividad *in vitro* se ha relacionado con la inhibición de la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas (presentadoras de antígeno profesional), activando mecanismos dependientes del receptor PPAR- $\beta$ , que conducen a la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B (Traidl-Hoffmann, Mariani et al. 2005, Gilles, Mariani et al. 2009). Dadas las similitudes entre estas dos moléculas (Figura 3), se ha sugerido que las posiciones específicas de los grupos hidroxilo y keto en el anillo de ciclopentenona y sus características electrofílicas, podrían ser responsables de la actividad biológica específica identificada.

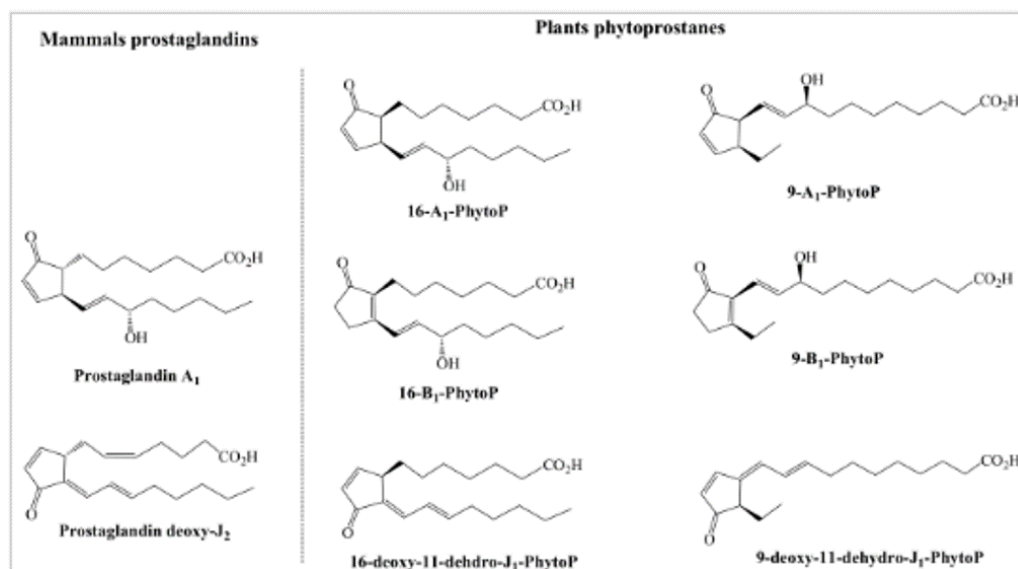


**Figura 3.** Estructura química de PGE<sub>2</sub> y E<sub>1</sub>-FitoP que comparten la capacidad de polarizar la respuesta inmune al TH2 pro-alérgico (Medina, Gil-Izquierdo et al. 2018).

De hecho, de acuerdo con las estructuras de las moléculas representadas en Figura 3, se sugiere que el responsable de la funcionalidad de imitación entre E1-FitoP y PGE2 es el 16-E1-FitoP.

De modo que la actividad inmunomoduladora descrita parece ser el resultado de la analogía estructural entre la PGE2 y el 16-E1-FitoP. Además, las prostaglandinas y los isoprostanos caracterizados por la presencia de un sistema de anillo A-, J, o desoxi-J en su estructura, han confirmado poseer actividad antiinflamatoria, pro-apoptótica en las células tumorales, además de propiedades antivirales en los mamíferos, las cuales han sido ampliamente revisadas (Straus and Glass 2001).

Las propiedades antiinflamatorias asociadas a la presencia de prostaglandinas se desarrollan en cierta medida por su capacidad para impedir la señalización mediada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Para ello, se compararon las series (9 y 16) de FitoPs A1, B1 y deoxy-J1 con la prostaglandina A1 (PGA1) y deoxy-PGJ2 de mamíferos (Karg, Dirsch et al. 2007). La estructura química de estas oxilipinas de plantas y mamíferos se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Estructura química de la prostaglandina A1 y deoxy-J2 y de los FitoPs A1, B1, y deoxy-J1 compartiendo la capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria mediada por NF- $\kappa$ B. (Medina, Gil-Izquierdo et al. 2018).

A partir de esta comparación, se confirmó que el A1-FitoP y las dos series del deoxy-J1-FitoP inhiben la transactivación de NF- $\kappa$ B de manera dependiente de la dosis, como la PGA1 y el deoxy-PGJJ2, respectivamente, aunque las concentraciones operativas del deoxy-J1-FitoP fueron aún menores. Por otro lado, el 16-B1-FitoP fue ineficiente, o bien mostró una eficiencia bastante menor (9-B1-FitoP) en la visualización de la actividad inhibitoria (Karg, Dirsch et al. 2007). Una nueva confirmación de la actividad antiinflamatoria de estos compuestos se logró al monitorizar la formación de NO, lo que reveló que, aunque A1-FitoP y deoxy-J1-FitoP se caracterizan por una capacidad comparable a la de la deoxy-PGJ2, A1-FitoP resultó ser el inhibidor más eficiente de la síntesis de NO.

Además, el estudio de la actividad biológica de los FitoPs se ha extendido a diversos tipos de células y tejidos, incluido el sistema nervioso. Aplicando este modelo, Minghetti y col. demostraron que el B1-FitoP mostraba una actividad neuroprotectora en células nerviosas inmaduras (neuroblastos y oligodendrocitos) frente al daño oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promoviendo además la diferenciación de oligodendrocitos mediante la activación de la vía del PPAR (Minghetti, Salvi et al. 2014). Esta actividad, aunque no ha sido descrita anteriormente, parece desarrollarse imitando los mecanismos desencadenado por la deoxy-PGJ2 (Karg, Dirsch et al. 2007).

Las plantas tienen una mayor cantidad de prostanooides, comparado con la concentración de isoprostanos observada en seres humanos (Medina, Gil-Izquierdo et al. 2018). No obstante, la mayoría de los estudios referentes a estos compuestos se centran en la identificación y cuantificación de los FitoPs, y únicamente en plantas como el tabaco, tomate, uva, algunos frutos secos y semillas, además de diversos tipos de aceite (Collado-González et al., 2015). Se han identificado y cuantificado isoprostanoides en algunas especies de algas pardas y rojas (Vigor, Reversat et al. 2018), pero aún no se han llevado a cabo estudios sobre su bioactividad *in vitro*. Por otro lado, cuando la tensión de oxígeno en el medio es superior al 21%, tiene lugar la síntesis de FitoFs de una forma más eficiente. Actualmente, estos compuestos son utilizados como indicadores de daño oxidativo en plantas, de igual forma que los isoprostanos también se producen en mamíferos en condiciones de estrés. Los isoprostanos se sintetizan fundamentalmente a partir del ácido araquidónico, siendo su



concentración en plantas modulada por diferentes factores relacionados con el aumento de ROS.

De manera que la analogía estructural de los FitoPs y FitoFs con los eicosanoides prostanoides (oxilipinas de humanos), ha permitido sugerir que estos compuestos pueden ser asimilables tras su ingesta dietética, y desarrollar una actividad biológica *in vivo*. Sin embargo, apenas existen estudios de la biodisponibilidad y bioactividad de estos compuestos en células humanas (Barden, Croft et al. 2009), y menos aún tras una digestión *in vitro* de los extractos purificados.



## **II- OBJETIVOS**



## II - OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE PARTIDA: Los BPs y las oxilipinas son moléculas bioactivas con una estructura química muy dispar. Además, provienen de distinto origen alimentario (animal y vegetal) y ejercen propiedades beneficiosas en el sistema cardiovascular mediante diversos mecanismos de acción, muchos de los cuales aún no han sido del todo descritos.

Esta Tesis cuenta con dos objetivos principales:

1. Explorar los mecanismos moleculares de los BPs liberados durante el proceso de curación del jamón curado de cerdo sobre el sistema cardiovascular en un contexto *in vitro* e *in vivo*. Este objetivo general se subdivide en los siguientes objetivos parciales:
  - 1.1. Realizar una búsqueda bibliográfica de todos los mecanismos moleculares mediante los cuales ejercen su acción los BPs procedentes de alimentos en procesos relacionados con el mantenimiento de la salud cardiovascular, así como la prevención o tratamiento de patologías cardiovasculares.
  - 1.2. Evaluar los efectos del consumo regular de jamón curado en marcadores de inflamación, activación de monocitos y agregación plaquetaria mediante la realización de un estudio clínico.
  - 1.3. Evaluar el efecto IECA de BPs purificados del jamón curado en células humanas. Evaluar la interacción entre estos BPs y la ECA humana *in silico*.
  - 1.4. Estudiar la expresión génica de marcadores de disfunción endotelial en un sistema celular aislado. También se analizarán los cambios en el estado oxidativo y de apoptosis producidos por el tratamiento de BPs purificados del jamón curado.

- 1.5. Examinar los posibles mecanismos de inflamación que pudieran verse afectados por el tratamiento de BPs purificados del jamón curado. Determinar una posible diana.
2. Caracterizar las oxilipinas del alga roja comestible *Gracilaria longissima* y sus posibles efectos en el sistema cardiovascular. Este objetivo general se subdivide en los siguientes objetivos parciales:
  - 2.1. Caracterizar el contenido en oxilipinas del alga roja *G. longissima* mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.
  - 2.2. Analizar la biodisponibilidad *in vitro* de extractos del alga roja *G. longissima* mediante una simulación gastrointestinal y un estudio de transporte epitelial.
  - 2.3. Analizar la bioactividad de extractos del alga roja *G. longissima* en un modelo de disfunción endotelial *in vitro*.

# **III-COMPENDIO DE ARTÍCULOS**





**ARTÍCULO 1**

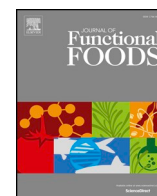
Martínez-Sánchez, S.M., Gabaldón-Hernandez, J.A., Montoro-García, S. (2020). **Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health.** *Journal of functional foods*, 64, 103645.





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Functional Foods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)

# Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health



Sara María Martínez-Sánchez<sup>a,b</sup>, José Antonio Gabaldón-Hernández<sup>a</sup>, Silvia Montoro-García<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento Tecnología de la Alimentación y Nutrición, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

<sup>b</sup> Laboratorio de Cultivo Celular, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Food proteins  
Bioactive peptides  
Molecular  
Cardiovascular system  
Inflammation  
Adipocyte  
*In silico*

## ABSTRACT

Food-derived bioactive peptides (BPs) are nutritionally and functionally important for regulating some physiological functions in the body; however, there is little information on their mechanisms of action. During the past decade, the number of studies in different models (rodents, endothelial cells, monocyte assays, adipocytes) together with the development of novel bioinformatics tools have increased within the context of cardiovascular pathophysiology. This review highlights the molecular mechanisms of these food-derived BPs in the vascular tone, inflammation, oxidative stress and metabolic mechanisms. Understanding the mechanism(s) regulated by food-derived BPs may be critical to understanding the precise role they are able to undertake and represents a potentially fruitful area for further research in the cardiovascular context.

## 1. Introduction

The clinical importance of protein-derived compounds is increasingly recognized and has been intensely studied in pathological conditions (Iwaniak, Darewicz, & Minkiewicz, 2018). To exert biological effects, proteins must be enzymatically digested into peptides, absorbed and then diffused through the circulation in enough concentrations. Proteolysis of the selected protein source produces a hydrolysate, which is followed by fractionation and identification of recovered bioactive peptides (BPs) by mass spectrometry. The BPs present in protein hydrolysates usually contain 2–20 amino acidic residues and have been widely characterized in diverse food sources (Daskaya-Dikmen, Yucetepe, Karbancioglu-Guler, Daskaya, & Ozelik, 2017; Toldra, Reig, Aristoy, & Mora, 2018; Udenigwe & Howard, 2013). The low molecular weight, high bioavailability and flexible molecular behavior of these small BPs allow them to easily interact with very different proteins/

receptors *in vitro* and in the human body. The health bioactivities reported for these protein fragments include antihypertensive, antioxidant, dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) and  $\alpha$ -amylase inhibition, antimicrobial, antithrombotic and immunomodulatory activities, which has led to the recently coined term *multifunctional BPs* (Carmen Lammi, Aiello, Boschini, & Arnoldi, 2019). Consequently, the multifunctional capacity of these BPs and protein hydrolysates is a subject of commercial interest as nutraceutical products or functional ingredients.

The increasingly poor dietary habits of modern society have been accompanied by epidemics of obesity and metabolic disorders that are predicted to substantially increase the prevalence of chronic conditions such as cardiovascular diseases (CVD). Despite extensive clinical research into bioactive compounds to help prevent CVD (Kokubo et al., 2007; Palomo et al., 2019; Tsoupras et al., 2019), few data provide information on their specific molecular mechanism(s) and targets. In fact, cellular responses involved in the vascular and hemostatic systems

**Abbreviations:** ACE, Angiotensin I-Converting Enzyme; ARE, Antioxidant response element; Ang II, Angiotensin II; AT<sub>1</sub>R, Angiotensin II type 1 Receptor; BPs, Bioactive peptides; CAT, Catalase; C/EBP- $\alpha$ , CCAAT/Enhancer Binding Protein-alpha; CCK1, Cholecystokinin-1; CVD, Cardiovascular Disease; COX, Cyclooxygenase; DPP-IV, Dipeptidyl Peptidase-IV; ET, Endothelin; ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule-1; IL, Interleukin; JNK, c-Jun terminal protein kinase; LPS, Lipopolysaccharide; MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1; NF- $\kappa$ B, Nuclear Factor- $\kappa$ B; NOS, Nitric Oxide Synthase; Nrf2, Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2; PKC, Protein Kinase C; PPAR- $\gamma$ , Peroxisome Proliferators-Activator Receptor- $\gamma$ ; SHR, Spontaneously Hypertensive Rats; VCAM-1, Vascular Adhesion Molecule-1; RAS, Renin-Angiotensin System; ROS, Reactive Oxygen Species; SOD, superoxide dismutase; TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor-alpha; VSMCs, Vascular Smooth Muscle Cells

\* Corresponding author at: Laboratorio de Cultivo Celular y Cátedra de Riesgo Cardiovascular, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain.

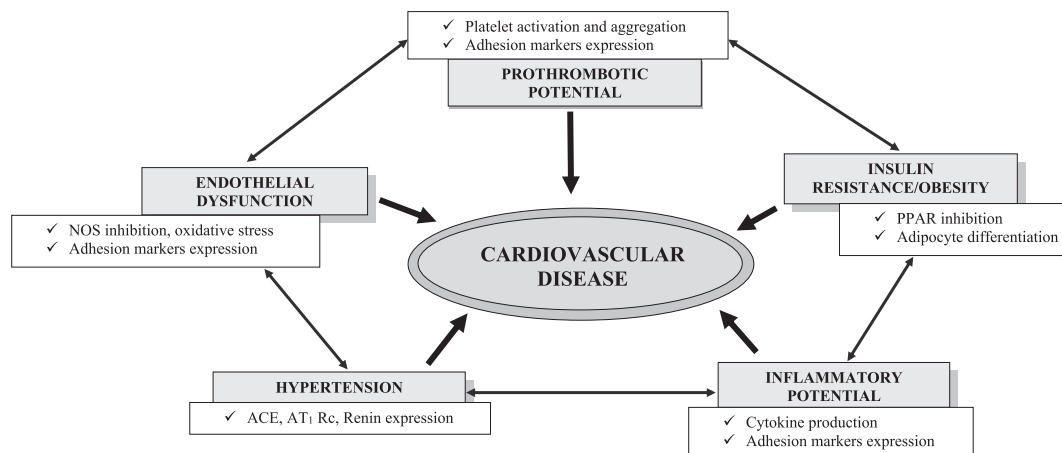
E-mail address: [smontoro@ucam.edu](mailto:smontoro@ucam.edu) (S. Montoro-García).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103645>

Received 5 July 2019; Received in revised form 11 October 2019; Accepted 17 October 2019

Available online 02 November 2019

1756-4646/© 2019 Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



**Fig. 1.** Overview of the pathways of cardiovascular disease. The early detection and prevention of these pathways is a critical point in the prevention of cardiovascular disease. The potential mechanisms of action of food-derived biopeptides are presented in white boxes.

provide a starting point for looking for health-promoting agents (Fig. 1). Moreover, there is great interest in decrypting molecular pathways of bioactive compounds to support cardiovascular-related health claims.

The assessment of biological activity has almost exclusively been used to detect the antihypertensive and antioxidant effects of protein hydrolysates. Besides, BPs are also subjected to significant modifications during gastrointestinal digestion and absorption, which complicates efforts to identify the metabolite(s) that cause effects at humans. As a result, the detailed mechanisms by which they prevent or revert pathological states have been poorly explored and were one of the “hot topics” at the 2nd International Symposium on Bioactive Peptides held in May 2019 in Valencia (Spain).

Rather than describing the beneficial physiological effects, the main objective of this review is to provide an overview on the molecular targets and crosstalk through the cardiovascular system impacted by BPs and to outline future perspectives for the development of new food-derived BPs related with cardiovascular health.

## 2. Vascular tone modulation mechanisms

### 2.1. Antihypertensive effect *in vivo*

Animal and *in vitro* evidence points to the potential mechanisms by which food-derived BPs may exert their blood pressure-lowering effects; Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibition (Martin & Deussen, 2019), renin inhibition (Aluko, 2019), nitric oxide (NO)-mediated vasodilation, and increased antioxidant response (Beltran-Barrientos et al., 2018).

Renin plays a key role in controlling blood pressure through its specific cleavage of angiotensinogen to generate angiotensin I, a decapeptide, which is finally converted by ACE into Angiotensin II (Ang II), the major effector of the Renin-Angiotensin System (RAS). Angiotensin II is also a potential activator of the oxidative and the inflammatory cascades. ACE is a well-recognized target for antihypertensive strategies and explains why the biological activity assessments have almost exclusively been limited to assays quantifying the *in vitro* inhibition of ACE (Boschin, Scigliuolo, Resta, & Arnoldi, 2014; Daskaya-Dikmen et al., 2017; Vercruyse, Van Camp, & Smagghe, 2005). Generally, these BPs are considered competitive substrates for ACE and the hydrophobic residues at the C-terminal end are the main actor in the binding process. Nonetheless, identification of biological activities in other angiotensins, the discovery of new receptors and enzymatic pathways, particularly in the angiotensin-(1–7)/Ang II/receptors axis, has led to the recognition of a complex system with intrinsic counter-regulatory characteristics *in vivo*.

Although several animal experiments have been performed to abolish possible oral metabolic modifications (Table 1), it is important to state that these studies do not reproduce when these bioactives are administered orally to humans. In fact, the mechanism of regulating beneficial vascular tone may differ in different species (e.g. human and rodent). For instance, it is acknowledged that dairy-derived peptides, particularly lactotriptides, efficiently reduce blood pressure in humans and have even been marketed for this purpose in Europe and Japan (Evolus® and Ameal S®) (Aihara, Kajimoto, Hirata, Takahashi, & Nakamura, 2005) (Cadee et al., 2007). Studies over the past two decades have provided important information on lactotriptides, recognizing them as an outstanding example of food-derived BPs with commercial applications (Fekete, Givens, & Lovegrove, 2013). In accordance, epidemiological studies indicate that the consumption of milk and dairy products contributes to a reduction in the incidence of metabolic diseases (Fekete, Giromini, Chatzidiakou, Givens, & Lovegrove, 2016). Nonetheless, a well-constructed clinical study did not support the blood pressure lowering effect of lactotriptides, as well as neither it could find changes in plasma ACE-activity (Engberink et al., 2008). A more recent study by Fekete et al. (2016) involved adults with pre/mild hypertension and showed that whey-protein supplementation significantly lowered 24 h ambulatory systolic and diastolic blood pressure. Besides, in a robust interventional study, Lucey, Heneghan, Manning, Kroon, and Kiely (2018) investigated the potential beneficial effects that egg ovalbumin-derived protein hydrolysates may have on heart health, in particular, on blood pressure (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02223169). Unfortunately, after an 8-week intervention, they did not report an effect of this egg protein hydrolysate fraction on markers of CVD risk (Lucey et al., 2018). Other studies with egg-derived BPs from enzymatic digestions have also pointed to their effects in animal models, where they resulted in a reduction of blood pressure accompanied by a reduction in plasma Ang II (Jahandideh et al., 2014; Majumder et al., 2013) (Table 1). Therefore, the inhibition of Ang II-induced vasoconstriction is suggested as a mechanism contributing to the antihypertensive effect of some milk and egg-derived peptides (Chakrabarti, Liao, Davidge, & Wu, 2017).

In a recent study in humans to evaluate the effect of the regular consumption of dry-cured pork ham rich in ACE, inhibitory BPs did not impair arterial blood pressure despite the higher salt intake for 4 weeks (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02585089). Interestingly, these data highlight that, far from being a “restricted food”, dry-cured ham consumption did not negatively affect blood pressure or sodium excretion, which may be regarded as a clinically relevant finding (Montoro-Garcia et al., 2017). To explain the absence of adverse effects, antihypertensive mechanisms other than the inhibition of ACE should be considered. A similar view was supported by the European Food Safety Authority

**Table 1**  
Examples of animal studies with food-derived bioactive peptides.

Peptide	Source	Animal	Activity	Reference
<i>Antihypertensive effects</i> RRWQWR, LIWKI and RPYL IRW	Milk, lactoferrin-derived Egg ovomastin-derived	SHRS SHRS	Reduce Ang II induced vasoconstriction in isolated rabbit carotid arterial segments Dose-dependent attenuation of BP: by ~10 mmHg and ~40 mmHg at the low- and high-dose groups respectively, compared to untreated SHRS. Increases the expression of ACE-2, ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1 Interferon regulatory factor and cadherin 1 while significantly decreasing the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in mesenteric arteries Improves vascular relaxation and modifies aortic Ang II receptors expression	(Fernandez-Musoles et al., 2014) (Majumder et al., 2013) (Majumder et al., 2015)
EWH (Egg White Protein Hydrolysate) YRGGLEPINF ESIINF	Egg white protein Egg-white protein	SHRS SHRS	Vascular-relaxing mechanism independent of ACE inhibition.	(Jahandideh et al., 2016) (Viguel et al., 2007)
TRB (Termolisin digested-rice brand) LRA, YY	Termolisin digested-rice brand	SHRS	Long term administration of TRB (50 mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ), lowered systolic blood pressure compared with the control group. TRB reduced ACE activity in the lung in a dose-dependent manner, but no changes were observed in ACE activities in the aorta, kidney, and heart tissues. Orally administered LRA (0.25 mg kg <sup>-1</sup> ) and YY (0.5 mg kg <sup>-1</sup> ) lowers blood pressure at 4 h after administration.	(Shobako et al., 2018)
IQP, VEP	<i>Spirulina platensis</i> hydrolysates	SHRS	Inhibition of the ACE, Ang II and AT1R	(Zheng et al., 2017)
Salmon gelatin hydrolysate	Salmon	SHRS	Upregulation of ACE2, Ang (1-7), Mas and AT 2 ACE and DPP-IV inhibitory activity <i>in vitro</i>	(Neves, Harnedy, O'Keefe, Alashi, et al., 2017)
SLR, YY, ER, and FR	Papain digested bovine serum albumin	SHRS	ACE inhibitory activity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	(Lafarga, Aluko, Rai, O'Connor, & Hayes, 2016)
Hydrolysate fraction Milk peptides	Palm kernel Milk protein hydrolysate	SHRS SHRS	Antihypertensive effects Attenuate the development of hypertension: systolic blood pressure increases 33 ± 3 mmHg in control group compared to 18 ± 5 mmHg in the treated group. Improve aorta and mesenteric acetylcholine relaxation Increase the eNOS expression in aorta Decrease left ventricular hypertrophy and interstitial fibrosis	(Zheng et al., 2017) (Sanchez et al., 2011)
RVPSL	Egg	SHRS	Dose-dependent decrease of systolic blood pressure from the first week with a maximum at a dose of 50 mg/kg.	(Yu et al., 2014)
Rapakinin (RIY)	Rapeseed	SHRS	Increases the mRNA expression of renin, ACE, and AT1 receptor in kidney. Decreases serum Ang II, renin, and aldosterone levels Dilatation of mesenteric artery mediated mainly by the PGI2-IP receptor, followed by CCK-CCK1 receptor-dependent vasorelaxation	(Yamada et al., 2010)
<i>Other effects</i> VPP Hemp seed Protein hydrolysate Milk peptides	Milk, casein-derived Hemp seed Fermented milk with <i>Lactococcus lactis</i> NRRL B-50571 Soy	C57BL/6J Mice SHRS SHRS	Attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation Decreases the SOD and catalase expression together with lower total peroxides levels Enhance nitric oxide production and antioxidant activity	(Aihara, Osaka, & Yoshida, 2014) (Girgh et al., 2014) (Beltran-Barrientos et al., 2018)
Lunasin	Soy	Apolipoprotein E-deficient (ApoE <sup>-/-</sup> ) mice	Decreases plaque formation in an experimental ApoE2/2 atherosclerotic model.	(Gu et al., 2019)

ABCB-1: ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1; ACE: Angiotensin I Converting Enzyme; Ang II: Angiotensin II; AT1R: Angiotensin II type-1 receptor; CDH-1: cadherin 1; eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase; CCK1: cholecystokinin-1; COX: Cyclooxygenase; IRF-8: Interferon regulatory factor 8; PGI2-IP: Prostacyclin receptor; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1; SOD: superoxide dismutase; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats.

Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, since they agreed to consider a shrimp peptide concentrate (> 87% peptides) as a novel food pursuant based on two distinct clinical trials, one of them with mild/moderate hypertension volunteers (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01583582). No statistically significant difference was observed between the shrimp peptide concentrate treatment and placebo groups in blood pressure when the concentrate was taken in doses of 1200 mg/day over a treatment period of 8 weeks (unpublished, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01583582). In this case, the administered dose was not high enough to exert a quantifiable effect. Hereafter, it seems well demonstrated that oral administration of BPs induces vasorelaxation although in most studies, the antihypertensive effect could not be ascribed directly to the *in vivo* ACE inhibition because plasmatic activity and levels were rarely measured. For instance, plasmatic ACE activity was reduced after acute administration of a chicken feet hydrolysate to spontaneously hypertensive rats (SHR) (Anna Mas-Capdevila, Pons, Aleixandre, Bravo, & Muguerza, 2018). However, when the same product was administered to diet-induced hypertensive rats, blood pressure was also lowered but without altering plasma ACE activity (Mas-Capdevila et al., 2019).

Sources of blood pressure lowering BPs are very heterogeneous and include some of vegetal origin. Kwak et al. (2013) analyzed the blood pressure levels from 100 prehypertension individuals and found that black soy peptide dietary supplementation over a period of 8 weeks significantly reduced systolic levels and oxidative stress (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01674491). The blood pressure lowering effects of fermented soybean milk administration were also evaluated in SHR (Bao & Chi, 2016). Interestingly, plasma ACE inhibitory activity was also found in fermented skimmed camel milk when tested in SHR (Yahya, Alhaj, & Al-Khalifah, 2017). In a 3 week randomized double blind placebo-controlled crossover human intervention trial with only 7 volunteers, significant reductions in systolic blood pressure were found for the group taking pea-protein hydrolysate (Li et al., 2011). Based on previous results in SHR (Girgih, Alashi, He, Malomo, & Aluko, 2014) (Table 1), a clinical trial analyzed the effect of hemp seed protein hydrolysate with BPs on systolic and diastolic ambulatory blood pressure (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03508895) but no published results were found. Lafarga, Gallagher, Aluko, Auty, and Hayes (2016) developed a functional bread containing BPs with *in vitro* and anti-hypertensive activities in SHR. This was followed by a clinical trial in humans, which resulted in a mild improvement in 24 h systolic blood pressure (Cicero et al., 2018) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02197910).

The clinical efficacy of BPs depends on two critical factors: their resistance to degradation by gastro-intestinal peptidases and their absorption into the blood stream in sufficient quantities (Gianfranceschi, Gianfranceschi, Quassinti, & Bramucci, 2018). In accordance, most of the above trials included the impact of gastrointestinal digestion and epithelial absorption processes of the food-derived BPs before the *in vivo* interventions. Nonetheless, it is evident that the human metabolism could significantly differ from animal models and *in vitro* bioavailability experiments.

## 2.2. Blockade of AT receptors

Looking for alternative antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibition, the Ang II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) blockade is also widely regarded as reducing blood pressure. AT<sub>1</sub>R is a membrane G-protein-coupled receptor, which mediates most of the pathological effects of Ang II in vascular smooth muscle cells (VSMCs). In fact, AT<sub>1</sub>R blockers are also used as antihypertensive drugs to avoid the side effects of ACE inhibitors (Contreras et al., 2003). Moreover, food-derived BPs would also affect the RAS by directly downregulating the expression of AT<sub>1</sub>R and Ang II proteins (Fig. 1).

Along these lines, the peptides IQP and VEP as well as a hydrolysate from *Spirulina platensis* have been administered to SHR (Table 1). In

both approaches, peptide fractions decreased rat blood pressure by affecting the expression of local kidney RAS components, downregulating the gene expression of AT<sub>1</sub>R, Ang II, ACE and upregulating ACE-2, Ang (1–7), Mas and AT<sub>2</sub>R (Pan et al., 2015; Zheng et al., 2017). These major changes in the RAS system would improve protection against hypertension compared with ACE inhibition. As regards the modulation of Ang II receptor expression, soy protein derived ACE-inhibitory peptide (LSW) had an additional vascular toning effect on rat VSMCs. Together with ACE inhibition, the peptide treatment abolished the upregulation of AT<sub>1</sub>R expression in Ang II stimulated cells, suggesting an additional mechanism of action (Lin, Liao, Bai, Wu, & Wu, 2017). In the latter case, LSW treatment significantly reduced the phosphorylation of p50, but not of p65 nuclear transcriptional factors. Besides, LSW decreased the Src and ERK1/2 phosphorylation, again supporting the regulatory roles of this BP in intracellular pathways (Fig. 1).

There is other evidence that milk and egg-derived BPs antagonize the Ang II binding receptors in animal models. Lactoferrin derived peptides, RRWQWR, LIWKL and RPYL, reduced blood pressure in SHRs and *ex vivo* vasoconstriction in rabbit carotid arterial segments (Fernández-Musoles et al., 2013) (Table 1). Moreover, egg-derived peptide RVPSL reduced blood pressure in SHRs and significantly decreased the mRNA levels of AT<sub>1</sub>R, ACE and renin, together with serum levels of Ang II (Yu, Yin, Zhao, Chen, & Liu, 2014). Accordingly, the RVPSL peptide has been shown to be translocated from the lumen to the basolateral side of Caco-2 cell monolayers in order to bind its receptors (Ding, Wang, Yu, Zhang, & Liu, 2016). A pioneering study reported a prominent effect of the ACE inhibitory egg-derived peptide, IRW, in mesenteric arteries of SHR (Majumder et al., 2015). The authors suggested changes in the transcriptome and demonstrated an increase in ACE-2 expression. Another study showed how egg white hydrolysate reduced blood pressure mainly by reducing the expression of AT<sub>1</sub>R and concomitantly enhanced that of AT<sub>2</sub>R in SHRs (Jahandideh et al., 2016). Since the AT<sub>1</sub>R is responsible for the most known pathogenic effects of Ang II in the body, these transcriptional changes entail a potentially novel way to attenuate peripheral vascular resistance. Nonetheless, the clinical evidence in this regard remains inconsistent for the time being. Transcriptomic and proteomic approaches may provide an important avenue of investigation for deciphering the functional role of these BPs. However, it is evident that the action mechanisms of antihypertensive BPs are far more complicated than simple structural binding to the ACE enzyme.

## 2.3. Renin inhibition

Recent scientific advances have revealed another layer of complexity and have incorporated the renin inhibitory activity to food-derived BPs. Consequently, a double inhibition (ACE and renin) could come into force through a synergic effect, reducing blood pressure. Renin catalyzes an initial step of the RAS pathway, the inhibition of which results in lower levels of Ang II and AT<sub>1</sub>R production. Interestingly, Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides exhibit a renin competitive inhibition behavior in a dose-dependent way (Quiroga, Aphalo, Nardo, & Añón, 2017). This outcome is contrary to that mentioned by He, Malomo, Girgih, Ju, and Aluko (2013), who found that renin and ACE activities were inhibited by a rapeseed derived peptide (GHS) in a non-competitive way. An antihypertensive peptide derived from rapeseed protein, rapakinin interacts with the prostaglandin IP receptor, followed by the cholecystokinin-1 (CCK1) receptor (Yamada et al., 2010). Rapakinin relaxed the mesenteric arteries from SHRs *ex vivo* and normotensive Wistar rats. Since the vasorelaxing effect was blocked by a COX inhibitor and by an IP receptor antagonist, the authors suggested that it was mediated by the prostaglandin I<sub>2</sub> and IP receptor. Moreover, since the CCK1 antagonist also suppressed vasorelaxation, this activity could also be mediated by CCK1 and its receptor. Researchers also found that the renal expression of renin mRNA levels was reduced approximately 50% in SHR fed a pea

protein-hydrolysate, and thus the reduced levels of Ang II could be a consequence of the low renin levels (Li et al., 2011). Proteolytic hydrolysis of the red macroalga *Palmaria palmata* produced a renin inhibitory peptide IRLIIVLMPILMA *in vitro* (Fitzgerald et al., 2012) and blood pressure was reduced in SHR when it was administered orally over a 24 h period (Fitzgerald, Aluko, Hossain, Rai, & Hayes, 2014). Hemp seed (*Cannabis sativa*) hydrolysates also inhibited renin *in vitro*, apart from ACE, and resulted in an *in vivo* decrease of blood pressure in SHR when administered orally (Malomo, Onuh, Girgih, & Aluko, 2015). Most importantly, this study is a clear example that BPs are absorbed in the gastrointestinal tract and permeate the target cells.

An interesting study assessed the possibility of a depressant effect of Amaranth seed BPs on the myocardium of SHRs. No significant negative inotropic effects were found, and as a consequence, it was assumed that in *in vivo* conditions, the heart is not affected and the BPs hypotensive effects would only attributable to a decrease in peripheral resistance (Fritz, Vecchi, Rinaldi, & Anon, 2011). More recently and consistent with the latest thinking, Lafarga et al. (2016) demonstrated that a papain hydrolysate of bovine serum albumin had renin and ACE inhibitory capacities that contribute to lowering peripheral resistance in a synergistic way, although the hydrolysate was only tested *in vitro*. Clear implication of these findings is that both ACE and renin should be taken into account when considering hypotensive effects of BPs towards the overactive RAS. Whilst most studies focus on the ACE activity, the renin activity is also of paramount importance and further research regarding the inhibition of renin activity is strongly recommended.

### 3. Nitric Oxide (NO) vasorelaxation

Endothelium-derived NO has a dual effect on the vascular tone and homeostasis regulation, although most studies are still centered on its vasodilatory effect. Similarly, endothelial NO synthase (eNOS or NOS3) is the main endothelium-derived relaxing factor, but NO is also involved in artery remodelling and oxidative status. Nitric oxide synthase has three well-characterized isoforms, encoded by different genes: the isoform originally identified in the brain (neuronal NOS or nNOS), macrophages (inducible NOS or iNOS) and endothelial cells (eNOS) (NOS1, NOS2 and NOS3, respectively). The mechanisms of eNOS activation have been seen slightly regulated, reflecting the complexity of the physiological control of distinct vascular beds. Intracellularly, eNOS activation occurs after phosphorylation of Serine residues (S617, S1179, S635 and S1179) by the protein kinase Akt/protein Kinase C (PKC) and depends on cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and L-arginine levels (Fulton et al., 1999). The evidence from an animal study indicated that an arginine-rich cationic peptide fraction from a flaxseed protein isolate rapidly decreased systolic blood pressure after only 2–4 h of oral gavage, suggesting that antihypertensive peptides may function via the arginine–NO pathway (Udenigwe et al., 2012). Unfortunately, plasma NO levels were not determined in this study. Further work is thus required to confirm arginine-rich peptides as a NO precursor.

The literature mentions that many BPs induce vasorelaxation due to activation of the nitrergic system. Although the eNOS and nNOS isoforms are defined as constitutive, unlike the canonically iNOS, their expression may be regulated by BPs. O'Keeffe and FitzGerald (2018) recently analyzed the transcriptomic changes in endothelial cells incubated with a whey hydrolysate and found an upregulation of eNOS and other vasomodulatory gene. Similarly, the consumption of a whey protein-derived extract increased endothelium NO release and improved brachial artery flow-mediated vasodilatation in healthy and overweight humans (Ballard et al., 2009; Ballard et al., 2013). Originally, a myristoylated peptide with a sequence (13 amino acids) mimicking an endogenous PKC pseudosubstrate region was seen to be able to activate eNOS dependent on the PI3K/Akt pathway in isolated pulmonary artery segments (Krotova et al., 2006). This peptide was not food-derived but intrinsic, and synthetic peptides could help point us

towards the underlying action mechanisms of the food-derived BPs. Protein kinase C belongs to a family of serine/threonine kinases, which are involved in many signaling events (cancer, apoptosis, inflammation, etc.) and increasing efforts have been directed at generating specific inhibitors for the PKC active enzyme. In accordance, a decapeptide from the cyanobacterium *Spirulina platensis* was tested *in vivo*, by administering GIVAGDVTPI to eNOS-deficient mice and finding improved endothelial vasorelaxation associated with enhanced serum nitrite levels (Carrizzo et al., 2019). The authors demonstrated involvement of the Akt/PKC/eNOS pathway with the aid of specific pharmaceutical inhibitors *ex vivo*. Subsequently, food-derived BPs that influence eNOS-dependent NO production has been explored in several studies, although the pathways governing such levels are still not entirely clear.

Besides eNOS, little is known about iNOS regulation and it is not clear how BPs could play a counteracting effect. This induction is strongly dependent on the activation of the transcriptional nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a major mediator of the cytokine-inducible inflammatory response. A tripeptide PAY from a salmon byproduct protein after pepsin hydrolysis was shown to significantly suppress the expression of iNOS and cyclooxygenase-2 (COX-2) proteins in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cells, responsible to produce NO and prostaglandin E2, respectively. Low NO levels at the site of inflammation are likely to positively contribute to tissue repair, suggesting that PAY could be interesting for preventing nitrosative stress (Ahn, Cho, & Je, 2015) (Table 2). Bioactive peptides from other fish species have also demonstrated inhibitory effects on NO and iNOS. Following the addition of 2 mg/mL protein extract from canned sardine (< 10 kDa), a significant decrease in NO production as well as reactive oxygen species (ROS) was recorded in tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-stimulated endothelial cells (Vieira, Van Camp, Ferreira, & Grootaert, 2018). More importantly, a new therapeutic approach for chronic rhinosinusitis (an inflammatory condition associated with low nasal NO levels) showed that arginine-rich low molecular weight peptides (LMWPs) derived from the FDA-approved protamine (obtained from salmon sperm) significantly raised NO production in both RAW 264.7 mouse macrophage and LA4 mouse epithelial cell lines through iNOS stimulation (Balijepalli et al., 2015). However, these findings do not identify the molecular targets of these BPs. From a therapeutic standpoint, the modulation of NO pathways with BPs represents an attractive strategy, but there are still many related issues that remain open, as stated above, as to how they overexpress eNOS in endothelial cells.

Endothelium-dependent vasoconstriction in vessels is tightly controlled, and attributable to vasoactive peptides called endothelins. Three isoforms of endothelin have been described (ET-1, ET-2, ET-3). Bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates, VIEPR, LPILR, ADVFNPR and VVLYK, exert ACE inhibitory activity but have also been proposed as potential inhibitors of the intracellular ET-1 content. The highest inhibition capacity was found for the peptide VVLYK at 1 mg/mL, in accordance with its high ACE inhibitory activity. Moreover, all of them had a significant protective effect on EA.hy926 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced damage (Zheng, Li, Zhang, Ruan, & Zhang, 2017) (Table 2).

### 4. Inflammation, the NF- $\kappa$ B pathway and oxidative stress

Inflammation plays a pivotal role in the phenotypic switch to a proatherogenic endothelium. Cytokines such as TNF- $\alpha$ , interleukins (IL-6, IL-1b) and LPS induced the overexpression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin (CD62E) in *in vitro* models of endothelial cells, mainly through activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B (Ledebur & Parks, 1995). In constitutive conditions, NF- $\kappa$ B is retained in the cytoplasm bound to its inhibitory protein, I kappa B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ , NEMO subunit). Upon degradation of the I $\kappa$ B- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B is translocated into the nucleus where the p50 and p65 subunits must be phosphorylated for efficient DNA-binding and further transcriptional activity.

**Table 2**  
*In vitro* activities of bioactive peptides on the cardiovascular system. The different action mechanisms that result in the observed effects have not been always defined.

Peptide	Source	Cell <i>in vitro</i>	Activity	Mechanism(s) of action	Reference
<i>Inflammation and vascular protection</i>					
VPP	Milk-derived casein peptide	Monocytic THP-1 cells HUVECs	Modulates monocyte adhesion to vascular endothelium	Attenuates the JNK1 pathway, significantly suppresses phosphorylation of JNK1	(Aihara, Ishii, & Yoshida, 2009)
IPP, VPP	Milk-derived casein peptides	HUVECs	Increase relative NO concentration in a dose dependent manner	Not defined	(Hirota et al., 2011)
IPP, VPP	Milk-derived casein peptides	VSMCs	Relaxation of aortic ring that disappeared after endothelium removing		
			Prevent the Ang II-induced ROS production without altering AT1 receptor levels	VPP alone abolishes the Ang II-mediated phosphorylation of p65 while the expression of Erk1/2 is not impaired	(Chakrabarti et al., 2017)
			VPP but not IPP inhibits Ang II induced COX-2 expression.		
Sodium casein-derived peptides	Milk hydrolysate	Human aortic endothelial cells	Suppress the production of inflammatory proteins MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin (NF- $\kappa$ B pathway inhibition)	Up-regulate PPAR- $\gamma$ which suppress the gene expression	(Marcone et al., 2015)
IRW, IQW	Egg: ovotransferrin	HUVECs	IRW suppresses ICAM-1 and VCAM-1 expression. IQW significantly reduce TNF $\alpha$ -stimulated superoxide generation	IRW abolishes the TNF- $\alpha$ induced translocation of both p65 and p50 IQW only inhibits the p50 translocation	(Majumder, Chakrabarti, Davidge, & Wu, 2013)
LSW	Soya	VSMCs	IRW and IQW significantly reduce TNF $\alpha$ -stimulated superoxide generation		
WDHHPQLR	Rapped protein	HUVECs	Inhibits the upregulation of AT1R expression in Ang II stimulated cells	Reduces the phosphorylation of p50, but not p65 of NF- $\kappa$ B	(Lin et al., 2017)
			Inhibits apoptosis of oxidative stress cells	Decreases the Src and ERK1/2 phosphorylation	(Xu et al., 2018)
			Down regulates of the expression of Bax and caspase-3 genes	Not defined	
VIEPR, LPILR, ADVFNPR and VVLYK	Oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates	Ea.hy926 cells	Up-regulates of the expression of Bcl-2	Not defined	(Zheng et al., 2017)
Lunasin	Soya (2S albumin)	THP-1 HUVECs	Protect against H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induced damage	Stimulatory effects on expression of the KLF2 transcriptional factor via MEK5/ERK5 pathway.	(Zhu et al., 2017)
			Ameliorates ox-LDL-induced adhesion of THP-1 monocytes to the surface of HUVECs		(Gu et al., 2019)
			Suppresses expression of VCAM-1 and E-selectin, but not ICAM-1		
PAY	Salmon pectoral protein hydrolysate	RAW 264.7 (macrophages)	Decreases MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ secretions	Not defined	(Ahn et al., 2015)
			Inhibits the NO and PGE2 levels		
			Inhibits inducible NOS and COX-2 expression		
			Attenuates TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ production		
<i>Lipid and glucose metabolism</i>					
IPP, VPP	Milk-derived casein peptides	3T3-F442A cells (preadipocytes)	Decrease adipokine levels	Up-regulate PPAR- $\gamma$ which stimulates the secretion of adiponectin and GLUT4	(Chakrabarti & Wu, 2015)
			Enhance insulin signaling and contribution to the prevention of insulin resistance in the presence of TNF- $\alpha$	Inhibit NF- $\kappa$ B under TNF- $\alpha$ stimulation	(Chakrabarti et al., 2018)
			VPP further enhances the expression of GLUT4 and restored glucose uptake in TNF $\alpha$ -treated adipocytes		
IADHFL	Bighead carp ( <i>Hypophthalmichthys nobilis</i> )	INS-1 cells	Increases the insulin secretion	Not defined	(Zhang et al., 2018)
			Regulates several genes associated with diabetes		
DIVDKIEI (TP-D)	Tuna	3T3-L1	Decreases the glucose uptake in adipocytes	Inhibits the C/EBP- $\alpha$ and PPAR- $\gamma$ pathways	(Kim, Kim, Kim, & Nam, 2015; Kim et al., 2015)
			Decreases the triacylglycerol levels and lipid accumulation	Activates the Wnt pathway which promotes subsequent Wnt-10b mRNA expression	
GEY and GYG	Active compounds from the silk peptide ESK6	3T3-L1	Suppress accumulation of intracellular fat droplets	Not defined	(Han et al., 2016)
			Increase expression of GLUT4		(continued on next page)



Table 2 (continued)

Peptide	Source	Cell in vitro	Activity	Mechanism(s) of action	Reference
EWB (Egg White Protein Hydrolysate)	Egg white protein	3 T3-F442A preadipocytes	Stimulation of the adipocyte differentiation by increasing lipid accumulation, release of adiponectin and insulin effects Attenuation of cyclooxygenase -2 (COX-2)	Upregulates PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ and protein kinase B/Akt phosphorylation pathways Increases extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation to a level similar to that of insulin Inhibits c-Jun phosphorylation and AP-1 pathway	(Jahandideh et al., 2017)
Lunasin	Soya (2S albumin)	RAW264.7 3 T3-L1	Anti-inflammatory agent in macrophages and adipocytes, disrupting the crosstalk between these two cells	Inhibits MCP-1, TNF- $\alpha$ and IL-1 $\beta$ secretion in RAW264.7 cells Inhibits MCP-1, plasminogen activator inhibitor-1, and leptin productions in 3 T3-L1 cells	(Hsieh et al., 2017)
<i>Oxidation and apoptosis</i> RHPHPHLSFM, VLPVPEK ARHPHPHLS, VPPVQR PHP	Milk peptides Chinese baijiu	Caco2 cells HepG2 cells	Prevention decrease of cell viability Reduction of lipid peroxidation level Suppresses the generation of ROS, MDA and GSSG Prevents the GSH decrease Increases the catalase, SOD and GSH-PX activities	Reduce MDA levels of TBOOH treated Caco2 cells Upregulates Nrf2 pathway	(Tonolo et al., 2019) (Wu et al., 2018)
Rice-derived bran bioactive peptides (RBAP)	Rice	HUVECs	Ameliorate H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> injury-induced cell morphological changes	Decrease p65 phosphorylation Compromise the release of caspase-3 Interaction with TLR4	(Liang et al., 2018)
Lunasin	Soya (2S albumin)	Ea.hy926	Decrease the H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced ROS production Attenuates the H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced mitochondria-dependent endothelial apoptosis	Down-regulates Bax and up-regulates Bcl-2, by inhibiting the mitochondrial depolarization, and reducing the release of cytochrome C, as well as decreasing the activation of caspase-9 and caspase-3. Up-regulates the expression of HO-1 via PI3K/Akt/Nrf2/ARE pathway.	(Gu et al., 2019)

ACE: Angiotensin I-Converting Enzyme; ARE: Antioxidant response element; Ang II: Angiotensin II; C/EBP- $\alpha$ : CCAAT/Enhancer Binding Protein- $\alpha$ ; COX: Cyclooxygenase; DPP-IV: Dipeptidyl Peptidase-IV; ET: Endothelin; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; GLUT4: glucose transporter; HUVECs: Human umbilical venous endothelial cells; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1; IL-8: Interleukin-8; MDA: malondialdehyde; MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1; NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor- $\kappa$ B; NOS: Nitric Oxide Synthase; Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2; PGE2: Prostaglandin E2; PPAR- $\gamma$ : Peroxisome Proliferators-Activator Receptor- $\gamma$ ; ROS: Reactive Oxygen Species; SOD: Superoxide Dismutase; TBOOH: tert-butyl hydroperoxide; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; VCAM-1: Vascular Adhesion Molecule-1; VSMCs: Vascular Smooth Muscle Cells.

Eleven novel peptides with 5–9 amino acid residues from a zein hydrolysate have been characterized, and of these, three peptides showed strong anti-inflammatory activity by inhibiting ICAM-1 and VCAM-1 expression in TNF- $\alpha$  stimulated endothelial Ea.hy926 cells (Liang, Chalamaiiah, Ren, Ma, & Wu, 2018). Regulation seems to involve the NF- $\kappa$ B pathway, and some studies suggest that the effect is mediated through the peroxisome proliferator-activator receptor-gamma (PPAR- $\gamma$ ), a transcription factor that antagonizes the pro-inflammatory capability of NF- $\kappa$ B. In fact, Marcone, Haughton, Simpson, Belton, and Fitzgerald (2015) demonstrated that a milk hydrolysate containing BPs inhibited the inflammatory expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), IL-8, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin proteins. Interestingly, these changes were like those seen in endothelial cells treated with troglitazone, a ligand of the PPAR- $\gamma$  (Marcone et al., 2015). In the same line, Majumder et al. (2015) showed that the egg tripeptides IRW and IQW are able to prevent TNF- $\alpha$  stimulated ICAM-1 and VCAM-1 expression. They found that IRW inhibits both p50 and p65 subunit translocations, while IQW only inhibits the p50 translocation and thus efficiently regulates ICAM-1 but not VCAM-1 expression. Moreover, a hydrolysate of low molecular weight (< 10 kDa) from sardine protein significantly decreased the inflammation markers NO, MCP-1, Vascular Endothelial Growth Factor, IL-8, ICAM-1 and endothelial ROS compared to TNF- $\alpha$  stimulated endothelial cells (Vieira et al., 2018). However, a substantial body of experimental data indicates that BPs of different origins improve the inflammatory profile, although the fact that most of the BPs are present in uncharacterized extracts limits the ability to decipher the target molecules such as NF- $\kappa$ B or PPAR- $\gamma$ . In fact, few human studies have tested the anti-inflammatory action of BPs. In a recent clinical study, the effect of the regular intake of dry-cured ham rich in BPs was evaluated in healthy individuals with mild-hypertension. The BP treatment positively affected monocyte surface activation markers apart from plasmatic P-selectin and IL-6 secretion (Martinez-Sanchez et al., 2017), (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02585089). Importantly, soluble MCP-1 and VCAM-1 were not impaired after intake of the BPs.

Toll-like Receptors (TLRs) are type I transmembrane proteins indirectly activated by LPS, and, accordingly are involved in immune and inflammatory responses. Particularly, toll-like receptor 4 (TLR4) polymerization mediates the rapid activation of NF- $\kappa$ B and the transcription of dependent cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Two specificity designed peptides have been seen to successfully block the docking site of the TLR4 protein and thereby inhibit its inflammatory signaling (Toshchakov, Piao, & Vogel, 2013). It has also been found that rice-derived BPs are also able to bind TLR4, decreasing the phosphorylation of p65 and so, compromising the release of caspase-3 (Liang et al., 2018). In agreement with these results, WDHHPQLR, a peptide derived from rapeseed protein, has been shown to downregulate the expression of Bax and caspase-3 and to upregulate the expression of Bcl-2 in hydrogen peroxide-induced endothelial cells (Xu et al., 2018). Moreover, lunasin is known as a cancer preventive, anti-inflammatory and cholesterol-reducing peptide that was first found in the soybean 2S albumin (Galvez & de Lumen, 1999) and later in other grains and herbal plants (Jeong, Jeong, Hsieh, Hernandez-Ledesma, & de Lumen, 2010; Maldonado-Cervantes et al., 2010). Although its effects on blood pressure were controversial, recent studies have reported that this 43 residues peptide could induce a dose-dependent decrease in the proinflammatory secretion of MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  in LPS-stimulated human RAW264.7 macrophages (Hsieh, Chou, & Wang, 2017). Other authors found similar data, lunasin being seen to have an anti-inflammatory capacity by inhibiting MCP-1, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and leptin production in TNF- $\alpha$ /LPS stimulated RAW264.7 cells. Exploring in detail the molecular mechanisms of action, Cam and Gonzalez de Mejia (2012) used *in vitro* immunoprecipitation to make a deeper analysis of the interaction between lunasin and the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin receptor. They concluded that lunasin efficiently bound the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin in LPS-stimulated human

macrophages, which downregulated Akt-mediated NF- $\kappa$ B pathways and impaired the proinflammatory response (pro-inflammatory cytokines release). Furthermore, lunasin isolated from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) was also responsible of the inhibition of NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in LPS-stimulated RAW264.7 (Ren, Zhu, Shi, & Li, 2017). Other *in vitro* models found that this long antioxidative peptide, also significantly minimized the damage to lipids since the ox-LDL-induced adhesion of THP-1 monocytes to the vascular surface decreased *in vitro* (Zhu, Li, & Wang, 2017), mainly through the suppression of adhesion molecules (VCAM-1 and E-selectin, but not ICAM-1). Mechanistically, the authors demonstrated that the MEK5/ERK5 pathway mediates the effects of lunasin in Krüppel-like transcriptional factor (KLF2). In addition, lunasin treatment could reverse the effects of ox-LDL on the expression of eNOS and PAI-1, the direct target genes of KLF2. The ability of lunasin to protect the endothelium was also explained in another experimental study, in which Gu et al. (2019) showed that it protected endothelial Ea.hy926 cells from oxidative stress by up-regulating heme oxygenase-1 (HO-1) expression that involves the potent erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element pathway. More precisely, the PI3K/Akt pathway was also implicated in the activation of Nrf2/HO-1 by lunasin. Authors also described a cytoprotective function of lunasin in 6 week old ApoE-/- mice fed a high-fat diet, in which the peptide inhibited atherosclerotic plaque progression. The many and various mechanisms of action of lunasin (MEK5/ERK5, PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B pathways) imply that it may exert a wide range of functions in vascular biology (Fig. 1). Despite some mouse studies, it is uncertain to what extent, the regular intake of lunasin could prevent the progression of atherosclerosis in a clinical setting, but the matter merits more research.

Oxidative regulation is undoubtedly involved in homeostasis. Many peptides, mainly from milk, have been described as preventing oxidative damage and lipid oxidation. Tonolo et al. (2019) studied the effects of milk-derived peptides in an oxidative stress model with tert-butyl hydroperoxide. RHPHPHLSFM and VLPVPEK peptides were able to protect cell viability, while ARHPHPHLSF and VPYPQR reduced the level of lipid peroxidation. Like lunasin, the antioxidant response described was mediated by the Nrf2 transcriptional factor. In oxidative or chemical responses, Nrf2 translocates to the nucleus, where it promotes the transcription activation of detoxifying/antioxidant enzymes by binding to the antioxidant response element (ARE) in the promoter regions of the targeted genes (Fig. 1). A tripeptide derived from Chinese baijiu, PHP, displayed protective effects in HepG2 oxidative stressed cells (Wu et al., 2018). Pretreatment with PHP suppressed the generation of ROS, malondialdehyde and oxidized glutathione, as well as prevented the decrease in reduced glutathione, and upregulated the activities of the cellular antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase. Once more, all these effects seemed to be the result of an upregulation of Nrf2. In another study, two peptides found in the digest of *Stracchino* soft cheese, EAMAPK and AVYPYQ, were synthesized and tested *in vitro*. They displayed antioxidant activities over a wide concentration range (5–150  $\mu$ g/mL), involving ROS reduction, increased SOD and HO-1 expression mediated through the Nrf2 antioxidant response activation (Pepe et al., 2016). *In vivo*, a hemp seed hydrolysate also decreased SOD and catalase and lowered total peroxides levels in SHR, although, unfortunately the mechanistic aspects of such activities were not investigated (Girgih et al., 2014). In a similar study, a fermented lentil hydrolysate (FL) rich in peptides among other compounds, exerted cytoprotective effects against oxidative stress in hydroperoxide treated RAW264.7 macrophages. The FL prevented the oxidative stress via the activation of c-Jun terminal protein kinase 1 (JNK1) phosphorylation, Nrf2-nuclear translocation and antioxidant enzymes expression (Bautista-Exposito, Penas, Frias, & Martinez-Villaluenga, 2019). Besides,  $\gamma$ -glutamyl valine, a dietary dipeptide found in beans, forms a complex with the calcium-sensing receptor (CaSR) and abolishes the same pathway in which the phosphorylation of JNK1 activates proinflammatory cytokine release in

a simulated systemic inflammatory response (Chee, Majumder, & Mine, 2017). Food-derived BPs have been tested in a network of two main clusters comprising inflammation- and oxidative stress-related pathways, with the NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways at the hub of the two clusters (Fig. 1). It is evident then that the potential of these BPs to mediate these clusters has gained enormous interest in recent years.

In short, given the potential of BPs to influence molecular and cellular responses in oxidative stress and inflammation, their dietary intake could become an important strategy in cardiovascular health. However, fresh research is still required in this field.

## 5. Adipocyte differentiation and glycemic control

Considerable progress has been made in recent decades to define the crosstalk mechanisms between atherosclerosis, inflammation and obesity. In this section, we now focus on targets sharing similar expression profiles in both the adipose and vascular tissues. Pioneering experimental studies have documented the prominent role of PPARs in foam cell differentiation and insulin resistance. These receptors belong to the nuclear receptor super family ( $\gamma$ ,  $\beta/\delta$ , and  $\alpha$ ), exert a plethora of cardiovascular protection activities and create an interface between inflammation and adipogenesis. PPAR- $\gamma$ , particularly, appears to be highly expressed in a systemic inflammatory environment, and its activation efficiently ameliorates the inflammatory response in endothelial cells (Hamblin, Chang, Fan, Zhang, & Chen, 2009). PPAR $\alpha$  activation has been shown to enhance free fatty acid oxidation and potentiates anti-inflammatory effects, while PPAR $\gamma$  is essential for normal adipocyte differentiation and proliferation, as well as fatty acid uptake and storage. In the same line, PPAR $\gamma$  also suppress free fatty acids via the inhibition of lipolysis in adipose tissue. Insulin sensitizers currently under development include partial PPAR $\gamma$  agonists and antagonists, and dual PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  agonists. Therefore, this information can be used to develop PPAR strategies aimed at reducing adipocyte differentiation and insulin resistance, frequently associated with type 2 diabetes and metabolic syndrome (Choi, Park, & Choi, 2014).

Milk-derived tripeptides IPP and VPP have been found to promote normal adipogenic differentiation like that provided by insulin (Fig. 2). These experimental data showed the upregulation of PPAR- $\gamma$  with subsequent intracellular lipid uptake and storage, and secretion of the protective lipid hormone adiponectin in the pre-adipocyte murine cell line, 3T3-L1 (Chakrabarti & Wu, 2015). Similarly, the latter peptides induce several atherogenic protective processes such as the activation of transcriptional regulators like c-Jun and C/EBP $\alpha$ , as well as the inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. Apart from these properties, these multifunctional tripeptides also act as insulin sensitizers preventing thus, insulin resistance in 3T3-F442A preadipocytes (Chakrabarti, Jahandideh, Davidge, & Wu, 2018). Likewise, VPP further enhanced the expression of the glucose transporter-4 in adipocytes and restored glucose uptake in TNF $\alpha$ -treated adipocytes (Chakrabarti et al., 2018). Unfortunately, very few experimental data are available regarding the role of BPs as novel insulin sensitizers (see Fig. 3).

Egg white protein hydrolysate (EWH) is an example of a multifaceted extract with broad physiological properties. Through the upregulation of PPAR- $\gamma$  and C/EBP- $\alpha$ , egg-derived BPs favor increased lipid accumulation and the release of adiponectin of pre-adipocytes (Jahandideh, Chakrabarti, Davidge, & Wu, 2017). Moreover, the EWH treatment encourages extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation, indicating insulin mimetic properties. The EWH-mediated effect further contributes to an attenuation of proinflammatory cytokines and COX-2 through down regulation of c-Jun phosphorylation in adipocytes. A similar relation between a peptide found in tuna, termed TP-D, and decreased adipocyte differentiation has been documented in 3T3-L1 cell lines. TP-D can diminish the activation of C/EBP in addition to Wnt-10b upregulation, thus inducing anti-inflammatory actions. Atherosclerotic lesions overexpress adiponectin, but treatment with TP-D has been shown to reduce total

adiponectin, which suggests an important regulatory role in the pathogenesis of CVD and metabolic syndrome (Kim, Kim, Choi, Lee, & Nam, 2015). Likely, the active compounds GEY and YGY from the silk peptide E5K6 have been seen to suppress the accumulation of intracellular fat droplets in 3T3-L1 cells, and *in vivo* evidence showed that YGY improved glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic mice in a dose-dependent manner (Han, Lee, Lee, Suh, & Park, 2016) (Fig. 2). Overall, given that food-derived BPs show anti-inflammatory, antilipotoxic and insulin sensitizing properties, they could be important preventing/therapeutic options in the treatment of CVD, particularly type 2 diabetes or metabolic syndrome.

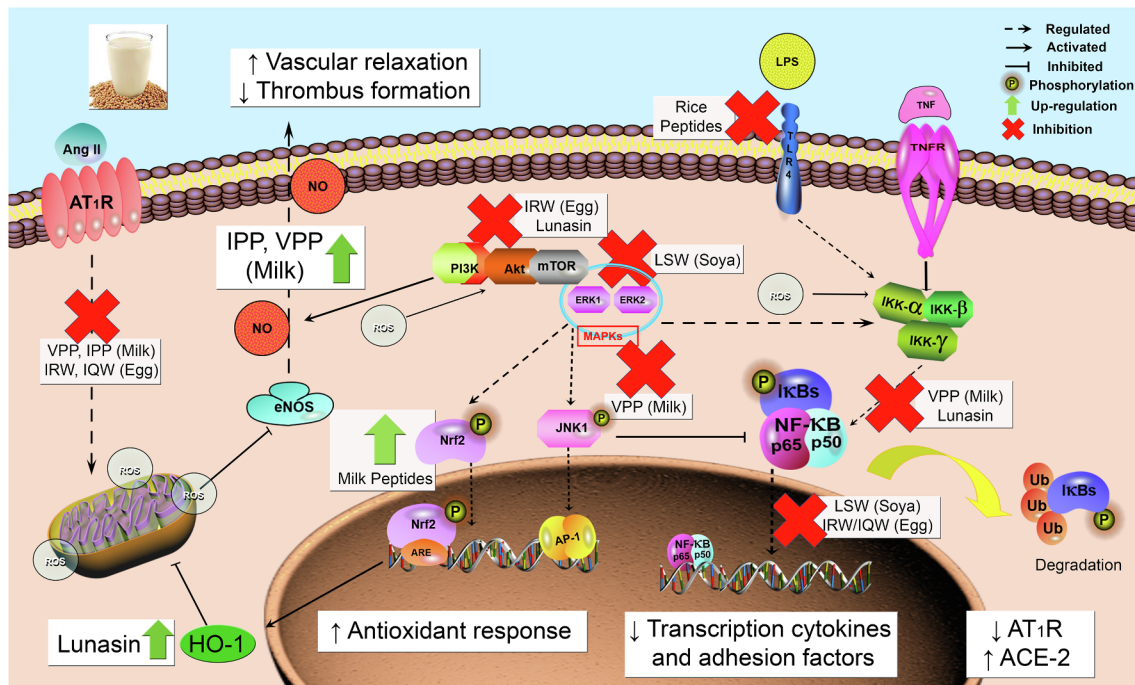
Clinical evidence supports the view that the administration of incretin drugs, such as glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonists and DPP-IV inhibitors, is effective in patients with CVD because they have anti-atherogenic effects with the potential to stabilize atherosclerotic plaques, together with an ability to exert glycemic control (Gallego-Colon, Wojakowski, & Francuz, 2018). Several food-derived BPs have been characterized for their anti-diabetic activity, acting as promising DPP-IV inhibitors and potentially contributing to glycemic control. Hydrolysates from *Palmaria palmata* (Harnedy, O'Keeffe, & FitzGerald, 2015), *Salmo salar* (Neves, Harnedy, O'Keeffe, & FitzGerald, 2017) and quinoa (Nongonierma, Le Maux, Dubrulle, Barre, & FitzGerald, 2015) exert anti-DPP-IV activity *in vitro*. In the last case, this effect was maintained after simulated gastrointestinal digestion, which is important for nutraceutical applications (Vilcacundo, Martinez-Villaluenga, & Hernandez-Ledesma, 2017). Another relevant experimental study with soy-derived peptides Lup1 and Soy1 showed that they inhibited DPP-IV activity in a dose-dependent manner in Caco-2 cells (C. Lammi et al., 2018). Besides, IADHFL, a novel DPP-IV inhibitory peptide identified from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*), may affect insulin secretion from INS to 1 pancreatic rats cells after glucose treatment through the regulation of genes associated with proinsulin secretion and diabetes (Zhang, Liu, Chen, & Luo, 2018). Although these studies suggest food-derived BPs may be potent regulators of beta cell activity, little is known about the signaling mechanisms.

## 6. In silico approaches

The current concept of intimate crosstalk between inflammation, endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors (hypertension, obesity, diabetes...) is corroborated by experimental data with multifunctional BPs that exert a plethora of anti-atherogenic effects. We have summarized their potential array of action, presumably linked to their flexible molecular behavior. However, only a handful of molecules relevant to CVD are targeted by these BPs. Deciphering how these small peptides recognize and interact with higher proteins is of great importance and a major target for the food and pharmaceutical industry.

Within this context, there has been increasing research interest in amassing structural information on BPs. The fast development of bioinformatics has led to a rapid accumulation of peptide data organized in numerous biological databases such as BioPep (Minkiewicz, Dziuba, Iwaniak, Dziuba, & Darewicz, 2008), StraPep (Wang et al., 2018), AHTPDB (Kumar et al., 2015), Hemolytik (Gautam et al., 2014), PeptideDB (Mooney, Haslam, Holton, Pollastri, & Shields, 2013), EROP (Zamyatnin, Borchikov, Vladimirov, & Voronina, 2006) etc. Bioinformatics approaches have been applied to analyze the potency of different anti-hypertensive, hypocholesterolemic or antidiabetic peptides, and a number of scientific publications on biological and structural data have demonstrated the successful integration of these tools (Nardo, Añón, & Parisi, 2018).

Further computation efforts have generated other strategies such as structure-based drug design. These exciting approaches combine the use of three-dimensional structural information of macromolecular targets with small molecules to test their binding affinity, which usually accompanies and confirms experimental data. Indeed, docking studies

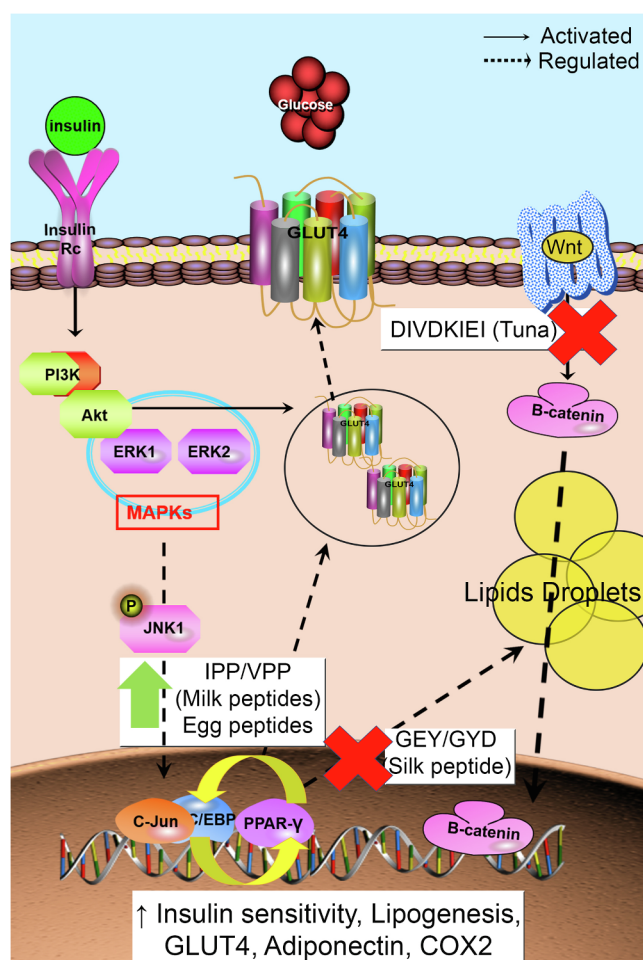


**Fig. 2.** Biological effects of food-derived biopeptides on inflammation and oxidative stress. These functions are based on diverse experimental published articles. NF- $\kappa$ B is a heterodimeric protein involved mainly in stress-induced inflammatory and immune responses. NF- $\kappa$ B is also essential in the endothelial response and inflammation through the induction of target genes. NF- $\kappa$ B is mainly composed of the p50/p65 heterodimer with specific binding activities to DNA. This heterodimer is sequestered in the cytoplasm of unstimulated cells via non-covalent interactions with their inhibitors (I $\kappa$ Bs). Signals that induce the NF- $\kappa$ B activity cause the phosphorylation of I $\kappa$ Bs, their dissociation (and subsequent degradation), thereby allowing the translocation of the activated NF- $\kappa$ B heterodimer and binding to the DNA (gene expression). The I $\kappa$ Bs are composed of three subunits: IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  and IKK $\gamma$  (NEMO), which have no catalytic effect but play a central regulatory role. The I $\kappa$ Bs can be activated by exposure to inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , ILs), lipopolysaccharide (LPS), oxidant free radicals etc. The signaling mechanisms mediating these effects include the phosphorylation of I $\kappa$ Bs as well as the ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinases 1 and 2) and p38 MAP (mitogen activated proteins) kinases. PI3K/Akt also enhanced the NF- $\kappa$ B activity, although this pathway is not essential for all stimuli. Several BPs inhibit TNF- $\alpha$  and LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B, suggesting that they may act as general inhibitors of certain pathways. It is important to note that inappropriate activation of NF- $\kappa$ B has been linked to inflammatory conditions such as atherosclerosis and thus BPs could favorably affect this chronic pathological condition. JNK1 (c-Jun terminal protein kinase 1) is less stimulated by inflammatory cytokines. Its phosphorylation is mediated by ERK1/2 and MAPKs, and it confers protection to cells under conditions of severe stress. Another important mediator of the resolution of inflammation is the transcription factor: the nuclear factor erythroid 2-like 2 (Nrf2). Following oxidative stress, Nrf2 induces the expression of cytoprotective genes (heme oxygenase-1; HO-1) through the antioxidant response element (ARE), which provokes an anti-inflammatory expression profile, and is crucial in atherosclerosis and hypertension. NO (Nitric Oxide) is a short-lived free radical gas and, importantly, is involved in cardiovascular homeostasis. Cellular cascades regulate eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) activation. Kinases phosphorylate eNOS and increase its activity. Angiotensin II (Ang II) activates the release of ROS (Reactive Oxygen Species) through its specific receptor, AT<sub>1</sub>R. In addition, the generated ROS stimulates MAPK phosphorylation, which blocks the Ang II-mediated JNK signaling pathway.

have shown their value to gain insight into the molecular action mechanisms of BPs (He, Aluko, & Ju, 2014). These strategies reveal the molecular interactions between BPs and their targets, and validate the biological *in vitro* activity, if any. They can also be a first step towards studying the biological activity or identifying potential ligands, or even for designing “*de novo*” peptides that bind to target structures. For instance, in the field of diabetes, Ibrahim et al. (2018) designed 4210 potential  $\alpha$ -glucosidase peptides and subjected them to *in silico* simulated gastrointestinal digestion using the BIOPEP database (Ibrahim, Bester, Neitz, & Gaspar, 2018). Among the 844 resistant peptides, SVPA and SEPA were found to have the lowest binding free energies for the  $\alpha$ -glucosidase ( $-8.7$  and  $-8.6$  Kcal/mol respectively). These two peptides could also bind  $\alpha$ -amylase ( $-6.5$  and  $-6.9$  Kcal/mol). Hydrogen bonds were critical for the binding of the two peptides to both enzymes. Moreover, molecular docking analyses were performed with other three peptides (PFP, YPL and YPG) and human DPP-IV to determine their *in silico* inhibitory potential. The three peptides displayed binding free energies lower than  $-7.0$  Kcal/mol being lower than for the diprotin A, a specific DPP-IV inhibitor ( $-6.0$  Kcal/mol). Among them, PFP interacted with the enzyme close to the active site but without hydrogen bond interactions while YPL interacted at a site distant from the active site with a single hydrogen bond interaction. Both, YPG and diprotin A, bound the human DPP-IV at the active site with 1 and 2 hydrogen bond

interactions, respectively. Among all the residues of the DPP-IV, W629 solely formed hydrogen bond with diprotin A. However, unlike the molecular docking analysis that identified PFP as the best candidate, the *in vitro* experiments revealed YPG to be the best DPP-IV inhibitory peptide. This supports that molecular dockings should be complemented at least with *in vitro* assays (Ibrahim, Serem, Bester, Neitz, & Gaspar, 2019). In a similar attempt, blind docking approaches were used to model peptide binding interactions with the regulatory subunit of NF- $\kappa$ B, NEMO. In this study, four dry-cured pork ham BPs that experimentally inhibit the NF- $\kappa$ B activity, could bind to the same region as a competitive peptide, the UBI peptide, specifically designed to interfere with NEMO (Martínez-Sánchez, Pérez-Sánchez, Antonio Gabaldón, Abellán-Alemán, & Montoro-García, 2019). The *in silico* docking calculations supported the potential binding of the four distinct BPs by forming several hydrogen and hydrophobic interactions, which could impair the IKK recruitment through competition with the Lys63-linked poly-ubiquitin. It is strongly recommended to choose the best docking pose according to the energy score but additional structural analysis based on analogue ligands is needed to assure reliable docking poses. In the last example, the predicted pose of the peptides was accordingly referred to an experimental confirmed ligand sharing the same binding site and residues.

In another study, a library peptide from pigeon pea by-products



**Fig. 3.** Biological effects of food-derived biopeptides on adipocyte differentiation and insulin resistance. These functions are based on diverse experimental published articles. C/EBP and PPAR- $\gamma$  are regulated by a number of different scaffold proteins, including JNK1, ERK1/2 and MAPKs proteins. PPAR- $\gamma$  activates the promoter of the gene encoding C/EBP $\alpha$  and *vice versa*, creating a positive-feedback loop. In addition, PPAR- $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  are the promoters of the genes encoding the key adipogenic transcription factors involved in insulin sensitivity, lipogenesis and lipolysis, including glucose transporter GLUT4, fatty-acid-binding protein, lipoprotein lipase (LPL) and the secreted factors adiponectin and leptin. Recent genome-wide binding analyses have revealed that PPAR- $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  cooperate at multiple binding sites in promoter regions, together regulating a wide range of genes expressed in developing and mature adipocytes. Wnt are secreted proteins that can inhibit preadipocyte differentiation through a  $\beta$ -catenin-dependent mechanism.

generated by gastric digestion was analyzed by docking simulation. Researchers found that three peptides could modulate the human 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGCR). These three peptides, NALEPDNRIESEGG, NALEPDNRIES and PFVKSEPIPETNNE, further showed to be competitive inhibitors of the enzyme and blocked the mevalonate pathway preventing then hypercholesterolemia (Kumar et al., 2019). Molecular docking also suggested the interaction of a peptide from *Porphyra yezoensis* with the anticoagulant factor FXIIa (Syed, Venkatraman, & Mehta, 2019). The docking revealed that the peptide docked at the catalytic site of the factor XIIa, by forming interactions with residues Gly 193 and Ser 195 of the binding pocket. Nonetheless, bioinformatics is at an early stage, and insufficient evidence exists at present to confirm the targets of such novel small molecules. Future studies with yet unknown protein structures will probably appear, which, combined with experimental data, should provide evidence-based mechanisms of action.

## 7. Conclusions

The field of BPs has two main but distinct goals: understanding the target mechanisms of actions and applying that knowledge to a translational clinical context. Notably, the vast majority of experiments have looked at their *in vitro* inhibitory capacity, rather than on their signaling action mechanisms. This is a major drawback for supporting claims of benefit to CV health as a result of consumption of BPs. However, current functional approaches have opened the door to the potential evaluation of food-derived BPs as therapeutic mediators. To explore the potential for translational use, much more research and multi-disciplinary knowledge (biology, medicine, bioinformatics and food technology) is necessary.

## Ethics statement

No experiments were carried out for this review.

## Declaration of Competing Interest

The author declare that there is no conflict of interest.

## Acknowledgements

SMS belongs to the “Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Murcia (UCAM)” and holds a FPU grant (FPU 15/03134) from the Ministry of Education (Spain). This project was supported by the Fundación Séneca, “Jóvenes Líderes en Investigación 20646/JLI/18”, en el marco del Programa Regional de Fomento de la Investigación (Plan de Actuación 2018).

## References

- Ahn, C. B., Cho, Y. S., & Je, J. Y. (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chem*, 168, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.112>.
- Aihara, K., Ishii, H., & Yoshida, M. (2009). Casein-derived tripeptide, Val-Pro-Pro (VPP), modulates monocyte adhesion to vascular endothelium. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 16(5), 594–603. <https://doi.org/10.5551/jat.729>.
- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., & Nakamura, Y. (2005). Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(4), 257–265. <https://doi.org/10.1080/07315724.2005.10719473>.
- Aihara, K., Osaka, M., & Yoshida, M. (2014). Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. *British Journal of Nutrition*, 112(4), 513–519. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001147>.
- Aluko, R. E. (2019). Food protein-derived renin-inhibitory peptides: In vitro and in vivo properties. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12648. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12648>.
- Balijepalli, A. S., Comstock, A. T., Wang, X., Jensen, G. C., Hershenson, M. B., Zacharek, M. A., ... Meyerhoff, M. E. (2015). Enhancement of inducible nitric oxide synthase activity by low molecular weight peptides derived from protamine: A potential therapy for chronic rhinosinusitis. *Molecular Pharmacology*, 12(7), 2396–2405. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00110>.
- Ballard, K. D., Bruno, R. S., Seip, R. L., Quann, E. E., Volk, B. M., Freidenreich, D. J., ... Volek, J. S. (2009). Acute ingestion of a novel whey-derived peptide improves vascular endothelial responses in healthy individuals: A randomized, placebo controlled trial. *Nutrition Journal*, 8, 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-34>.
- Ballard, K. D., Kupchak, B. R., Volk, B. M., Mah, E., Shkreta, A., Liptak, C., ... Volek, J. S. (2013). Acute effects of ingestion of a novel whey-derived extract on vascular endothelial function in overweight, middle-aged men and women. *British Journal of Nutrition*, 109(5), 882–893. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002061>.
- Bao, Z., & Chi, Y. (2016). In vitro and in vivo assessment of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of fermented soybean milk by lactobacillus casei strains. *Current Microbiology*, 73(2), 214–219. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1051-7>.
- Bautista-Exposito, S., Penas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2019). Pilot-scale produced fermented lentil protects against t-BHP-triggered oxidative stress by activation of Nrf2 dependent on SAPK/JNK phosphorylation. *Food Chemistry*, 274, 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.012>.
- Beltran-Barrientos, L. M., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Cordova, A. F., Astiazaran-Garcia, H., Esparza-Romero, J., & Vallejo-Cordoba, B. (2018). Mechanistic pathways underlying the antihypertensive effect of fermented milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*, 10(3), 15. <https://doi.org/10.3390/nut1003015>.

- 3390/nu10030262.
- Boschin, G., Scigliuolo, G. M., Resta, D., & Arnoldi, A. (2014). ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry*, 145, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.076>.
- Cadee, J. A., Chang, C. Y., Chen, C. W., Huang, C. N., Chen, S. L., & Wang, C. K. (2007). Bovine casein hydrolysate (C12 Peptide) reduces blood pressure in prehypertensive subjects. *American Journal of Hypertension*, 20(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2006.06.005>.
- Cam, A., & de Mejia, E. G. (2012). RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation in human macrophages through interaction with the alpha V beta 3 integrin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(10), 1569–1581. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200301>.
- Carrizzo, A., Conte, G. M., Sommella, E., Damato, A., Ambrosio, M., Sala, M., ... Vecchione, C. (2019). Novel potent decameric peptide of spirulina platensis reduces blood pressure levels through a PI3K/AKT/eNOS-dependent mechanism. *Hypertension*, 73(2), 449–457. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.118.11801>.
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Davidge, S. T., & Wu, J. P. (2018). Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) enhance insulin sensitivity and prevent insulin resistance in 3T3-F442A preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10179–10187. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02051>.
- Chakrabarti, S., Liao, W., Davidge, S. T., & Wu, J. P. (2017). Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) differentially modulate angiotensin II effects on vascular smooth muscle cells. *Journal of Functional Foods*, 30, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.022>.
- Chakrabarti, S., & Wu, J. P. (2015). Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) promote adipocyte differentiation and inhibit inflammation in 3T3-F442A cells. *Plos One*, 10(2), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117492>.
- Chee, M. E., Majumder, K., & Mine, Y. (2017). Intervention of dietary dipeptide gamma-l-glutamyl-L-valine ( $\gamma$ -EV) ameliorates inflammatory response in a mouse model of LPS-induced sepsis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(29), 5953–5960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02109>.
- Choi, S.-S., Park, J., & Choi, H. H. (2014). Revisiting PPAR gamma as a target for the treatment of metabolic disorders. *BMB Reports*, 47(11), 599–608. [https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47\(11\).pp.174](https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47(11).pp.174).
- Cicero, A. F. G., Fogacci, F., Veronesi, M., Grandi, E., Dinelli, G., Hrelia, S., & Borghi, C. (2018). Short-term hemodynamic effects of modern wheat products substitution in diet with, ancient wheat products: a cross-over, randomized clinical trial. *Nutrients*, 10(11), <https://doi.org/10.3390/nu10111666>.
- Contreras, F., de la Parte, M. A., Cabrera, J., Ospino, N., Israli, Z. H., & Velasco, M. (2003). Role of angiotensin II AT1 receptor blockers in the treatment of arterial hypertension. *American Journal of Therapeutics*, 10(6), 401–408. <https://doi.org/10.1097/00045391-200310000-00005>.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*, 9(4), <https://doi.org/10.3390/nu9040316>.
- Ding, L., Wang, L., Yu, Z., Zhang, T., & Liu, J. (2016). Digestion and absorption of an egg white ACE-inhibitory peptide in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(2), 111–116. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.1144722>.
- Engberink, M. F., Schouten, E. G., Kok, F. J., van Mierlo, L. A., Brouwer, I. A., & Geleijnse, J. M. (2008). Lactotripeptides show no effect on human blood pressure: Results from a double-blind randomized controlled trial. *Hypertension*, 51(2), 399–405. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098988>.
- Fekete, Á., Giromini, C., Chatzidiakiou, Y., Givens, D. I., & Lovegrove, J. A. (2016). Whey protein lowers blood pressure and improves endothelial function and lipid biomarkers in adults with prehypertension and mild hypertension: Results from the chronic Whey2Go randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104(6), 1534–1544. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.137919>.
- Fekete, A. A., Givens, D. I., & Lovegrove, J. A. (2013). The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function: A review of evidence from human intervention studies. *Nutrition Research Reviews*, 26(2), 177–190. <https://doi.org/10.1017/s0954422413000139>.
- Fernandez-Musoles, R., Castello-Ruiz, M., Arce, C., Manzanares, P., Dolores Ivorra, M., & Salom, J. B. (2014). Antihypertensive mechanism of lactoferrin-derived peptides: Angiotensin receptor blocking effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(1), 173–181. <https://doi.org/10.1021/jf404616f>.
- Fernández-Musoles, R., Salom, J. B., Martínez-Maqueda, D., López-Díez, J. J., Recio, I., & Manzanares, P. (2013). Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolysates: Inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes. *Food Chemistry*, 139(1–4), 994–1000. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.049>.
- Fitzgerald, C., Aluko, R. E., Hossain, M., Rai, D. K., & Hayes, M. (2014). Potential of a renin inhibitory peptide from the red seaweed *Palmaria palmata* as a functional food ingredient following confirmation and characterization of a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8352–8356. <https://doi.org/10.1021/jf500983n>.
- Fitzgerald, C., Mora-Soler, L., Gallagher, E., O'Connor, P., Prieto, J., Soler-Vila, A., & Hayes, M. (2012). Isolation and characterization of bioactive pro-peptides with in vitro renin inhibitory activities from the macroalgae *Palmaria palmata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(30), 7421–7427. <https://doi.org/10.1021/jf301361c>.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Anon, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878–884. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.065>.
- Fulton, D., Grattan, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., ... Sessa, W. C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399(6736), 597–601.
- Galleo-Colon, E., Wojakowski, W., & Francuz, T. (2018). Incretin drugs as modulators of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 278, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.011>.
- Galvez, A. F., & de Lumen, B. O. (1999). A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 17(5), 495–500.
- Gautam, A., Chaudhary, K., Singh, S., Joshi, A., Anand, P., Tuknait, A., ... Raghava, G. P. S. (2014). Hemolytik: A database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D444–D449. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1008>.
- Gianfranceschi, G. L., Gianfranceschi, G., Quassinti, L., & Bramucci, M. (2018). Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. *Journal of Functional Foods*, 47, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.034>.
- Girgih, A. T., Alashi, A., He, R., Malomo, S., & Aluko, R. E. (2014). Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Nutrition*, 53(5), 1237–1246. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0625-4>.
- Girgih, A. T., Alashi, A. M., He, R., Malomo, S. A., Raj, P., Netticadan, T., & Aluko, R. E. (2014). A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*, 6(12), 5652–5666. <https://doi.org/10.3390/nu6125652>.
- Gu, L., Ye, P., Li, H., Wang, Y., Xu, Y., Tian, Q., ... Tan, S. (2019). Lunasin attenuates oxidant-induced endothelial injury and inhibits atherosclerotic plaque progression in ApoE<sup>-/-</sup> mice by up-regulating heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/Nrf2/ARE pathway. *FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj201802251R. <https://doi.org/10.1096/fj.201802251R>.
- Hamblin, M., Chang, L., Fan, Y., Zhang, J., & Chen, Y. E. (2009). PPARs and the cardiovascular system. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(6), 1415–1452. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2280>.
- Han, B. K., Lee, H. J., Lee, H. S., Suh, H. J., & Park, Y. (2016). Hypoglycaemic effects of functional tri-peptides from silk in differentiated adipocytes and streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 116–121. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7067>.
- Harnedy, P. A., O'Keefe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2015). Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalgae *Palmaria palmata*. *Food Chemistry*, 172, 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.083>.
- He, R., Aluko, R. E., & Ju, X. R. (2014). Evaluating molecular mechanism of hypotensive peptides interactions with renin and angiotensin converting enzyme. *Plos One*, 9(3), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091051>.
- He, R., Malomo, S. A., Girgih, A. T., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Glycyl-histidinyl-serine (GHS), a novel rapeseed protein-derived peptide has blood pressure-lowering effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8396–8402. <https://doi.org/10.1021/jf400865m>.
- Hirota, T., Nonaka, A., Matsushita, A., Uchida, N., Ohki, K., Asakura, M., & Kitakaze, M. (2011). Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. *Heart and Vessels*, 26(5), 549–556. <https://doi.org/10.1007/s00380-010-0096-y>.
- Hsieh, C. C., Chou, M. J., & Wang, C. H. (2017). Lunasin attenuates obesity-related inflammation in RAW264.7 cells and 3T3-L1 adipocytes by inhibiting inflammatory cytokine production. *Plos One*, 12(2), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171969>.
- Ibrahim, M. A., Bester, M. J., Neitz, A. W. H., & Gaspar, A. R. M. (2018). Rational in silico design of novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides and in vitro evaluation of promising candidates. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.163>.
- Ibrahim, M. A., Serem, J. C., Bester, M. J., Neitz, A. W., & Gaspar, A. R. M. (2019). Multiple antidiabetic effects of three  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides, PFP, YPL and YPG: Dipeptidyl peptidase-IV inhibition, suppression of lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes and scavenging activity on methylglyoxal. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2018.10.152>.
- Iwaniak, A., Darewicz, M., & Minkiewicz, P. (2018). Peptides derived from foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 63–81. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12321>.
- Jahandideh, F., Chakrabarti, S., Davidge, S. T., & Wu, J. P. (2017). Egg white hydrolysate shows insulin mimetic and sensitizing effects in 3T3-F442A pre-adipocytes. *Plos One*, 12(10), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185653>.
- Jahandideh, F., Chakrabarti, S., Majumder, K., Li, Q. Y., Panahi, S., Morton, J. S., ... Wu, J. P. (2016). Egg white protein hydrolysate reduces blood pressure, improves vascular relaxation and modifies aortic angiotensin II receptors expression in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 27, 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.10.019>.
- Jahandideh, F., Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J. S., Panahi, S., Kaufman, S., ... Wu, J. P. (2014). Beneficial effects of simulated gastro-intestinal digests of fried egg and its fractions on blood pressure, plasma lipids and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*, 9(12), e115006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115006>.
- Jeong, H. J., Jeong, J. B., Hsieh, C. C., Hernandez-Ledesma, B., & de Lumen, B. (2010). Lunasin is prevalent in barley and is bioavailable and bioactive in vivo and in vitro studies. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 62(8), 1113–1119. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.515529>.
- Kim, Y. M., Kim, I. H., Choi, J. W., Lee, M. K., & Nam, T. J. (2015). The anti-obesity effects of a tuna peptide on 3T3-L1 adipocytes are mediated by the inhibition of the expression of lipogenic and adipogenic genes and by the activation of the Wnt/ $\beta$ -

- catenin signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(2), 327–334. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2231>.
- Kim, Y. M., Kim, E. Y., Kim, I. H., & Nam, T. J. (2015). Peptide derived from desalinated boiled tuna extract inhibits adipogenesis through the downregulation of C/EBP- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$  in 3T3-L1 adipocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(5), 1362–1368. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2127>.
- Kokubo, Y., Iso, H., Ishihara, J., Okada, K., Inoue, M., Tsugane, S., & Grp, J. S. (2007). Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations – The Japan Public Health Center-Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation*, 116(22), 2553–2562. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.106.683755>.
- Krotova, K., Hu, H., Xia, S. L., Belayev, L., Patel, J. M., Block, E. R., & Zharikov, S. (2006). Peptides modified by myristoylation activate eNOS in endothelial cells through Akt phosphorylation. *British Journal of Pharmacology*, 148(5), 732–740. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706777>.
- Kumar, R., Chaudhary, K., Sharma, M., Nagpal, G., Chauhan, J. S., Singh, S., ... Raghava, G. P. S. (2015). AHTPDB: A comprehensive platform for analysis and presentation of antihypertensive peptides. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D956–D962. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1141>.
- Kumar, V., Sharma, P., Bairagya, H. R., Sharma, S., Singh, T. P., & Tiku, P. K. (2019). Inhibition of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by peptides leading to cholesterol homeostasis through SREBP2 pathway in HepG2 cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1867(6), 604–615. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.04.002>.
- Kwak, J. H., Kim, M., Lee, E., Lee, S. H., Ahn, C. W., & Lee, J. H. (2013). Effects of black soy peptide supplementation on blood pressure and oxidative stress: A randomized controlled trial. *Hypertension Research*, 36(12), 1060–1066. <https://doi.org/10.1038/hr.2013.79>.
- Lafarga, T., Aluko, R. E., Rai, D. K., O'Connor, P., & Hayes, M. (2016). Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 81, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.007>.
- Lafarga, T., Gallagher, E., Aluko, R. E., Auty, M. A. E., & Hayes, M. (2016). Addition of an enzymatic hydrolysate of bovine globulins to bread and determination of hypotensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(8), 1741–1750.
- Lammi, C., Aiello, G., Boschini, G., & Arnoldi, A. (2019). Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 55, 10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.016> M1 - Generic.
- Lammi, C., Bollati, C., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y., & Arnoldi, A. (2018). Soybean- and lupin-derived peptides inhibit DPP-IV activity on in situ human intestinal caco-2 cells and ex vivo human serum. *Nutrients*, 10(8), <https://doi.org/10.3390/nu10081082>.
- Ledeber, H. C., & Parks, T. P. (1995). Transcriptional regulation of the intercellular-adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial-cells – Essential roles of a variant nf-kappa-b site and p65 homodimers. *Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 933–943.
- Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Tappia, P. S., Aukema, H. M., ... Aluko, R. E. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9854–9860. <https://doi.org/10.1021/jf201911p>.
- Liang, Q. F., Chalamaiah, M., Ren, X. F., Ma, H. L., & Wu, J. P. (2018). Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in caco-2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(5), 1114–1120. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04562>.
- Liang, Y., Lin, Q., Huang, P., Wang, Y., Li, J., Zhang, L., & Cao, J. (2018). Rice bioactive peptide binding with TLR4 to overcome H2O2-induced injury in human umbilical vein endothelial cells through NF-kappaB signaling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04036>.
- Lin, Q., Liao, W., Bai, J., Wu, W., & Wu, J. (2017). Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-Ser-Trp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells.
- Lucey, A. J., Heneghan, C., Manning, E., Kroon, P. A., & Kiely, M. E. (2018). Effect of an egg ovalbumin-derived protein hydrolysate on blood pressure and cardiovascular risk in adults with a mildly elevated blood pressure: A randomized placebo-controlled crossover trial. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1832-9>.
- Majumder, K., Chakrabarti, S., Davidge, S. T., & Wu, J. (2013). Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(9), 2120–2129. <https://doi.org/10.1021/jf3046076>.
- Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J. S., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S. T., & Wu, J. (2013). Egg-derived tri-peptide IRW exerts antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*, 8(11), e82829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082829>.
- Majumder, K., Liang, G., Chen, Y., Guan, L., Davidge, S. T., & Wu, J. (2015). Egg ovotransferrin-derived ACE inhibitory peptide IRW increases ACE2 but decreases proinflammatory genes expression in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(9), 1735–1744. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500050>.
- Maldonado-Cervantes, E., Jeong, H. J., Leon-Galvan, F., Barrera-Pacheco, A., De Leon-Rodriguez, A., de Mejia, E. G., ... de la Rosa, A. P. B. (2010). Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides*, 31(9), 1635–1642. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.014>.
- Malomo, S. A., Onuh, J. O., Girgih, A. T., & Aluko, R. E. (2015). Structural and anti-hypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Nutrients*, 7(9), 7616–7632. <https://doi.org/10.3390/nu7095358>.
- Marcone, S., Broughton, K., Simpson, P. J., Belton, O., & Fitzgerald, D. J. (2015). Milk-derived bioactive peptides inhibit human endothelial-monocyte interactions via PPAR- $\gamma$  dependent regulation of NF-kappa B. *Journal of Inflammation-London*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12950-014-0044-1>.
- Martin, M., & Deussen, A. (2019). Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1264–1283. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1402750>.
- Martínez-Sánchez, S. M., Pérez-Sánchez, H., Antonio Gabaldón, J., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2019). Multifunctional peptides from Spanish dry-cured pork ham: Endothelial responses and molecular modeling studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). doi:10.3390/ijms20174204.
- Martínez-Sánchez, S. M., Minguela, A., Prieto-Merino, D., Zafrilla-Rentero, M. P., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2017). The effect of regular intake of dry-cured ham rich in bioactive peptides on inflammation, platelet and monocyte activation markers in humans. *Nutrients*, 9(4), <https://doi.org/10.3390/nu9040321>.
- Mas-Capdevila, A., Iglesias-Carres, L., Arola-Arnal, A., Suarez, M., Mugerza, B., & Bravo, F. I. (2019). Long-term administration of protein hydrolysate from chicken feet induces antihypertensive effect and confers vasoprotective pattern in diet-induced hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 55, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.006>.
- Mas-Capdevila, A., Pons, Z., Aleixandre, A., Bravo, F. I., & Mugerza, B. (2018). Dose-related antihypertensive properties and the corresponding mechanisms of a chicken foot hydrolysate in hypertensive rats. *Nutrients*, 10(9), <https://doi.org/10.3390/nu10091295>.
- Miguel, M., Manso, M., Aleixandre, A., Alonso, M. J., Salacia, M., & Lopez-Fandino, R. (2007). Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and anti hypertensive properties of peptides derived from egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10615–10621. <https://doi.org/10.1021/jf072307o>.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of Aoac International*, 91(4), 965–980.
- Montoro-García, S., Zafrilla-Rentero, M. P., Celdran-de Haro, F., Pinero-de Armas, J. J., Toldra, F., Tejada-Portero, L., & Abellán-Aleman, J. (2017). Effects of dry-cured ham rich in bioactive peptides on cardiovascular health: A randomized controlled trial. *Journal of Functional Foods*, 38, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.012>.
- Mooney, C., Haslam, N. J., Holton, T. A., Pollastri, G., & Shields, D. C. (2013). PeptideLocator: Prediction of bioactive peptides in protein sequences. *Bioinformatics*, 29(9), 1120–1126. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt103>.
- Nardo, A. E., Añón, M. C., & Parisi, G. (2018). Large-scale mapping of bioactive peptides in structural and sequence space. *PLoS One*, 13(1), e0191063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191063>.
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., O'Keefe, M. B., Alashi, M. A., Aluko, R. E., & FitzGerald, R. J. (2017). Peptide identification in a salmon gelatin hydrolysate with antihypertensive, dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidant activities. *Food Research International*, 100, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.065>.
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., O'Keefe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 218, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.053>.
- Nongonierma, A. B., Le Mau, S., Dubrulle, C., Barre, C., & FitzGerald, R. J. (2015). Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *Journal of Cereal Science*, 65, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.004>.
- O'Keefe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2018). Whey protein hydrolysate induced modulation of endothelial cell gene expression Y1–2018 Y2 – January 2018. *Journal of Functional Foods*, 40, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.001> M1 - Generic.
- Palomo, I., Concha-Meyer, A., Lutz, M., Said, M., Saez, B., Vasquez, A., & Fuentes, E. (2019). Chemical characterization and antiplatelet potential of bioactive extract from tomato pomace (Byproduct of Tomato Paste). *Nutrients*, 11(2), <https://doi.org/10.3390/nu11020456>.
- Pan, H. L., She, X. X., Wu, H. L., Ma, J., Ren, D. F., & Lu, J. (2015). Long-term regulation of the local renin-angiotensin system in the myocardium of spontaneously hypertensive rats by feeding bioactive peptides derived from spirulina platensis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7765–7774. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02801>.
- Pepe, G., Sommella, E., Ventre, G., Scala, M. C., Adesso, S., Ostacolo, C., ... Campiglia, P. (2016). Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of “Stracchino” soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 26, 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.021>.
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Nardo, A. E., & Añón, M. C. (2017). In Vitro modulation of renin-angiotensin system enzymes by amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides: Alternative mechanisms different from ACE inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415–7423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02240>.
- Ren, G. X., Zhu, Y. Y., Shi, Z. X., & Li, J. H. (2017). Detection of lunasin in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and the in vitro evaluation of its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4110–4116. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8278>.
- Sanchez, D., Kassar, M., Contreras, M. D., Carron, R., Recio, I., Montero, M. J., & Sevilla, M. A. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacological*

- Research, 63(5), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.01.015>.
- Shobako, N., Ogawa, Y., Ishikado, A., Harada, K., Kobayashi, E., Suido, H., ... Ohinata, K. (2018). A novel antihypertensive peptide identified in thermolysin-digested rice bran. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(4), 7. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700732>.
- Syed, A. A., Venkatraman, K. L., & Mehta, A. (2019). An anticoagulant peptide from *Porphyra yezoensis* inhibits the activity of factor XIIa: In vitro and in silico analysis. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 89, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2019.03.019>.
- Toldra, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>.
- Tonolo, F., Moretto, L., Ferro, S., Folda, A., Scalcon, V., Sandre, M., ... Rigobello, M. P. (2019). Insight into antioxidant properties of milk-derived bioactive peptides in vitro and in a cellular model. *Journal of Peptide Science*, 25(5), <https://doi.org/10.1002/psc.3162>.
- Toshchakov, V., Piao, W. J., & Vogel, S. (2013). Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 190.
- Tsoupras, A., Lordan, R., Shiels, K., Saha, S. K., Nasopoulou, C., & Zabetakis, I. (2019). In vitro antithrombotic properties of salmon (*Salmo salar*) phospholipids in a novel food-grade extract. *Marine Drugs*, 17(1), <https://doi.org/10.3390/md17010062>.
- Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Doyen, A., Li, H., Bazinet, L., & Aluko, R. E. (2012). Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. *Food Chemistry*, 132(1), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.024>.
- Udenigwe, C. C., & Howard, A. (2013). Meat proteome as source of functional biopeptides. *Food Research International*, 54(1), 1021–1032. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.002>.
- Vercruyse, L., Van Camp, J., & Smaghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8106–8115. <https://doi.org/10.1021/jf0508908>.
- Vieira, E. F., Van Camp, J., Ferreira, I., & Grotaert, C. (2018). Protein hydrolysate from canned sardine and brewing by-products improves TNF-alpha-induced inflammation in an intestinal-endothelial co-culture cell model. *European Journal of Nutrition*, 57(6), 2275–2286. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1503-2>.
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV, alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>.
- Wang, J., Yin, T. L., Xiao, X. W., He, D., Xue, Z. D., Jiang, X. N., & Wang, Y. (2018). StraPep: A structure database of bioactive peptides. *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*. <https://doi.org/10.1093/database/bay038>.
- Wu, J. H., Sun, B. G., Luo, X. L., Zhao, M. M., Zheng, F. P., Sun, J. Y., ... Huang, M. Q. (2018). Cytoprotective effects of a tripeptide from Chinese Baijiu against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signaling. *RSC Advances*, 8(20), 10898–10906. <https://doi.org/10.1039/c8ra01162a>.
- Xu, F. R., Zhang, J., Wang, Z. G., Yao, Y. J., Atungulu, G. G., Ju, X. R., & Wang, L. F. (2018). Absorption and metabolism of peptide WDHHPQLR derived from rapeseed protein and inhibition of HUVEC apoptosis under oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20), 5178–5189. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01620>.
- Yahya, M. A., Alhaj, O. A., & Al-Khalifah, A. S. (2017). Antihypertensive effect of fermented skim camel (*Camelus dromedarius*) milk on spontaneously hypertensive rats. *Nutricion Hospitalaria*, 34(2), 416–421. <https://doi.org/10.20960/nh.1163>.
- Yamada, Y., Iwasaki, M., Usui, H., Ohinata, K., Marczak, E. D., Lipkowski, A. W., & Yoshikawa, M. (2010). Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK(1) receptor. *Peptides*, 31(5), 909–914. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.02.013>.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Chen, F., & Liu, J. (2014). Antihypertensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide RVPSL on spontaneously hypertensive rats by regulating gene expression of the renin-angiotensin system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 912–917. <https://doi.org/10.1021/jf405189y>.
- Zamyatin, A. A., Borchikov, A. S., Vladimirov, M. G., & Voronina, O. L. (2006). The EROP-Moscow oligopeptide database. *Nucleic Acids Research*, 34, D261–D266. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj008>.
- Zhang, C., Liu, H. G., Chen, S. W., & Luo, Y. K. (2018). Evaluating the effects of IADHFL on inhibiting DPP-IV activity and expression in Caco-2 cells and contributing to the amount of insulin released from INS-1 cells in vitro. *Food & Function*, 9(4), 2240–2250. <https://doi.org/10.1039/c7fo01950e>.
- Zheng, Y. J., Li, Y., Zhang, Y. L., Ruan, X. H., & Zhang, R. G. (2017). Purification, characterization, synthesis, in vitro ACE inhibition and in vivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 28, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.021>.
- Zheng, J. H., Wang, J. Y., Pan, H. L., Wu, H. L., Ren, D. F., & Lu, J. (2017). Effects of IQP, VEP and Spirulina platensis hydrolysates on the local kidney renin angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 8485–8492. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7602>.
- Zhu, Y. J., Li, H., & Wang, X. Z. (2017). Lunasin abrogates monocytes to endothelial cells. *Molecular Immunology*, 92, 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.09.004>.



**ARTÍCULO 2**

Martínez-Sánchez, S. M., Minguela, A., Prieto-Merino, D., Zafrilla-Rentero, M. P., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2017). **The Effect of Regular Intake of Dry-Cured Ham Rich in Bioactive Peptides on Inflammation, Platelet and Monocyte Activation Markers in Humans.** *Nutrients*, 9(4).





Article

# The Effect of Regular Intake of Dry-Cured Ham Rich in Bioactive Peptides on Inflammation, Platelet and Monocyte Activation Markers in Humans

Sara María Martínez-Sánchez <sup>1</sup>, Alfredo Minguela <sup>2</sup>, David Prieto-Merino <sup>3</sup>,  
María Pilar Zafrilla-Rentero <sup>1</sup>, José Abellán-Alemán <sup>1</sup> and Silvia Montoro-García <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Riesgo Cardiovascular y Departamento de Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos, s/n, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain; smsanchez@ucam.edu (S.M.M.-S.); mpzafrilla@ucam.edu (M.P.Z.-R.); jabellan@ucam.edu (J.A.-A.)

<sup>2</sup> Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca (IMIB-Arrixaca), Murcia, Spain; Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, 30120 Murcia, Spain; alfredo.minguela@carm.es

<sup>3</sup> Cátedra de Estadística “Big data”, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, 30007 Murcia, Spain; dprieto@ucam.edu

\* Correspondence: smontoro@ucam.edu; Tel.: +34-968-278638

Received: 29 December 2016; Accepted: 17 March 2017; Published: 23 March 2017

**Abstract:** *Background and aims:* Dietary studies have shown that active biopeptides provide protective health benefits, although the mediating pathways are somewhat uncertain. To throw light on this situation, we studied the effects of consuming Spanish dry-cured ham on platelet function, monocyte activation markers and the inflammatory status of healthy humans with pre-hypertension. *Methods:* Thirty-eight healthy volunteers with systolic blood pressure of >125 mmHg were enrolled in a two-arm crossover randomized controlled trial. Participants received 80 g/day dry-cured pork ham of >11 months proteolysis or 100 g/day cooked ham (control product) for 4 weeks followed by a 2-week washout before “crossing over” to the other treatment for 4 more weeks. Soluble markers and cytokines were analyzed by ELISA. Platelet function was assessed by measuring P-selectin expression and PAC-1 binding after ADP (adenosine diphosphate) stimulation using whole blood flow cytometry. Monocyte markers of the pathological status (adhesion, inflammatory and scavenging receptors) were also measured by flow cytometry in the three monocyte subsets after the interventional period. *Results:* The mean differences between dry-cured ham and cooked ham followed by a time period adjustment for plasmatic P-selectin and interleukin 6 proteins slightly failed ( $p = 0.062$  and  $p = 0.049$ , respectively), notably increased for MCP-1 levels ( $p = 0.023$ ) while VCAM-1 was not affected. Platelet function also decreased after ADP stimulation. The expression of adhesion and scavenging markers (ICAM1R, CXCR4 and TLR4) in the three subsets of monocytes was significantly higher (all  $p < 0.05$ ). *Conclusions:* The regular consumption of biopeptides contained in the dry-cured ham but absent in cooked ham impaired platelet and monocyte activation and the levels of plasmatic P-selectin, MCP-1 and interleukin 6 in healthy subjects. This study strongly suggests the existence of a mechanism that links dietary biopeptides and beneficial health effects.

**Keywords:** dry-cured ham; active biopeptides; molecular markers; inflammation; platelet function; monocyte

## 1. Introduction

The food industry sector is well aware of the well-documented positive effects of functional foods or nutraceuticals on diverse physiological functions, apart from their nutritional properties [1]. Improvements in diet and lifestyle to reduce or prevent specific pathological processes such as

cardiovascular disease (CVD) have become a goal amongst the general public. Within the last decade, significant improvements in biomarkers related to CV health following the consumption of nutraceuticals—particularly biopeptides—have been described in animal models [2–4].

Cardiovascular disease is the leading cause of human mortality and complications worldwide. Hypertension is a well-known clinical risk factor for CVD. Cross-talk between platelets and monocytes is regarded as a crucial pathophysiological mechanism linking thrombosis and inflammation and is believed to mediate, at least in part, the pro-inflammatory action of activated platelets [5]. Experimental data have found that activated platelets enhance cytokine production by monocytes [6] as well as their receptor expression (ICAM-1R and VCAM-1R) and increase their adhesion to the blood vessel wall [7]. However, the importance of monocytes/platelet phenotypical changes in human inflammatory pathophysiology and hypertension remains unclear. Besides, there is limited data on the nutraceuticals effects on inflammatory cells in humans. On the other hand, nutraceuticals such as biopeptides, sterols or polyphenols have been shown to display activities that are beneficial to CV health in humans in terms of blood pressure (BP), lipid metabolism and absorption, oxidative stress, inflammation and haemostasis [8–11]. The potential health benefits of food-derived bioactive peptides have been extensively reviewed [12,13].

Bioactive peptides are short sequences of 2–20 amino acid long residues that are absorbed through the intestine and distributed through the circulation to produce a local or systemic physiological effect. These peptides are released during food manufacturing, for instance important biochemical changes occur with the curing of meat, including intense proteolysis by muscle peptidases [14,15]. Spanish dry-cured ham particularly, provides a valuable source of active biopeptides that have been tested *in vitro* and in animal models of hypertension [16,17]. Besides, the results of a number of studies suggest that dry-cured hams may be healthy and could be included as a regular component of the diet [18]. However, any assessment of biological activity has almost exclusively been limited to assays to detect the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ACE) [17] and few human or mechanistic studies have been designed to explore the wider range of activities of such biopeptides in the CV system. Therefore, the current study aims to establish cause–effect relationships between the consumption of dry-cured ham containing bioactive peptides and any physiological effects observed in individuals with pre-hypertension, looking for cellular changes related to the CV pathophysiology other than just clinical parameters. In this study, we focus on changes in monocytes and platelets as they are involved in inflammatory responses and the regulation of the thrombogenic status.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Ethics Statement

The clinical study was registered in the Clinical Trials Database (ID: NCT02585089), performed in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Ethics Committee of the Catholic University of Murcia (UCAM, April 2015). All enrolled volunteers provided written informed consent.

### 2.2. Study Design and Subjects

In the context of the 7FP EU Beneficial Effects of Bioactive Compounds in Humans (BACCHUS) project, a two-arm cross-over randomized control trial was assessed at the UCAM, between September 2015 and January 2016. Participants received 80 g/day dry-cured pork ham of >11 months proteolysis (interventional product) and 100 g/day cooked ham (control product) each for 4 weeks. After a two-week washout, the groups exchanged roles for another 4 weeks. The study arms were similar for age, gender, ethnicity, body mass index and BP, which allowed comparisons to be made between them. Thirty-eight apparently healthy Caucasian men and women from the University staff, aged 40–55 years, in good general health and with pre-hypertension were recruited (systolic and diastolic BPs above 125 and 80 mmHg, respectively).

Exclusion criteria were smokers, *Diabetes mellitus*, diagnosed and treated hypertension, history of cardiovascular events (stroke, myocardial infarction or peripheral vascular disease), cancer and inflammatory diseases. Volunteers whose medications included anti-hypertensives, antiaggregants, anticoagulants, antidepressants, anti-cholinergic or anti-spasmodic agents, the regular use of medication affecting intestinal motility, vasodilators, lipid lowering therapies or fish oil supplements (all other supplements were assessed on a case by case basis) were also excluded.

A list of restricted foods was given at the beginning of the study in order to avoid the excessive consumption of salt and other cured meat products. Volunteers were asked not to change their dietary patterns and lifestyle during the study. The individuals did not know about the purpose of the study or which of the hams was supposed to be the interventional product. The volunteers were enrolled by simple randomization by only one investigator and the randomization sequence was concealed until the end of the statistical analysis.

### 2.3. Meat Products

Spanish dry-cured ham with a controlled salt content after >11 months dry-curing process/proteolysis was the interventional product and cooked ham was the control product.

The Spanish dry-cured ham after an >11 month dry-curing process contained 25% less salt than similar products on the market (4.38% vs. approx. 5.5%). As regard the cooked ham, it contained 2.61% salt, which was lower than the 3.6 g salt per 80 g intake of dry-cured ham. In order to counteract the humidity and salt, a higher amount of cooked ham (control) was given (100 g/day). Hams were manufactured and supplied by the local meat Company *ElPozo Alimentación* (Alhama de Murcia, Spain) especially for the present clinical study in daily vacuum bags and labelled with safety information (best by date, nutritional composition and storage information). The presence/absence of active biopeptides in the meat products were tested and sequenced using one-dimensional reversed-phase liquid chromatography combined with nano-liquid chromatography and an electrospray ionization source coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer at the *Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* (CSIC, Valencia) [19] (Table 1).

**Table 1.** Analysis of Active Biopeptides in the Meat Products.

Active Biopeptides	Dry-Cured Ham	Cooked Ham
KAAAAP	Identified	N.D.
AAPLAP	Identified	N.D.
KPVAAP	Identified	N.D.
VPPAK	Identified	N.D.
KPGRP	Identified	N.D.
IAGRP	N.D.	N.D.
PAAPPK	Identified	N.D.
TGLKP	N.D.	N.D.
AAATP	Identified	N.D.
KAAAATP	N.D.	N.D.

N.D.: not detected.

### 2.4. Blood Sampling and Biochemical Determinations

For laboratory analysis, 8 h fasting peripheral venous blood samples were collected at four time-points from all participants before and after each period (interventional/control product). Venous blood was collected in EDTA and citrate (0.15%) Vacutainer<sup>®</sup> tubes. Blood was centrifuged at 3500 rpm for 15 min at room temperature to obtain platelet-poor plasma. Plasma aliquots were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  to allow ELISA batch analysis.

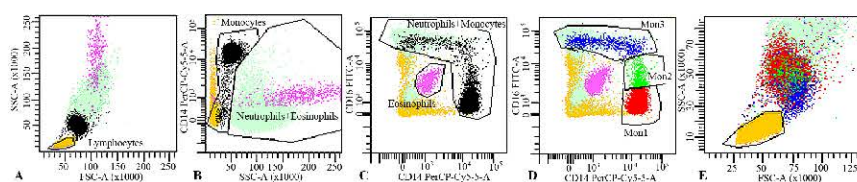
### 2.5. Flow Cytometry

(a) In vitro assessment of platelet activation:

Freshly collected citrated blood (450  $\mu$ L) was incubated with 0.02 mmol/L ADP (adenosine diphosphate) for 2 min. Surface expression of membrane constitutive CD42a (GP IX) and platelet activation markers (P-selectin and PAC-1 binding) were then assessed as already published [20]. After incubation, blood (5  $\mu$ L) was labelled with 0.05  $\mu$ g anti-CD42a-PerCP (clone Beb1), anti-CD62P-APC (clone AK-4), PAC-1-FITC (clone PAC-1) (which recognizes the conformationally activated GPII $\beta$ /III $\alpha$ ) (all from BD Biosciences, Oxford, UK) for 15 min, diluted with 1 mL filtered PBS and then analyzed in a FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Oxford, UK). Twenty thousand platelets were counted in each sample run.

(b) In vitro assessment of monocyte activation:

Mouse anti-human monoclonal fluorochrome-conjugated antibodies against CD16-Alexa Fluor 488 (clone DJ130c, AbDSerotec, Oxford, UK), CD14-PerCP (clone MP $\phi$ 9, BD Biosciences, Oxford, UK) were mixed in different tubes with 100  $\mu$ L freshly collected EDTA blood. The above antibodies were mixed with PE-conjugated antibodies against Toll-like receptor-4 (TLR4), intercellular cell adhesion molecule-1 receptor (ICAM-1R) and CXCR4 (all from R&D Systems); APC-conjugated antibodies against interleukin-6 receptor (IL6R), vascular cell adhesion molecule-1 receptor (VCAM-1R) and CD163 (all from R&D Systems). After incubation for 15 min, red blood cells were lysed by 2 mL of lysing solution<sup>®</sup> (BD Biosciences) for 15 min, diluted with PBS and immediately analyzed by flow cytometry. Expression of the surface markers was quantified as mean fluorescence intensity (MFI) on different monocyte subsets (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (Mon1), CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (Mon2), and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (Mon3)). The gating strategy excluded neutrophils, eosinophils, lymphocytes and other granulocytes from the analysis (Figure 1). The method was assessed in a BD FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, Oxford, UK) as previously described [21], acquiring 120.000 monocytes per sample.



**Figure 1.** Gating strategy to identify the three peripheral blood monocyte subsets (Mon1, Mon2 and Mon3). (A) FSC/SSC-dotplot was set to identify leukocytes and select lymphocytes; (B) Leukocytes were plotted in a SSC/CD14-dotplot to select high-SSC cells as Neutrophils+Eosinophils and intermedia-SSC and CD14<sup>++</sup> as Monocytes; (C) Leukocytes were also plotted in a CD14/CD16-dotplot to select Eosinophils (auto-florescent cells) and Monocyte+Neutrophils, clearly separated from the rest of the blood cell subsets. Logical combination of these gates allowed discrimination between Lymphocytes, Monocytes, Neutrophils and Esosinophils; (D) To identify the three monocyte subsets, a CD14/CD16 dotplot was used: Mon1 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, red), Mon2 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>, green) and Mon3 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, blue); (E) Zoom area of mononuclear cells showing the three monocytes subsets clearly differentiated from lymphocytes and neutrophils.

## 2.6. Plasma Markers

Plasma samples (citrated and EDTA) were used to quantify the levels of soluble platelet and monocyte adhesion markers (P-selectin and VCAM-1, respectively), high sensitive interleukin-6 (hs-IL-6) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

All measurements were performed using recognized high quality human Affymetrix kits (eBioscience, Carlsbad, CA 92008, USA): VCAM-1 antigen (Cat. No. BMS232), hs-IL6 antigen (Cat. No. BMS213HS), P-selectin antigen (Cat. No. BMS219/4) and MCP-1 antigen (Cat. No. 88739922), according to the manufacturer's recommendations. The lower limits of detection of hs-IL-6, P-selectin, VCAM-1 and MCP-1 were 0.03 pg/mL, 0.2 ng/mL, 0.6 ng/mL and 7 pg/mL, respectively.

### 2.7. Statistical Analyses

Categorical variables are expressed as frequency (percentage) of volunteers. Continuous markers are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Extremely skewed variables were Log transformed. For each continuous marker, a regression of values after meat product consumption adjusted for values before consumption was performed. By centering both variables on the mean before consumption, the intercept of the model estimates the average change after consumption. The relative mean change (mean change/mean before  $-1$ ) was calculated in order to plot variables with different scales on the same graph.

To estimate the differences of average changes between control and intervention groups, a binary variable (control = 0, intervention = 1) was included in the model. Another binary variable was included to adjust for the potential period effect. Furthermore, a random effect term by individual was used to account for the repeated measures. We checked the model assumptions on the residuals with plots and normality tests. R 3.3.1 software was used for the statistical analyses (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

### 3. Results

Clinical characteristics, including demography and BP, of the study population, are shown in Table 2. Thirty-eight subjects ( $44.3 \pm 5.3$  years old; 82% males) were included in the study. Readings of systolic BP were above 125 mmHg, considered as normal-high blood pressure or pre-hypertension.

**Table 2.** Clinical Characteristics of Healthy Volunteers with Normal-High Hypertension.

<i>n</i> = 38	Volunteers
Age	44.3 $\pm$ 5.3
Gender (male)	82%
BMI, (kg/m <sup>2</sup> )	27.02 $\pm$ 3.9
Fat content, %	25.08 $\pm$ 7.3
Systolic BP, mmHg	137.4 $\pm$ 10.6
Diastolic BP, mmHg	80.0 $\pm$ 5.8

BMI: Body Mass Index; BP: Blood Pressure.

The baseline parameters of the participants were compared to data obtained after 4 weeks of consuming dry-cured pork ham and cooked ham (Table 3). Body mass index and fat content were not affected by the interventional product nor by the control product ( $p > 0.05$ , data not shown).

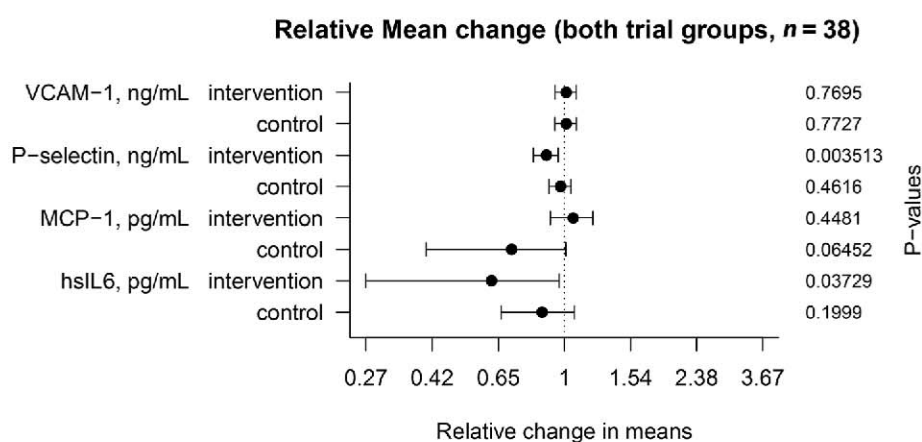
**Table 3.** Plasmatic Parameters with Volunteers in Both Trial Arms (Mean Difference After (1) Dry-Cured Ham Intake, (2) Cooked Ham and (1–2) Difference).

<i>n</i> = 38	Period of Intervention	Mean Difference	Confidence Interval		<i>p</i> Value
			Low 95%	Upp 95%	
<i>Plasmatic markers, ELISA</i>					
P-selectin, ng/mL	(1) Dry-cured	−5.00	−8.19	−1.80	0.003513
	(2) Control	−1.31	−4.60	2.10	0.461629
	(1)–(2)	−3.69	−7.36	0.02	0.062522
VCAM-1, ng/mL	(1) Dry-cured	3.23	−17.97	24.42	0.769504
	(2) Control	3.41	−19.33	26.15	0.772709
	(1)–(2)	−0.19	−25.61	25.24	0.988745
MCP-1, pg/mL	(1) Dry-cured	5.45	−8.35	19.25	0.448144
	(2) Control	−14.39	−29.20	0.42	0.064524
	(1)–(2)	19.84	3.28	36.40	0.023489
hs-IL6, pg/mL	(1) Dry-cured	−0.60	−1.15	−0.05	0.037294
	(2) Control	−0.39	−0.96	0.19	0.199947
	(1)–(2)	−0.52	−0.77	−0.04	0.049448

BMI: Body Mass Index; VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1; MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1; hs-IL6: high-sensitivity Interleukin 6.

### 3.1. Plasmatic Markers

A comparison between plasma biochemical markers before and after dry-cured ham intake is shown in Table 3 and Figure 2. After 4 weeks of regular dry-cured ham intake and adjusting for a potential period effect, soluble P-selectin (sCD62P) concentration was markedly lower than in baseline conditions ( $p = 0.0035$ ). The mean difference of soluble P-selectin levels was still slightly decreased between interventional and control periods ( $p = 0.0625$ ). Besides, MCP-1 levels were found unaltered after the interventional period, but when the cooked ham intake was included, a significant increase in MCP-1 levels was observed ( $p = 0.0234$ ). Decreased concentrations of the soluble inflammatory mediator (IL6) were measured in plasma after the interventional period ( $p = 0.037$ ). Such an effect was still shown after adjusting with the control cooked ham period ( $p = 0.049$ ). In contrast, there were no significant differences in plasma concentrations of soluble VCAM-1 after dry-cured ham nor cooked ham intake.



**Figure 2.** Mean change relative to baseline time in soluble plasmatic marker levels in the interventional and control groups. The values were compared after participants had ingested 80 g/day of dry-cured ham or 100 g/day of cooked ham ( $n = 38$ ) for 4 weeks (+95% confidence interval).

### 3.2. Effect on Platelet Activation

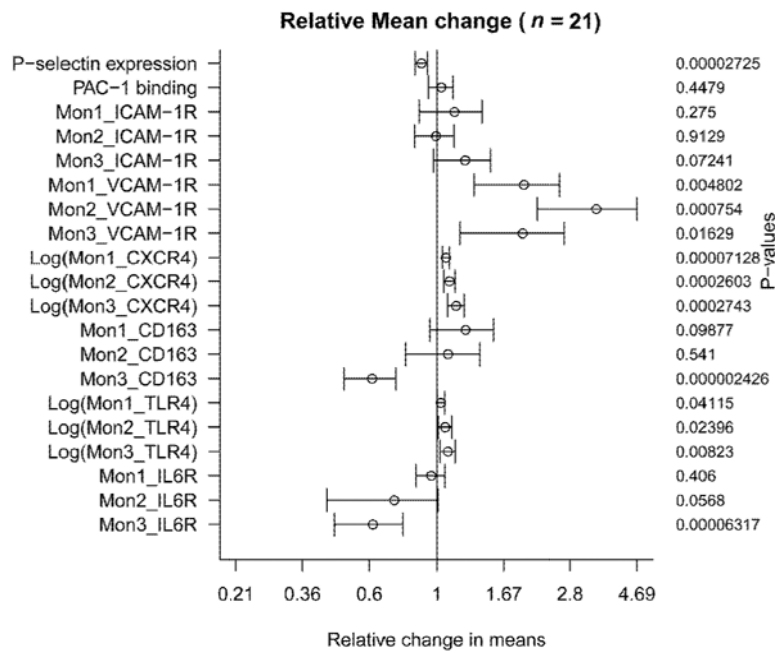
The regular consumption of bioactive peptides resulted in a significant decrease in P-selectin (CD62P) expression by 11.17% (55.24 points) in platelets stimulated with ADP ( $p = 0.0000272$ ) (Table 4 and Figure 3). However, changes in the glycoprotein IIb/III $\alpha$  expression (PAC-1 monoclonal antibody binding) did not change after the 30 days' intervention ( $p = 0.447$ ).

### 3.3. Effect on Monocytes Markers

There was no difference in the expression of surface ICAM-1 receptor between the two time points in the different subtypes of monocytes. Similar data were also obtained for CD163 expression (Table 4). However, expression of CD163 in Mon3 decreased significantly by 39% ( $p = 0.0000024$ ) (Figure 3).

Besides, the expression levels of VCAM-1 receptor and CXCR4 were significantly higher for all three subsets compared to baseline conditions (all  $p < 0.02$ ). Dry-cured ham intake produced an important increase of 343% in VCAM-1R levels in Mon 2 ( $p = 0.00075$ ) (Figure 3). Expression levels of TLR4 in the three monocytes subsets were also strongly affected after the intervention (all  $p < 0.05$ ) (Figure 3). Similarly, IL6R expression was down-regulated by 39% in Mon3 ( $p = 0.0000632$ ) but these differences did not reach statistical significance for the other two monocyte subsets, Mon1 and Mon2 (Table 4), although a trend was found for Mon2 ( $p = 0.0568$ ).





**Figure 3.** Mean change relative to baseline time in platelet and monocyte activation markers. The values were compared after participants had ingested 80 g/day of dry-cured ham (n = 21) for 4 weeks (+95% confidence interval).

**Table 4.** Cellular Parameters of the Volunteers (Baseline and Mean Difference after Consuming Dry-Cured Ham for 4 Weeks).

n = 21	Baseline (before Dry-Cured Ham)	Mean Difference	Confidence Interval		p Value
			Low 95%	Upp 95%	
<i>Platelet activation markers</i>					
P-selectin expression, MFI	492.67	-55.24	-76.32	-34.16	0.0000272
PAC-1 binding, MFI	426.12	15.18	-26.33	56.68	0.447
<i>Monocyte activation markers (n = 21)</i>					
Mon1_ICAM-1R, MFI	3799.22	552.94	-484.15	1590.03	0.275
Mon2_ICAM-1R, MFI	6325.33	-49.33	-989.93	891.26	0.912
Mon3_ICAM-1R, MFI	4579.78	1114.66	-113.87	2343.20	0.072
Mon1_VCAM-1R, MFI	672.70	643.25	222.89	1063.61	0.00480
Mon2_VCAM-1R, MFI	1243.75	3022.30	1453.88	4590.72	0.00075
Mon3_VCAM-1R, MFI	2048.55	1917.80	397.35	3438.25	0.01629
Mon1_CXCR4, MFI	1152.70	1019.90	545.43	1494.38	0.0000713 *
Mon2_CXCR4, MFI	2415.00	4244.17	1313.45	7174.89	0.0002603 *
Mon3_CXCR4, MFI	2215.55	9601.76	1498.90	17,704.61	0.0002743 *
Mon1_CD163, MFI	1376.20	340.70	-70.88	752.28	0.098
Mon2_CD163, MFI	1838.90	164.94	-392.83	722.70	0.540
Mon3_CD163, MFI	2606.90	-1016.48	-1325.88	-707.08	0.000024
Mon1_TLR4, MFI	1050.57	261.05	-44.91	567.00	0.0411524 *
Mon2_TLR4, MFI	1915.72	2061.10	52.87	4069.33	0.0239622 *
Mon3_TLR4, MFI	1611.00	3266.19	468.86	6063.52	0.0082297 *
Mon1_IL6R, MFI	576.45	-24.60	-85.34	36.14	0.406
Mon2_IL6R, MFI	1186.40	-332.05	-674.78	10.68	0.0568
Mon3_IL6R, MFI	3820.70	-1475.70	-2074.37	-877.03	0.0000632

ICAM-1R: Intercellular Adhesion Molecule-1 Receptor; VCAM-1R: Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Receptor; TLR4: Toll-Like Receptor 4; IL6R: Interleukin 6 Receptor; MFI: Mean Fluorescence Intensity. \* Data were log transformed before analysis.

#### 4. Discussion

Dietary bioactives are compounds of food origin that safely deliver health benefits, although their mechanisms of action are usually poorly understood. Generally, meat and meat products are not ordinarily associated with health benefits [22]. However, *in vitro* tested health-promoting bioactive peptides are naturally generated from meat proteins during curing or fermentation. Moreover, it is a challenge for the food industry to identify the functionality of bioactives, in order to make products healthier and, possibly to claim that they may be regarded as functional foods. Therefore, the aim of this investigation was to evaluate the effect of the regular consumption of dry-cured pork ham containing characterized active biopeptides among other possible bioactives on platelet activation, monocytes phenotype and plasma markers of inflammation and activation.

The presence of naturally active biopeptides in the meat product was confirmed by a peptidomic strategy using mass spectrometry techniques [19]. Cooked ham was chosen as the control product because active biopeptides are not released during its manufacture, as confirmed here. To our knowledge, no previous study has associated the regular consumption of meat peptides with *in vivo* cellular changes, even though several *in vitro* studies suggested possible action mechanisms [17,23,24].

Impaired platelet function results in a higher degree of degranulation and translocation of P-selectin (CD62P) to the outer plasmatic membrane, both of which have been related to CV pathological conditions such as hypertension, diabetes, myocardial infarction, heart failure and stroke [25]. Accordingly, P-selectin has also been proposed as a novel therapeutic target in vascular disease [26]. One of the more significant findings to emerge from this study is that the intake of dry-cured ham enriched in active biopeptides is related to a decrease in the platelet expression of this activation marker, P-selectin. Moreover, the findings also point to a reduction of soluble P-selectin after the interventional period, even adjusting with the cooked ham intake. This data also supports a role for active biopeptides in modulating *in vivo* platelet function. The ability to inhibit platelet function has previously been confirmed *ex vivo* in the presence of other vegetable bioactives [27]. Nonetheless, it is unclear why this occurs or what role this response might play in pathological conditions, other than in healthy individuals with normal-high non-treated hypertension. Thereby, the current study opens up an interesting avenue for further research into the mechanism(s) of these dietary peptides in platelet phenotype and function.

The roles of monocytes in CVD are diverse, including their involvement in inflammatory responses and the regulation of the thrombogenic status. In experimental hypertension, monocytes increase their adhesion to the endothelium integrins (ICAM-1, VCAM-1) through their receptors (ICAM-1R and VCAM-1R). Moreover, monocytes have also been implicated in physiologically beneficial processes related to the scavenging of pathological material, angiogenesis and repair through stromal derived factor-1 (SDF1) binding to CXCR4. The diversity of monocytes functions can be partly attributed to the existence of different monocytes subsets (Mon1, Mon2 and Mon3) that can be distinguished according to specific phenotypic and functional properties [28]. In this line, the second major finding of the current study was that the consumption of dry-cured ham impaired the basal expression of several markers in circulating monocytes. For instance, the expression of the integrin  $\alpha$ 4 receptor (VCAM-1R) and CXCR4 (SDF1 receptor) increased significantly in the three subtypes of monocytes. Recent investigations found that VCAM-1R and CXCR4 in monocytes were higher in healthy volunteers compared to individuals with coronary artery disease (CAD) [21], confirming an improvement of the physiological status after the long-term consumption of dry-cured ham. CD163 and TLR4 are proteins involved in immunity, scavenging and the recognition of antigens [29]. The TLR4 expression also increased after the intervention in all the three monocyte subsets. The expression of CD163 was higher after the intervention in the minority Mon3. Concerning the expression of IL6R, levels remained unaltered after the intervention in the main subset Mon1 but it significantly decreased in Mon3 and a trend was shown for Mon2, once more in agreement with previous results with healthy volunteers towards CAD patients [21]. Whether IL6R levels decrease as a consequence of lower transcription cannot be formally demonstrated here. Nonetheless, greater IL6 binding to IL6R might not be the case

because the plasmatic levels of IL6 were substantially lower after the regular consumption of cured meat adjusted with a potential period effect. Neither can the effects be attributed to observer bias or lifestyle confounders. In relation to that, the current analysis also identified increased plasmatic MCP-1 levels, which regulate the migration of monocytes, between the intervention and control groups.

Taken together, those observations seem to suggest intake-dependent changes in monocytes and an improvement in the inflammatory status.

### Limitations

Differences in the molecular parameters were only shown after the interventional period of time. However, plasmatic markers were analyzed after the intake of both meat products, allowing a valid estimate of the dry-cured ham intake effect. Although irrelevant from the clinical point of view, it is important to mention that volunteers took lower salt amounts during cooked ham intake (1 g/day less), compared to the interventional period. The effect of dry-cured ham consumption on platelet and monocytes phenotype cannot be directly attributed to active biopeptides; nonetheless, it is important to underline the broad range of sequenced peptides contained in the dry-cured ham and absent in the control product. The ideal quantity of biopeptides from any origin that would provide beneficial effects in humans has not been determined; neither has the amount of biopeptides contained in the ham. Nevertheless, the study was designed to involve the highest feasible daily intake of dry-cured meat.

## 5. Conclusions

As the era of molecular nutrition unfolds, a greater understanding of how these foods and their components influence cellular mechanisms will surely arise. Current molecular approaches, such as flow cytometry, can aid the scientific community in gaining a deeper understanding related to the effects of active compounds over a variety of cell types, tissues and pathological conditions. Such information will be critical in the development of healthier products for reducing the CV burden. In particular, the present results lead to the conclusion that active biopeptides have potential therapeutic effects in the vascular system, and help identify future molecular targets for the prevention of CV risk factors in healthy individuals. In addition, whether these new categories of active compounds affect platelet function, monocytes phenotype and inflammation requires further well-controlled interventional studies. It is therefore envisaged that future in vitro experiments should try to confirm the association of these factors and that in vivo studies will be carried out in patients with high CV risk.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to *El Pozo Alimentación* (Murcia, Spain) for the ham product. The IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC Valencia) characterized the meat products. We also acknowledge the Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca for allowing use of the flow cytometer. The research reported in this article was supported by the Project BACCHUS (FP7-KBBE-2012-6-single stage, European Commission Grant Agreement 312090). S.M.G. was supported by the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA grant agreement No. 608765. S.M.S. belongs to the "Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud. Universidad Católica de Murcia (UCAM)" and holds a FPU grant (FPU 15/03134) from the Ministry of Education (Spain).

**Author Contributions:** S.M.M.-S. recruited and performed the cytometric approach. A.M. optimized the flow cytometer protocol. D.P.-M. performed the regression models. M.P.Z.-R. and J.A.-A. designed the study. S.M.-G. drafted the manuscript and controlled the recruitment.

**Conflicts of Interest:** All authors declare no conflict of interests.

### Abbreviations

ACE	Angiotensin I Converting Enzyme
ADP	Adenosine diphosphate
BMI	Body Mass Index
BP	Blood Pressure

CAD	Coronary artery Disease
CVD	Cardiovascular Disease
FSC/SSC	Forward-scattered light/Side-scattered light
hsIL6	high-sensitivity Interleukin 6
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIF	Mean Fluorescence Intensity
Mon	Monocyte
SDF1	Stromal Derived Factor-1
TLR4	Toll-Like Receptor 4
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
UCAM	Catholic University of Murcia

## References

1. Eussen, S.R.; Verhagen, H.; Klungel, O.H.; Garssen, J.; van Loveren, H.; van Kranen, H.J.; Rompelberg, C.J. Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *668* (Suppl. S1), 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Aihara, K.; Osaka, M.; Yoshida, M. Oral administration of the milk casein-derived tripeptide Val-Pro-Pro attenuates high-fat diet-induced adipose tissue inflammation in mice. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 513–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bjørndal, B.; Berge, C.; Ramsvik, M.S.; Svoldal, A.; Bohov, P.; Skorve, J.; Berge, R.K. A fish protein hydrolysate alters fatty acid composition in liver and adipose tissue and increases plasma carnitine levels in a mouse model of chronic inflammation. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Girgih, A.T.; Alashi, A.M.; He, R.; Malomo, S.A.; Raj, P.; Netticadan, T.; Aluko, R.E. A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients* **2014**, *6*, 5652–5266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Borissoff, J.I.; Spronk, H.M.; ten Cate, H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1746–1760. [[PubMed](#)]
6. Passacquale, G.; Vamadevan, P.; Pereira, L.; Hamid, C.; Corrigan, V.; Ferro, A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25595.
7. Ed Rainger, G.; Chimen, M.; Harrison, M.J.; Yates, C.M.; Harrison, P.; Watson, S.P.; Lordkipanizdéd, M.; Nash, G.B. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets* **2015**, *26*, 507–520. [[PubMed](#)]
8. Chen, M.; Ye, X.; Ming, X.; Chen, Y.; Wang, Y.; Su, X.; Kong, Y. A Novel Direct Factor Xa Inhibitory Peptide with Anti-Platelet Aggregation Activity from *Agkistrodon acutus* Venom Hydrolysates. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10846. [[CrossRef](#)]
9. Majumder, K.; Chakrabarti, S.; Davidge, S.T.; Wu, J. Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2120–2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Qin, L.Q.; Xu, J.Y.; Dong, J.Y.; Zhao, Y.; van Bladeren, P.; Zhang, W. Lactotriptides intake and blood pressure management: A meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2013**, *23*, 395–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Bähr, M.; Fechner, A.; Kiehntopf, M.; Jahreis, G. Consuming a mixed diet enriched with lupin protein beneficially affects plasma lipids in hypercholesterolemic subjects: A randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 7–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Majumder, K.; Wu, J. Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *16*, 256–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ryan, J.T.; Ross, R.P.; Bolton, D.; Fitzgerald, G.F.; Stanton, C. Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients* **2011**, *3*, 765–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Escudero, E.; Mora, L.; Fraser, P.D.; Aristoy, M.C.; Arihara, K.; Toldrá, F. Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *J. Proteom.* **2013**, *78*, 499–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mora, L.; Gallego, M.; Escudero, E.; Reig, M.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. Small peptides hydrolysis in dry-cured meats. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *212*, 9–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Escudero, E.; Aristoy, M.C.; Nishimura, H.; Arihara, K.; Toldrá, F. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Sci.* **2012**, *91*, 306–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Escudero, E.; Mora, L.; Toldrá, F. Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion. *Food Chem.* **2014**, *161*, 305–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Jiménez-Colmenero, F.; Ventanas, J.; Toldrá, F. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 585–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Gallego, M.; Mora, L.; Toldrá, F. Peptidomics as a tool for quality control in dry-cured ham processing. *J. Proteom.* **2016**, *147*, 98–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Montoro-Garcia, S.; Shantsila, E.; Hernandez-Romero, D.; Jover, E.; Valdes, M.; Marin, F.; Lip, G.Y. Small-size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P-selectin. *Br. J. Haematol.* **2014**, *166*, 571–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Shantsila, E.; Tapp, L.D.; Wrigley, B.J.; Pamukcu, B.; Apostolakis, S.; Montoro-Garcia, S.; Lip, G.Y. Monocyte subsets in coronary artery disease and their associations with markers of inflammation and fibrinolysis. *Atherosclerosis* **2014**, *234*, 4–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Micha, R.; Michas, G.; Mozaffarian, D. Unprocessed red and processed meats and risk of coronary artery disease and type 2 diabetes—An updated review of the evidence. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2012**, *14*, 515–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gallego, M.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Meat Sci.* **2014**, *96*, 757–761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Escudero, E.; Mora, L.; Fraser, P.D.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1282–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Blann, A.D.; Nadar, S.K.; Lip, G.Y. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* **2003**, *24*, 2166–2179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kling, D.; Stucki, C.; Kronenberg, S.; Tuerck, D.; Rhéaume, E.; Tardif, J.C.; Gaudreault, J.; Schmit, C. Pharmacological control of platelet-leukocyte interactions by the human anti-P-selectin antibody inlacumab—Preclinical and clinical studies. *Thromb. Res.* **2013**, *131*, 401–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Konić-Ristić, A.; Srdić-Rajić, T.; Kardum, N.; Aleksić-Veličković, V.; Kroon, P.A.; Hollands, W.J.; Needs, P.W.; Boyko, N.; Hayran, O.; Jorjadze, M.; et al. Effects of bioactive-rich extracts of pomegranate, persimmon, nettle, dill, kale and Sideritis and isolated bioactives on arachidonic acid induced markers of platelet activation and aggregation. *J. Sci. Food. Agric.* **2013**, *93*, 3581–3587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Shantsila, E.; Wrigley, B.; Tapp, L.; Apostolakis, S.; Montoro-Garcia, S.; Drayson, M.T.; Lip, G.Y. Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: Possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 1056–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Canton, J.; Neculai, D.; Grinstein, S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 621–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





**ARTÍCULO 3**

Martínez-Sánchez, S. M., Pérez-Sánchez, H., Gabaldón, J. A., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2019). **Multifunctional Peptides from Spanish Dry-Cured Pork Ham: Endothelial Responses and Molecular Modeling Studies.** *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17).







Article

# Multifunctional Peptides from Spanish Dry-Cured Pork Ham: Endothelial Responses and Molecular Modeling Studies

Sara María Martínez-Sánchez <sup>1,2</sup>, Horacio Pérez-Sánchez <sup>3</sup> , José Antonio Gabaldón <sup>2</sup>,  
José Abellán-Alemán <sup>4</sup> and Silvia Montoro-García <sup>1,4,\*</sup> 

<sup>1</sup> Laboratorio de Cultivo Celular, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

<sup>2</sup> Departamento Tecnología de la Alimentación y Nutrición, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

<sup>3</sup> Bioinformatics and High Performance Computing Research Group (BIO-HPC), Computer Engineering Department, Universidad Católica de Murcia (UCAM), Guadalupe 30107, Murcia, Spain

<sup>4</sup> Cátedra de Riesgo Cardiovascular, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

\* Correspondence: smontoro@ucam.edu

Received: 24 July 2019; Accepted: 26 August 2019; Published: 28 August 2019



**Abstract:** Food peptides contain a very wide range of diversified structures, which explains their diverse range of functional activities. Proatherogenic endothelium is related to vasoconstriction, inflammation, and oxidative stress. In this line, four synthetic bioactive peptides from dry-cured pork ham, previously identified according to their Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) inhibitory capacity and high bioavailability, were tested. Among them, KPVAAP displayed an estimated  $IC_{50}$  of 59.22  $\mu$ M for human ACE inhibition, and docking simulations demonstrated the consistency of the noncompetitive binding with the protein. The addition of synthetic peptides to human endothelial cells significantly prevents the expression of genes related to endothelial dysfunction and inflammation (eNOS, ICAM-1, VCAM-1, IL-6) and lowers NF- $\kappa$ B activation (all  $p < 0.05$ ). In silico dockings showed that the four bioactive peptides interact with the regulatory subunit NEMO of the NF- $\kappa$ B transcription factor at the same site as other characterized inhibitors (CC2-LZ region). This is the first study linking experimental and computational approaches that shows NF- $\kappa$ B to be the target of biopeptides of food origin. These multifunctional peptides from dry-cured pork ham make them good candidates for further research into their therapeutic or preventive use to attenuate the inflammatory atherosclerotic process.

**Keywords:** bioactive peptides; inflammation; NF- $\kappa$ B; dry-cured pork ham; angiotensin I converting enzyme; endothelial dysfunction; molecular blind docking

## 1. Introduction

The endothelium is an important regulator of vascular homeostasis and an essential part of the cardiovascular (CV) system, participating in all aspects of pathophysiological processes such as muscular tone, inflammation, thrombosis, or vascular wall remodeling [1]. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a potent proinflammatory cytokine that triggers the canonical activation of the transcription nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and the endothelial gene expression of adhesion molecules, cytokines, and fibrinolytic proteins among others [2]. NF- $\kappa$ B is crucially involved in the pathogenesis of inflammatory diseases and represents a target for treatment. The canonical pathway is strictly regulated and involves various steps including the phosphorylation, ubiquitination, and degradation of the I $\kappa$ B kinase (IKK)

complex, which leads to the nuclear translocation of the p50 and p65 subunits of NF- $\kappa$ B [3]. Small molecules such as peptides have been shown to bind with high affinity protein kinases, phosphatases [4] and inhibit ubiquitination which could explain their potential as NF- $\kappa$ B inhibitors [5].

Levels of inflammatory biomarkers are increased in common pathological conditions such as hypertension, hyperlipidemia, physical inactivity, among others [6]. In this last respect, beneficial dietary habits, which include anti-inflammatory and antioxidant foods, have gained in popularity for the prevention of cardiovascular diseases (CVD). Many experimental studies have documented that small sequence peptides are released during gastrointestinal digestion, food processing, and the microbial proteolysis of proteins [7]. Depending on the sequence of amino acids, these bioactive peptides (BP) can exhibit different biological activities [8], mainly through pathways that are still not clearly understood. Bioactive peptides have attracted a lot of scientific interest due to their wide range of biofunctional properties [9]. The inhibition of Angiotensin I-converting enzyme (ACE) is a widely studied effect of BP from pork meat [10], and many of these BP show high bioavailability [11]. However, few mechanistic studies have looked at possible functional properties other than ACE inhibition. In a previous clinical study, our group suggested a link between the regular consumption of dry-cured pork ham with its characteristic BP and an improvement in the inflammatory status [12].

The present study aims to confirm a robust cause and effect relationship between BP from dry-cured pork ham and beneficial physiological effects related to CV health in humans. For that purpose, changes in human ACE activity, endothelial dysfunction gene expression, NF- $\kappa$ B activation, oxidative and apoptotic markers were tested. In addition, molecular modelling was used to establish novel peptide-NF- $\kappa$ B interactions at the molecular level, which has not been attempted before. The current findings suggest that BP from dry-cured pork ham bind to the NEMO subunit of the IKK complex and might suppress the NF- $\kappa$ B-dependent gene expression *in vitro*.

## 2. Results

### 2.1. Peptides with Human *in Vitro* ACE Inhibitory Activity

The inhibitory activity of human overexpressed endothelial ACE was assayed in transfected cells (Figure S1), with the results expressed as IC<sub>50</sub> (Table 1). By HPLC it was revealed that BP1 (KPVAAP) is a potent inhibitor of ACE activity with an estimated IC<sub>50</sub> of 59.22  $\mu$ M, making it 16 times more effective than BP2 and BP4 with an estimated IC<sub>50</sub> > 1000  $\mu$ M. BP3 also displayed a high IC<sub>50</sub> of 485  $\mu$ M. The initial linear dose-response pointed to the higher ACE inhibitory activity of BP1 and BP3 but was not directly comparable to the inhibitory effect of captopril on a weight-basis (IC<sub>50</sub> below 10  $\mu$ M).

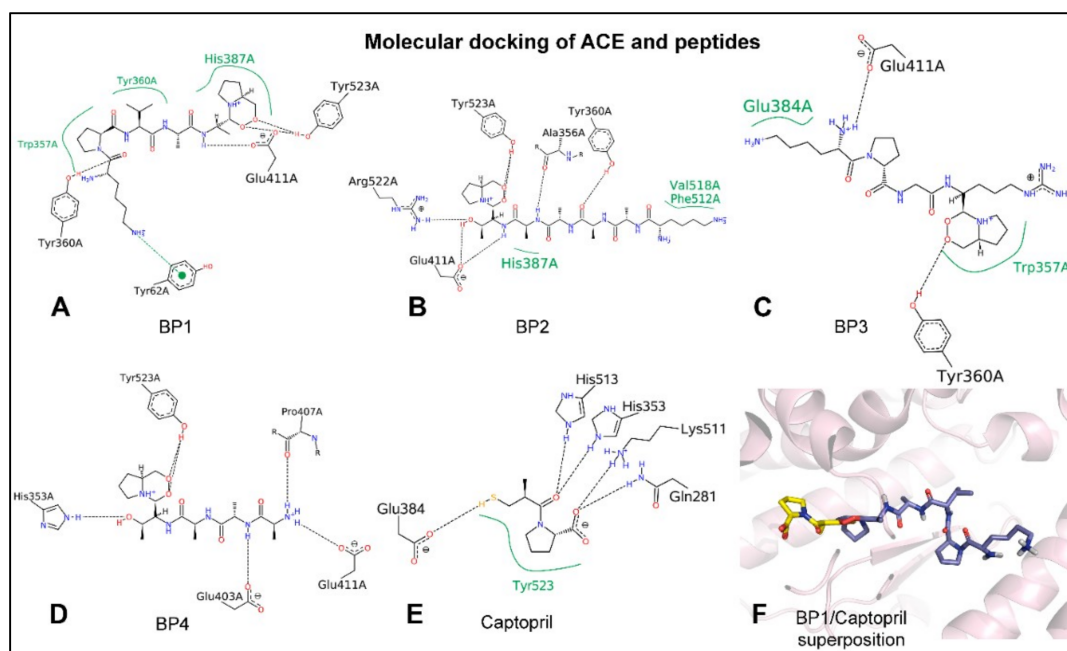
**Table 1.** Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from dry-cured pork ham: sequence, estimated IC<sub>50</sub> value and interaction score. Captopril (10  $\mu$ M) inhibition was used to represent 100% inhibition of ACE activity under the assay conditions.

Bioactive Peptide	Sequence	Source of Protein	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Interaction Score
PEPTIDE 1 (BP1)	KPVAAP	Myosin-XV	59.22 $\pm$ 3.8	-8.1
PEPTIDE 2 (BP2)	KAAAATP	PR domain Zinc Finger Protein 2	>1000	-7.1
PEPTIDE 3 (BP3)	KPGRP	Titin	485.50 $\pm$ 43.47	-8.2
PEPTIDE 4 (BP4)	AAATP	PR domain Zinc Finger Protein 2	>1000	-7.1

Data from three independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD. Specific ACE activity was expressed as  $\mu$ moles of substrate HHL converted to the product HA per unit of time and normalized for protein content (units per microgram of protein).

## 2.2. Peptides Penetrate in the Catalytic Active Site of ACE

Docking simulations were carried out (Figure 1) to provide insight at atomic level into the interactions established between the different peptides, captopril, and the active site of human ACE (PDB: 4APJ) [13]. The four peptides (BP1, BP2, BP3, BP4) and captopril were able to bind to the protease with interaction scores of  $-8.1$ ,  $-7.1$ ,  $-8.2$ ,  $-7.1$ , and  $-8.2$  kcal/mol, respectively (Table 1). The area of the hydrophobic interactions and/or the establishment of hydrogen bonds (Figure 1) depend on their distinct sequences and resulting interaction patterns. Figure 1F shows that BP1 occupied the S1 and S2 subsites (near the active site), while the commercial antihypertensive drug, captopril, was found deeper inside the active site of ACE.



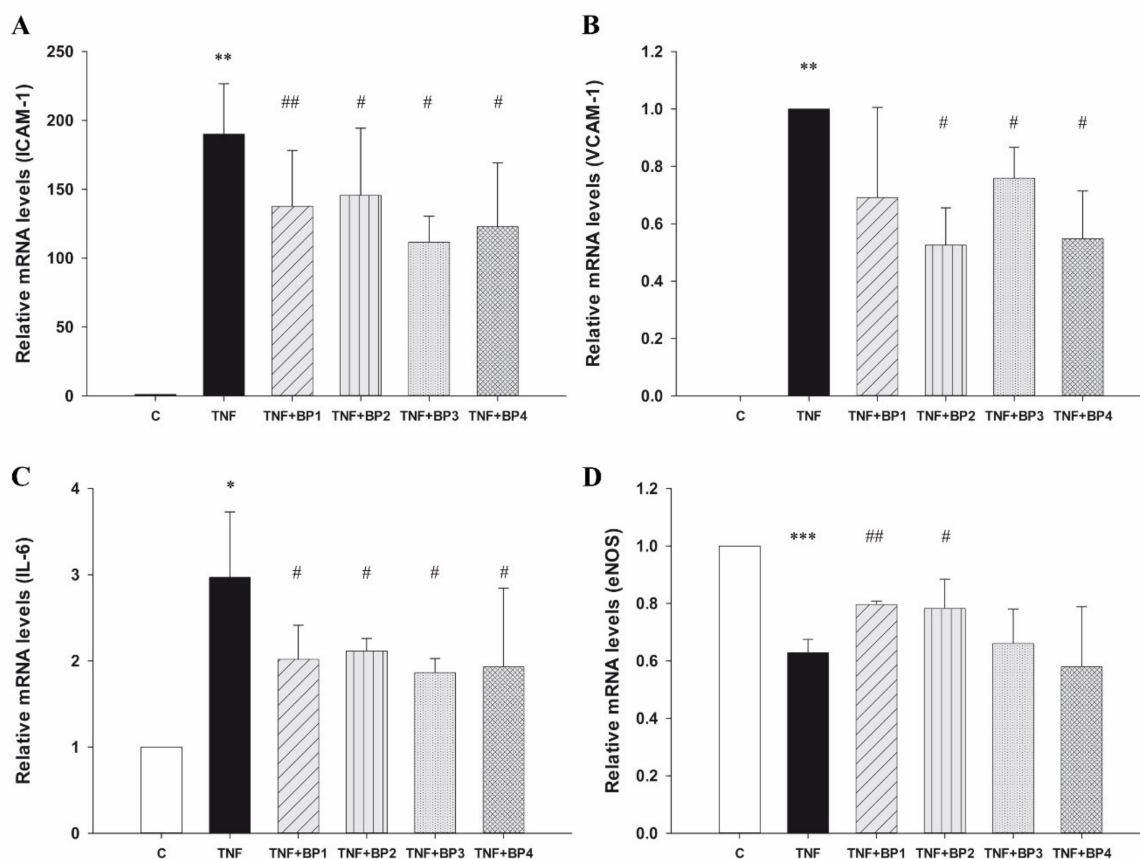
**Figure 1.** Depiction (in 2D) of the molecular docking between catalytic residues from the active site of ACE (PDB: 4APJ) and the bioactive peptides. (A) Peptide 1 (BP1) KPVAAP, (B) Peptide 2 (BP2) KAAAATP, (C) Peptide 3 (BP3) KPGRP, and (D) Peptide 4 (BP4) AAATP. (E) Captopril. (F) The superposition (in 3D) of BP1 (in purple) and captopril (in yellow) in stick representation. Continuous green lines represent hydrophobic interactions, while black dashed lines show hydrogen bonds. The absence of hydrophobic stabilization in the case of BP4 (D) might explain its high  $IC_{50}$  value. Moreover, BP2 (B) showed small hydrophobic interaction areas compared with BP1 (A) and BP3 (C), which contained voluminous hydrophobic groups.

## 2.3. Peptide Effects in Inflammatory Conditions

### 2.3.1. Peptides Affect Gene Expression in Inflammatory Conditions

To define the stimulatory conditions in which endothelial cells express high levels of adhesion and inflammatory markers, EA.hy926 cells, a well-established endothelial model of large vessel endothelium, were treated with 10–200 ng/mL of the prototypic inflammatory cytokine  $TNF-\alpha$  [14,15]. To develop an optimal inflammatory cell model with  $TNF-\alpha$ -stimulated cells and investigate its response to anti-inflammatory BP, doses (10, 50, and 100 ng/mL) and durations (6 h and 12 h) of  $TNF-\alpha$  treatment were optimized. Since the increase in protein expression reached a maximum at 6 h, further experiments were performed in EA.hy926 cells after 6 h of treatment with 100 ng/mL  $TNF-\alpha$ . Incubation with  $TNF-\alpha$  rapidly increased the transcription of ICAM-1, VCAM-1, and IL-6 genes and decreased eNOS expression compared with control conditions (all  $p < 0.05$ ) (Figure 2). However, the addition of 300  $\mu M$  synthetic peptides significantly prevented ICAM-1 mRNA overexpression in

TNF- $\alpha$  activated cells ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A). In addition, BP2, BP3, and BP4 also downregulated the expression of VCAM-1 mRNA after stimulation with TNF- $\alpha$  ( $p = 0.01$ ;  $p = 0.03$ ;  $p = 0.02$ , respectively) (Figure 2B). Treatment with the four peptides produced a similar effect on IL-6 mRNA expression (all  $p < 0.05$ ) (Figure 2C), while eNOS mRNA expression only recovered after treatment with BP1 and BP2 ( $p = 0.0003$  and  $p = 0.04$ , respectively) (Figure 2D). Importantly, the treatment using 300  $\mu\text{M}$  synthetic peptides alone—without stimulation—did not significantly alter the cell expression of these four genes or their viability compared to control conditions (Figures S2 and S3A, respectively).



**Figure 2.** Relative mRNA expression of (A) ICAM-1, (B) VCAM-1, (C) IL-6, (D) eNOS in Ea.hy926 cells after treatment with 100 ng/mL TNF- $\alpha$  and 300  $\mu\text{M}$  synthetic peptides. Data shown represent averaged values of three independent experiments. The asterisks \*, \*\*, and \*\*\* indicate statistically significant differences compared with unstimulated cells ( $p < 0.05$ , 0.01, or 0.001, respectively). #, ##, or ### indicate statistically significant differences compared with stimulated cells ( $p < 0.05$ , 0.01, or 0.001, respectively).

### 2.3.2. Peptides Affect Protein Expression in Inflammatory Conditions

The corresponding flow cytometry (FACS) analysis pointed to an increase in ICAM-1 mean fluorescence intensity (MFI) on the cell surface after TNF- $\alpha$  stimulation ( $p = 0.0003$ ) (Table 2). The coincubation of synthetic peptides (BP1, BP2, and BP4) and TNF- $\alpha$  resulted in a reduced ICAM-1 surface density compared to TNF- $\alpha$  activated cells (all  $p < 0.05$ ) (Table 2, Figure S4B). Despite the higher number of VCAM-1 positive cells, the surface staining of VCAM-1 was hardly detectable even after TNF- $\alpha$  stimulation and no effect was found after the addition of synthetic peptides to the activated cells (Figure S4C). Peptide treatment alone did not impair the MFI of adhesion molecules compared to control conditions.

**Table 2.** Mean fluorescence intensity (MFI) of ICAM-1 surface expression in inflammatory conditions measured by flow cytometry.

	ICAM-1 MFI	<i>p</i> Value
Control	71.36 ± 8.31	
TNF $\alpha$	1271.91 ± 158.54	0.0003
TNF $\alpha$ + BP1	1151.37 ± 59.53	0.03
TNF $\alpha$ + BP2	1064.42 ± 32.02	0.009
TNF $\alpha$ + BP3	1203.01 ± 279.89	0.09
TNF $\alpha$ + BP4	926.01 ± 152.46	0.04

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1; VCAM-1 Vascular Adhesion Molecule-1; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ; BP: Bioactive peptide. Data from six independent experiments are expressed as mean  $\pm$  SD. TNF- $\alpha$  stimulated cells are compared to control conditions, and preincubations with 300  $\mu$ M synthetic peptides are compared to 100 ng/mL TNF- $\alpha$  alone.

The intracellular protein expression of ICAM-1 in the same conditions as above was confirmed by western blot (Figure S4D). Treatment with three of the four peptides (BP2, BP3 and BP4) consistently resulted in a lower production of ICAM-1 protein, compared with that produced after TNF- $\alpha$  stimulation ( $p < 0.01$ ) (Figure S4D). No intracellular VCAM-1 was detected in these cells using the same approach.

#### 2.4. Effect of Peptides in Oxidative Conditions

##### 2.4.1. Peptides Do Not Affect Cell Viability and Apoptosis after Treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

To explore the role of synthetic peptides in oxidative conditions, the endothelial cell function was impaired by means of high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, as it has been previously reported [16,17]. Treatment with synthetic peptides did not improve cell viability after the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (Figure S3B). Moreover, 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused 10% apoptosis (AnV+, PI–cells) and 18% necrosis (AnV+, PI+ cells), and BPs were unable to improve this cytotoxic effect (Table S1).

##### 2.4.2. Peptides Slightly Affect the Oxidative Status

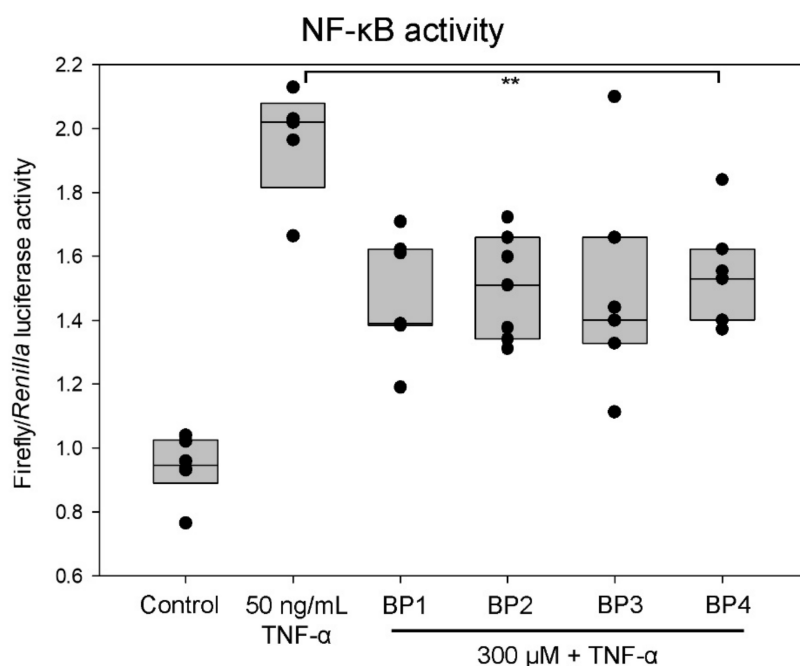
The mRNA expression of the redox enzymes, IL-6 and BAX, were analyzed by RT-PCR, after 16 h of preincubation with synthetic peptides followed by 24 h with 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure S5). In the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the expression of eNOS increased 3.3-fold ( $p = 0.01$ ). Pretreatment with synthetic peptides did not affect the expression of the redox enzymes in oxidative conditions. Consistent with this, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upregulated IL-6 mRNA expression 1.84-fold ( $p = 0.001$ ), independently of the presence of synthetic peptides. The proapoptotic gene BAX showed a 1.5-fold increase in expression after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment ( $p = 0.02$ ) and synthetic peptides did not modify the previously obtained expression levels.

Subsequently, the effect of synthetic peptides on protein carbonylation was determined by immunoblotting assay, which showed that the protein carbonylation levels significantly increased after only 30 min of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. In the presence of BP1 and BP3, the basal oxidative status was maintained (Figure S6) (all  $p < 0.05$ ). The overall protein carbonylation level of unstimulated cells was like that seen in the presence of peptides alone, except in the presence of BP3, when it was even lower (Figure S6).

#### 2.5. Peptides Decrease NF- $\kappa$ B Activity

To evaluate whether the synthetic peptides could modulate the NF- $\kappa$ B biological activity, a luciferase reporter assay was carried out, using the Renilla reporter as a specificity control and indicator of cell proliferation [18]. In this study, NF- $\kappa$ B activity was induced at a lower concentration of TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) because of the high sensitivity of the approach. The normalized firefly/Renilla luciferase activity was reduced by around 25% of the activity when cells were pretreated with the BP1 ( $p = 0.002$ ), BP2 ( $p = 0.003$ ), and BP3 ( $p = 0.003$ ) synthetic peptides (Figure 3). The NF- $\kappa$ B luciferase activity was also repressed by BP4 to a lesser degree ( $p = 0.012$ ). The basal activity for NF- $\kappa$ B was not

inhibited by synthetic peptides without TNF- $\alpha$  stimulation (data not shown). These results suggest that synthetic peptides may target events needed for NF- $\kappa$ B activation, rather than other transcription factor activations.



**Figure 3.** Activation of NF- $\kappa$ B after treatment with 50 ng/mL TNF- $\alpha$  and 300  $\mu$ M synthetic peptides. Ea.hy926 cells were transfected with NF- $\kappa$ B:Luc together with the pRL-CMV (10:1) reporter vectors. The normalized luciferase activity (firefly/Renilla) was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay in extracts from control, TNF- $\alpha$ , and synthetic peptide-treated cells. Upper and lower bars of box plots represent the 25th and 75th percentiles, respectively. Median is represented as the bar inside the box plot. The data shown represent values of three independent experiments (dots). The asterisks \*\* indicate statistically significant differences compared with stimulated cells ( $p < 0.015$ ). The BP treatment prevented TNF- $\alpha$ -induced proinflammatory NF- $\kappa$ B activation by 25%.

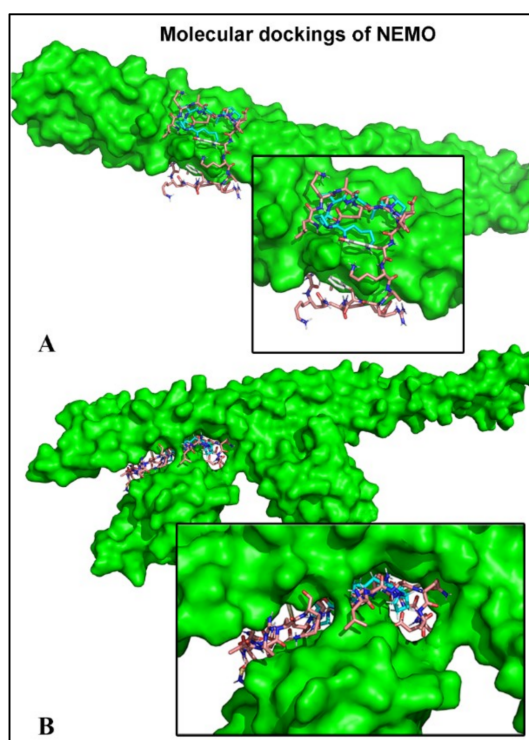
## 2.6. Peptides Bind to the Subunit NEMO

Blind docking approaches were used to model peptide binding interactions with the regulatory subunit of NF- $\kappa$ B, NEMO. In silico docking calculations support the potential binding of the four distinct peptides around the residue Glu315, which is crucial for functional assessment and could impair IKK recruitment through competition with the Lys63-linked poly-Ub (Table 3) [19]. The theoretical interactions of these BP and the NF- $\kappa$ B inhibitors are shown (Table 3A,B). Interestingly, BP1–4 efficiently bound to the same site as the anthraquinone derivative of the natural emodin (iNUB) (Table 3A,B). Indeed, the UBI peptide and BP1–4 were all found in the ubiquitin binding motifs of 4BNW and 3JSV (Table 3A,B, respectively and Figure 4). When the CCL-Z2 region displayed Lys63-linked poly-Ub (PDB: 3JSV), peptide binding appeared to be weaker due to the absence of hydrogen bonds, except in the case of BP2 (Table 3B).

**Table 3.** Blind docking simulation results showing the main residues involved in the interactions with the docked BP and compounds. **(A)** Docking to 4BWN PDB. **(B)** Docking to 3JSV PDB. Common residues are marked in bold.

<b>A</b>	<b>Ligand</b>	<b>PDB Code</b>	<b>Hydrogen Bonds</b>	<b>Hydrophobic</b>
	BP1	4BWN	ALA314A, GLU315A, GLN317A	ALA314A, ALA318A
	BP2	4BWN	ASP311A, GLN313A, ALA314A, GLU315A, GLN317A	PHE312B
	BP3	4BWN	ASP311A, GLU315A, LYS326B, GLU327B	ALA314A, LYS325A
	BP4	4BWN	ALA314A, GLN317A	
	iNUB	4BWN	LYS326B, GLU327B	LYS321A, ALA323B
	UBI peptide	4BWN	GLU315B, GLN317A, ARG319A, GLU320A, LYS321A,	GLN317A, ALA318A, GLU320A, LYS321A, ALA323A
<b>B</b>	<b>Ligand</b>	<b>PDB Code</b>	<b>Hydrogen Bonds</b>	<b>Hydrophobic</b>
	BP1	3JSV	THR55A, SER57A, ASP58A, ASN60A	
	BP2	3JSV	ASP39A, GLY76A	PRO37A
	BP3	3JSV	LYS63B, SER65B	
	BP4	3JSV	GLU18B, LYS63B, ARG74A, ARG312D	
	iNUB	3JSV	ARG312D	ALA311C, LEU315C, VAL316D, LYS319D
	UBI peptide	3JSV	GLU24A, ASN25A, ASP39A, ARG42A, LEU50A, ASP52A, GLY53A, GLN62B, GLU64B	THR22A, GLU 24A, PRO38A, GLY53A, THR55A, GLU64B

iNUB is an anthraquinone derivative (8-hydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydro-1-anthracenyl 2-phenylcyclopropanecarboxylate). UBI peptide: LKAQADIYKARFQAERHAREK (21 residues).



**Figure 4.** Blind docking of the UBI peptide and BP1 in the CCL-Z2 binding domain of NEMO. **(A)** 4BWN without linked ubiquitins. **(B)** 3JSV complexed with Lys 63-linked poly-ubiquitin. The superposition of UBI peptide and BP1 (in blue) is shown. In silico docking calculations support the potential binding of the four distinct BP, which could impair IKK recruitment through competition with the Lys63-linked poly-ubiquitin.

### 3. Discussion

Numerous reports have identified stable peptides with high ACE-inhibitory activity from pork dry-cured ham after gastrointestinal digestion [11,20]. Four of them were synthesized chemically (KPVAAP, KAAAATP, KPGRP, and AAATP) for the current experimental studies with human endothelial cells. The synthetic peptides were much more effective ACE inhibitors when purified rabbit ACE was used *in vitro*: KPVAAP (BP1, 12.37  $\mu\text{M}$ ), KAAAATP (BP2, 25.64  $\mu\text{M}$ ), KPGRP (BP3, 67.02  $\mu\text{M}$ ), and AAATP (BP4, 100  $\mu\text{M}$ ) [21], an inconsistency that might be due to the presence of other proteins in the endothelium lysate extract. In both assays, BP1 was the most potent peptide and BP4 the least potent.

Docking simulations were carried out with human ACE and the different BP in order to explain the respective  $\text{IC}_{50}$  values. Molecular modelling showed that BP1, BP2, and BP3 are stabilized by both hydrogen and hydrophobic interactions with at least one residue of the three pockets, consistent with the typical competitive inhibition model. BP1 and BP2, particularly, established hydrophobic interactions with HIS387 and hydrogen bonds with TYR360, TYR523, and GLU411, while BP3 reached hydrophobic stability with GLU384 and TRP357 and formed hydrogen bonds with TYR360 and GLU411. Moreover, BP4 only established hydrogen bonds with GLU411, HIS353, and TYR523. The absence of hydrophobic stabilization in the case of BP4 might explain its high  $\text{IC}_{50}$  value. BP2 showed small hydrophobic interaction areas compared with BP1 and BP3, both of which contained voluminous hydrophobic groups. Therefore, the stability of BP2 seems to be comparable to that of BP4. Besides, captopril formed up to five H-bonds with key residues within the active site (GLU384, TYR523, and HIS353 residues). BP1 was found to occupy the S1 and S2 subsites (near the active site) but was not located inside the active site of ACE, in contrast to captopril. Therefore, we concluded that, structurally, BP are noncompetitive inhibitors of ACE so their  $\text{IC}_{50}$  were much higher compared to captopril. The present data are of special interest for predicting and understanding mechanisms of action of BP and may also be of help for predicting new biomolecules before the relevant assays are carried out.

Apart from its ACE inhibitory capacity, food-derived peptides have been shown to display a wide range of functional activities over the CV system. In fact, multifunctional peptides interfere with more than one biological pathway, such as NO production, oxidative stress, and inflammation. The Ea.hy926 cell line demonstrates highly differentiated functions of human vascular endothelium, such as expression of inflammation cytokines (e.g., IL-6) and adhesive markers (ICAM-1 and VCAM-1) [14]. Our interest in the use of an *in vitro* model of endothelial dysfunction was to further understand the regulatory effects of the BP treatment in inflammatory conditions. In fact, endothelial NOS was found slightly overexpressed in the presence of these synthetic peptides, which could also be beneficial for attenuating endothelial dysfunction. Similarly, a decrease in inflammatory markers (IL-6 and eNOS) has also been reported with the milk-derived peptides VPP and IPP in spontaneous hypertensive rats using DNA microarray [22]. Egg-derived IRW peptide also inhibited the TNF- $\alpha$ -induced increase of adhesive molecules [23]. Moreover, BP from milk impaired human endothelial-monocyte interactions by inhibiting the expression of VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin [24]. Regarding the surface expression of proteins, their measurement strongly depends on the detachment method. The overall surface expression of ICAM-1 was found to be trypsin-resistant, while VCAM-1 was much more sensitive to trypsin degradation [25]. This fact could explain the different results on VCAM-1 gene and protein expression here reported. No mechanisms that might regulate these inhibitions have been identified, but some studies suggest that NF- $\kappa\text{B}$  is the main target [24]. These results are in line with a previous clinical study carried out in humans, where the regular intake of dry-cured ham containing the currently described BP lowered plasmatic IL-6, P-selectin, and MCP-1 levels but did not alter plasmatic VCAM-1 [12]. All this evidence supports the hypothesis that the dual ability of these BP to modulate adhesive markers and eNOS might be due to the NF- $\kappa\text{B}$  interaction.

On the other hand, oxidative stress and inflammation are closely related pathophysiological processes, one of which can be easily induced by another. Likewise, oxidative stress can activate the NF- $\kappa\text{B}$  pathway [26]. In the current study, the simultaneous use of synthetic peptides and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was



ineffective at reducing cell death, indicating that these peptides do not target apoptotic mechanisms of action (for instance, caspases or BAX proteins). Besides, the *in vitro* antioxidant capacity of these peptides [27] was not supported by the current results since the redox enzymes remained unaltered and the carbonylation protein approach was not sensitive enough to confirm the reduction of reactive oxygen species.

Nonetheless, it is apparent from the current data that TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation is sharply attenuated in human endothelial cells in the presence of these peptides from dry-cured pork ham. Several studies have also demonstrated the anti-inflammatory role of specific peptides [28]. However, the research efforts were limited to the biological effects and the action mechanisms were not deduced [29]. In our case, blind docking approaches were used to model peptide binding interactions with the regulatory subunit of NF- $\kappa$ B, NEMO. Recent studies have shown that direct binding of NEMO to linear polyubiquitin (poly-Ub) chains in the TNF- $\alpha$  signaling pathway is crucial for kinase (IKK $\alpha/\beta$ ) recruitment and further NF- $\kappa$ B activation [30,31].

Furthermore, optineurin and small molecules (anthraquinone derivatives and peptides) have previously been suggested to negatively regulate TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation by competing with this CC2-LZ region for Lys63-linked poly-Ub [32,33]. We further found that the BP used experimentally could bind to the same region as a competitive peptide, the UBI peptide, specifically designed to interfere with the coiled interfaces of NEMO [33]. The targeting of IKK $\beta$  by dry-cured pork ham peptides was unexpected and suggests the potential regulatory role of the canonical pathway of NF- $\kappa$ B activation identified in the *in vitro* approaches.

The CCL-Z2 region interacts with Lys63-linked poly-Ub chains with relatively low affinity, which could facilitate the disruption by small molecular compounds, such as peptides [19]. Therefore, the possibility that the BP under study have a biological effect due to their interaction with NEMO before and/or after polyubiquitin binding (PDB: 4BWN and 3JSV, respectively) is very likely. Since both interactions are possible, our data do not determine whether these peptides impair ubiquitin binding by competing at the site or modulating it after TNF- $\alpha$  stimulation. Nonetheless, these data must be interpreted with caution because the inhibitory concentration and bioavailability of these multifunctional BP are still unknown, thereby limiting clinical anti-inflammatory therapeutic strategies. At this point, it is important to mention that this study does not attempt to use attainable eating levels of bioactive peptides (300  $\mu$ M) but provides the conceptual and operational tools for investigating the sites of action of BP in the context of inflammatory pathological mechanisms. The study may lead to better understanding of the effects of food-derived BP as ACE-inhibitors, the findings being of indirect clinical relevance.

## 4. Material and Methods

### 4.1. Peptides

Spanish dry-cured ham has been reported as a good source of bioactive peptides with potent ACE inhibitory activity *in vitro* [21]. Four of these identified peptides were synthesized chemically by GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA) at the highest purity certified using liquid-chromatography mass spectrometry (LC-MS) analysis for the current experimental approaches with human endothelial cells. The sequence and protein origin of the peptides are shown in Table 1.

### 4.2. Cell Culture

EA.hy926 cells, the hybrid human umbilical vein endothelial cell line, were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC<sup>®</sup> CRL2922<sup>™</sup>, Rockville, MD, USA). Cells were cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Biowest, Riverside, CA, USA) and 50 U/mL of penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). Cells were grown in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified air incubator at 37 °C. Subculture was performed when 90% confluence was reached.

#### 4.3. Human ACE Inhibition Assay

To overexpress the ACE enzyme, EAhy926 cells were transiently transfected with a human Ace ORF mammalian expression plasmid (Sinobiological, Beijing, China) using trans-it X2 reagent (Mirus<sup>®</sup>, Madison, WI, USA). The resultant ACE had a terminal peptide Myc and the efficiency of transfection was checked by immunofluorescence, using an antimyc antibody (Sigma Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) (Figure S1).

Cells were lysed using 200  $\mu$ L M-PER<sup>®</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Human ACE inhibitory activity of the four chemically synthesized peptides was tested in vitro. Briefly, 20  $\mu$ g of lysate (protein) was incubated for one hour at 37 °C with peptides concentrations (50–1000  $\mu$ M) containing 5 mM Hippuryl Histidyl Leucine (HHL) (Sigma Aldrich Chemical Co., Saint Louis, USA) as substrate. Captopril (10  $\mu$ M) was used as the positive control of inhibition for the assay conditions. The HHL was transformed into hippuric acid (HA), which was detected by high-performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japan) in a C18 column (Teknokroma, Madrid, Spain). The mobile phase was composed of solvent A, 0.05% trifluoroacetic in water; and solvent B, 100% acetonitrile. The ratio of solvent A/solvent B was 7/3, and the flow rate was 1.5 mL/min. The elute was analyzed at a wavelength of 214 nm, which is the maximum absorbance of HA, and the column temperature was maintained at 25 °C. The IC<sub>50</sub> value (the concentration of inhibitor resulting in a 50% reduction of ACE activity) was calculated by regression analysis from the ACE inhibition curve obtained with increasing amounts of synthetic peptides.

#### 4.4. TNF- $\alpha$ and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulation

EA.hy926 were seeded in six-well plates at  $0.25 \times 10^6$  cells/well in DMEM supplemented with 5% FBS. Cells were treated with 300  $\mu$ M of each peptide for 16 h. Then, 100 ng/mL TNF- $\alpha$  or 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added for an additional 6 h or 24 h, respectively.

#### 4.5. Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from EA.hy926 cells using 300  $\mu$ L Trisure<sup>™</sup> (Bioline, Taunton, MA, USA) reagent and Direct-zol<sup>™</sup> RNA MiniPrep (Zymo Research Irvine, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (Sensifast cDNATM Synthesis kit, Bioline, Taunton, MA, USA). The mRNA levels of the target genes were quantified by RT-PCR using SensiFAST SYBER Hi-ROX Kit (Bioline, Taunton, MA, USA) with StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, 5  $\mu$ L of 1:5 diluted cDNA was added to the qPCR reaction containing 10  $\mu$ L 2X SensiFAST Mix and 400 nM of each primer in a total volume of 20  $\mu$ L.

Specific and validated primers for human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH), intercellular adhesion marker-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion marker-1 (VCAM-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), interleukin 6 (IL-6), catalase, SOD (Super Oxide Dismutase), NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase) and Bax (proapoptosis regulator) genes were used (Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, USA).

The relative mRNA expression of the genes of interest was represented by:

$$2^{(-\Delta\Delta CT)} = [CT_{(\text{gene of interest})} - CT_{(\text{GADPH})}]_{\text{test}} - [CT_{(\text{gene interest})} - CT_{(\text{GADPH})}]_{\text{control}}.$$

The relative quantification of gene expression was determined by the comparative fold change  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [34]. An average value of each target gene after GAPDH normalization at the time point showing highest expression was used as a calibrator to determine the relative levels in the rest of the experimental conditions. All the assays were performed in triplicate. Each qPCR reaction had three replicates.

#### 4.6. Flow Cytometry

To measure adhesion molecule content in human endothelial cells by flow cytometry, the cell monolayer was detached and fixed before immunofluorescence labelling [25]. The following antibodies were used per sample: 20  $\mu$ L anti-ICAM-1/CD54-phycoerythrin (PE) (clone HA58, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and 5  $\mu$ L anti-VCAM-1/CD106-PerCP-Cy5.5 (clone 51-10C9; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Stained cells (10,000 events) were examined by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) in a simultaneous two-color analysis with FL2 (PE) and FL3 (PerCP-Cy5.5) channels. Markers were set according to the negative controls to quantify the percentage of positively stained cells. Mean Fluorescence Intensity (MFI) was calculated for each antigen (MFI of total stained cells-MFI of negative control cells).

ApoScreen Annexin V Apoptosis Kit-FITC (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) was used to detect the apoptosis rate. After the co-incubation of synthetic peptides and 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $0.4 \times 10^6$  cells were detached and washed in cold PBS, then resuspended in 100  $\mu$ L Annexin V binding buffer and treated following the manufacturer's protocol. Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) binding was assessed in FL1 channel simultaneously with propidium iodide (FL2 channel). This test discriminates among intact cells (FITC-/PI-), apoptotic cells (FITC+/PI-), and necrotic cells (FITC+/PI+). Assays were performed in triplicate (Table S1).

#### 4.7. NF- $\kappa$ B Activity

The dual luciferase assay has been widely used in cell lines to rapidly and accurately determine the activity of the promoter of NF- $\kappa$ B. The transfected vector, pNF- $\kappa$ B:Luc, carries the luciferase gene under the control of three synthetic copies of the  $\kappa$ B consensus of the immunoglobulin  $\kappa$ -chain promoter cloned in the BamHI site located upstream of the conalbumin transcription start site. This construct, together with the pRL-CMV, were kindly provided by Dr. Cayuela-Fuentes (Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain) [18].

For luciferase reporter assays, 80,000 cells/well were seeded in 24-well plates overnight, followed by cotransfection with 0.5  $\mu$ g pNF- $\kappa$ B:Luc/pRL-CMV at a ratio of 10:1 using 1.5  $\mu$ L trans-it X2 reagent (Mirus<sup>®</sup>, Madison, WI, USA). The transfection media was changed 6 h after transfection by complete growth medium. The following day, cells were treated with the synthetic peptides for 16 h and then with 50 ng/mL TNF- $\alpha$  for 6 h. NF- $\kappa$ B-dependent firefly luciferase activity and NF- $\kappa$ B-independent Renilla luciferase activity were assessed using Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) in a Luminometer Optocomp I (MGM Instruments). Data were normalized to the amounts of Renilla luciferase activities, according to the manufacturer's protocol.

#### 4.8. Molecular Modelling

In order to obtain detailed information at atomic level about the interactions between the different peptide molecules, inhibitors and the human proteins, molecular modelling studies were carried out.

A representative X-ray crystal structure for human ACE (PDB code 4APJ) was chosen, and its full atom model for the docking simulation was prepared. Docking simulations were chosen as the most adequate molecular modelling technique for the ACE study, since they efficiently predict at a reasonable computing cost electrostatic, van der Waals, hydrogen bond and hydrophobic interactions between interacting ligands and protein [35]. Partial charges and hydrogens were added with Autodock Tools [36]. The studied peptide molecules and characterized inhibitors were built manually using Pymol [37].

Two representative X-ray crystal structures of the NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO, were retrieved from the PDB database (PDB: 4BWN and 3JSV), and their full atom models for the docking simulations were prepared. The sequence for the UBI peptide was extracted from the work of Chiaravalli et al. [32] and the structure from the anthraquinone derivative, iNUB, was retrieved from

the work of Vincendeau et al. [38]. In order to determine in which part of the CC2-LZ region of NEMO the different ligands interact, a blind docking approach [39] where the researcher does not define any preferred interaction spot [40] was followed, where multiple docking runs started around the geometric centers of all residues. A histogram with the resulting distribution of binding energies and their structural clusters of poses was generated. Each individual docking simulation was performed with the Autodock Vina software AUTODOCK using default configuration parameters [41]. The size of the grid box was set to extend 120 Å in each direction from the geometric center of each individual docking simulation. The docking score produced by Autodock Vina was taken as the predicted value of the ligand binding energy. Only the top-ranked poses were used for structural and energy analyses. The scoring function from Vina considers the Lennard-Jones term (LJ), hydrogen bonds (H-bonds), electrostatic interactions, hydrophobic stabilization, entropic penalty due to the number of rotatable bonds, and the internal energy of the ligand.

#### 4.9. Statistical Analyses

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three determinations. A Student's *t*-test was used to compare the differences between the mean of two groups. Statistical analyses were performed with SPSS 21.0. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

The overall goal of the study was to identify which specific mechanisms of dry-cured pork ham peptides are operative in inflammatory pathways and, as a result, to identify the most promising targets for functional food development. Reported molecular modelling results explained the rationale of their anti-inflammatory activity for the first time. The amino acid sequence of these inhibitory peptides may also form the basis for the design of analogues with therapeutic potential. Further, the multifunctional peptides characterized here may herald an important avenue in food and pharmacological research.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/17/4204/s1>.

**Author Contributions:** S.M.M.-S.: investigation and methodology. H.P.-S. and J.A.G.: molecular modeling calculations. J.A.-A.: conceptualization. S.M.-G.: writing-review and editing the drafted manuscript.

**Funding:** S.M.M.-S. belongs to the "Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud. Universidad Católica de Murcia (UCAM)" and holds an FPU grant (FPU 15/03134) from the Ministry of Education (Spain). This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2017-87974-R), partially supported by the e-infrastructure programme of the Research Council of Norway, and the supercomputer center of UiT - the Arctic University of Norway and by the supercomputing infrastructure of Poznan Supercomputing Center and by the Fundación Séneca with the projects "Jóvenes Líderes en Investigación 20646/JLI/18", from the Programa Regional de Fomento de la Investigación (Plan de Actuación 2018, Región de Murcia, Spain) and by "Ayudas a la realización de proyectos para el desarrollo de investigación científica y técnica por grupos competitivos 20988/PI/18".

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia, (IATA, CSIC, Spain) for identifying the peptides from dry-cured pork ham.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

ACE	Angiotensin I-Converting Enzyme
BP	Bioactive Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
CV	Cardiovascular
CVD	Cardiovascular Disease
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
HA	Hippuric Acid
HHL	Hippuryl Histidyl Leucine
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL-6	Interleukin-6
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
OD	Optic Density
PBS	Phosphate Buffer Saline
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

## References

1. Vanhoutte, P.M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E.H. Endothelial dysfunction and vascular disease—A 30th anniversary update. *Acta Physiol. (Oxf.)* **2017**, *219*, 22–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sehnert, B.; Burkhardt, H.; Wessels, J.T.; Schröder, A.; May, M.J.; Vestweber, D.; Zwerina, J.; Warnatz, K.; Nimmerjahn, F.; Schett, G.; et al. NF- $\kappa$ B inhibitor targeted to activated endothelium demonstrates a critical role of endothelial NF- $\kappa$ B in immune-mediated diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 16556–16561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Solt, L.A.; Madge, L.A.; May, M.J. NEMO-binding domains of both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  regulate I $\kappa$ B kinase complex assembly and classical NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27596–27608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yan, Z.; Deng, P.; Liu, Y. Recent Advances in Protein Kinase Activity Analysis Based on Nanomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Xu, T.; Guo, Y.; Qi, X. Ubiquitination-Mediated Inflammasome Activation during Bacterial Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. De Leo, F.; Panarese, S.; Gallerani, R.; Ceci, L.R. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: Production and implementation of functional food. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 3622–3643. [[CrossRef](#)]
7. Daliri, E.B.; Ofosu, F.K.; Chelliah, R.; Park, M.H.; Kim, J.H.; Oh, D.H. Development of a Soy Protein Hydrolysate with an Antihypertensive Effect. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1496. [[CrossRef](#)]
8. Ben Slama-Ben Salem, R.; Ktari, N.; Bkhairia, I.; Nasri, R.; Mora, L.; Kallel, R.; Hamdi, S.; Jamoussi, K.; Boudaouara, T.; El-Feki, A.; et al. In vitro and in vivo anti-diabetic and anti-hyperlipidemic effects of protein hydrolysates from *Octopus vulgaris* in alloxanic rats. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 952–963. [[CrossRef](#)]
9. Chakrabarti, S.; Guha, S.; Majumder, K. Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients* **2018**, *10*, 1738. [[CrossRef](#)]
10. Escudero, E.; Aristoy, M.C.; Nishimura, H.; Arihara, K.; Toldrá, F. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat. Sci.* **2012**, *91*, 306–311. [[CrossRef](#)]
11. Gallego, M.; Grootaert, C.; Mora, L.; Aristoy, M.C.; Van Camp, J.; Toldrá, F. Transepithelial transport of dry-cured ham peptides with ACE inhibitory activity through a Caco-2 cell monolayer. *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 388–395. [[CrossRef](#)]
12. Martinez-Sanchez, S.M.; Minguela, A.; Prieto-Merino, D.; Zafrilla-Rentero, M.P.; Abellan-Aleman, J.; Montoro-Garcia, S. The Effect of Regular Intake of Dry-Cured Ham Rich in Bioactive Peptides on Inflammation, Platelet and Monocyte Activation Markers in Humans. *Nutrients* **2017**, *9*, 321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Masuyer, G.; Schwager, S.L.; Sturrock, E.D.; Isaac, R.E.; Acharya, K.R. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Seto, S.W.; Chang, D.; Ko, W.M.; Zhou, X.; Kiat, H.; Bensoussan, A.; Lee, S.M.; Hoi, M.P.; Steiner, G.Z.; Liu, J. Sailuotong Prevents Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Induced Injury in EA.hy926 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chen, Y.; Zhang, H.; Mats, L.; Liu, R.; Deng, Z.; Mine, Y.; Tsao, R. Anti-inflammatory Effect and Cellular Uptake Mechanism of Peptides from Common Bean. *J. Agric. Food Chem* **2019**, *67*, 8370–8381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wang, B.; Zhang, Q.; Yao, R.; Liu, X.; Qu, Z. 7,8-Dihydroxyflavone Protects an Endothelial Cell Line from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Damage. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0135345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Guo, S.; Long, M.; Li, X.; Zhu, S.; Zhang, M.; Yang, Z. Curcumin activates autophagy and attenuates oxidative damage in EA.hy926 cells via the Akt/mTOR pathway. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 2187–2193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Alcaraz-Pérez, F.; Mulero, V.; Cayuela, M.L. Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos. *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*, 81. [[CrossRef](#)]
19. Lo, Y.C.; Lin, S.C.; Rospigliosi, C.C.; Conze, D.B.; Wu, C.J.; Ashwell, J.D.; Eliezer, D.; Wu, H. Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO. *Mol. Cell* **2009**, *33*, 602–615. [[CrossRef](#)]
20. Escudero, E.; Mora, L.; Toldrá, F. Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion. *Food Chem.* **2014**, *161*, 305–311. [[CrossRef](#)]
21. Escudero, E.; Mora, L.; Fraser, P.D.; Aristoy, M.C.; Arihara, K.; Toldrá, F. Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham. *J. Proteomics* **2013**, *78*, 499–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yamaguchi, N.; Kawaguchi, K.; Yamamoto, N. Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *620*, 71–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Huang, W.; Chakrabarti, S.; Majumder, K.; Jiang, Y.; Davidge, S.T.; Wu, J. Egg-derived peptide IRW inhibits TNF- $\alpha$ -induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10840–10846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chakrabarti, S.; Wu, J. Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) promote adipocyte differentiation and inhibit inflammation in 3T3-F442A cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gräbner, R.; Till, U.; Heller, R. Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry* **2000**, *40*, 238–244. [[CrossRef](#)]
26. Janssen-Heininger, Y.M.; Poynter, M.E.; Baeuerle, P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1317–1327. [[CrossRef](#)]
27. Escudero, E.; Mora, L.; Fraser, P.D.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chem.* **2013**, *138*, 1282–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Meram, C.; Wu, J. Anti-inflammatory effects of egg yolk livetins ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -livetins) fraction and its enzymatic hydrolysates in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 449–459. [[CrossRef](#)]
29. Wu, W.; Zhang, M.; Ren, Y.; Cai, X.; Yin, Z.; Zhang, X.; Min, T.; Wu, H. Characterization and Immunomodulatory Activity of a Novel Peptide, ECFSTA, from Wheat Germ Globulin. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 5561–5569. [[CrossRef](#)]
30. Ea, C.K.; Deng, L.; Xia, Z.P.; Pineda, G.; Chen, Z.J. Activation of IKK by TNF $\alpha$  requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 245–257. [[CrossRef](#)]
31. Tokunaga, F.; Sakata, S.; Saeki, Y.; Satomi, Y.; Kirisako, T.; Kamei, K.; Nakagawa, T.; Kato, M.; Murata, S.; Yamaoka, S.; et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 123–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chiaravalli, J.; Fontan, E.; Fsihi, H.; Coic, Y.M.; Baleux, F.; Véron, M.; Agou, F. Direct inhibition of NF- $\kappa$ B activation by peptide targeting the NOA ubiquitin binding domain of NEMO. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1163–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Agou, F.; Courtois, G.; Chiaravalli, J.; Baleux, F.; Coïc, Y.M.; Traincard, F.; Israël, A.; Véron, M. Inhibition of NF-kappa B activation by peptides targeting NF-kappa B essential modulator (nemo) oligomerization. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 54248–54257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Hauser, A.S.; Windshügel, B. LEADS-PEP: A Benchmark Data Set for Assessment of Peptide Docking Performance. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 188–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Delano, W.L.; LAM, J.W. PyMOL: A communications tool for computational models. *Am. Chem. Soc.* **2005**, *230*, U1371–U1372.
38. Vincendeau, M.; Hadian, K.; Messias, A.C.; Brenke, J.K.; Halander, J.; Griesbach, R.; Greczmiel, U.; Bertossi, A.; Stehle, R.; Nagel, D.; et al. Inhibition of Canonical NF-κB Signaling by a Small Molecule Targeting NEMO-Ubiquitin Interaction. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 18934. [[CrossRef](#)]
39. Hetényi, C.; van der Spoel, D. Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1447–1450. [[CrossRef](#)]
40. Tapia-Abellán, A.; Angosto-Bazarra, D.; Martínez-Banaclocha, H.; de Torre-Minguela, C.; Cerón-Carrasco, J.P.; Pérez-Sánchez, H.; Arostegui, J.I.; Pelegrin, P. MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 560–564. [[CrossRef](#)]
41. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





**ARTÍCULO 4**

Martínez-Sánchez, S., Domínguez-Perles, R., Montoro-García, S., Gabaldón-Hernández, J.A., Guy, A., Durand, T., Galano, J.M., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A. **Outlining the in vitro Bioaccessibility, Bioavailability and Bioactivity over the Endothelium of *Gracilaria longissima* Oxylipins.** (ENVIADO). *Food & Function*.



# Outlining the *in vitro* Bioaccessibility, Bioavailability and Bioactivity over the Endothelium of *Gracilaria longissima* oxylipins.

Received 00th January 20xx,  
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

Martínez Sánchez, S.,<sup>a,b†</sup> Domínguez-Perles, R.,<sup>c,†,\*</sup> Montoro-García, S.,<sup>a</sup> Gabaldón Hernández J.A.,<sup>b</sup> Guy, A.,<sup>d</sup> Durand. T.,<sup>d</sup> Galano, J.M.,<sup>c</sup> Ferreres, F.,<sup>c</sup> Gil-Izquierdo, A.<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Cultivo Celular, Facultad de Ciencias de la Salud, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

<sup>b</sup> Departamento Tecnología de la Alimentación y Nutrición, UCAM Universidad Católica San Antonio de Murcia, Campus de los Jerónimos s/n, Guadalupe 30107, Murcia, Spain

<sup>c</sup> Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods. Department of Food Science and Technology, CEBAS-CSIC, University Campus of Espinardo – Edif. 25, 30100 Espinardo, Spain.

<sup>d</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 - CNRS, University of Montpellier – ENSCM, Faculty of Pharmacy, Montpellier, France.

## Abstract

**Background:** Powerful bioactive compounds have been described in several species of macroalgae, which are responsible for several health-promoting effects. Phytoprostanes (PhytoPs) and Phytofurans (PhytoFs) are autoxidation products of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, C18:3  $\omega$ 3), one of the most abundant polyunsaturated fatty acids in the membrane of higher plants. They have already demonstrated immunomodulatory and anti-inflammatory activities *in vitro*. The purpose of this study is to explore the bioaccessibility, bioavailability and bioactivity of the oxylipins obtained from the edible red algae *Gracilaria longissima*. **Methods:** The free PhytoPs composition was determined through a recently validated UHPLC-QqQ-MS/MS method. The algae was digested following a standardised digestion method. The characterized fractions were exposed to a Caco-2 cells monolayer assay. Besides, the inflammation response of these prostaglandin-like compounds after intestinal absorption were investigated *in vitro* with human endothelial cells. **Results:** Simulated digestions significantly reduced PhytoPs and PhytoFs concentrations, although permeability through Caco-2 cell monolayer was high. Methanolic extracts of the raw algae impairs expression of ICAM-1 and IL-6 inflammation markers. The bioactive oxylipins correlate with the demonstrated activity in contradictory directions. The existence of multiple affinity-receptors for these compounds, the cross-reactivity for each oxylipin, and the relative concentration of each compound could explain the diverse effects found in the current study. **Conclusions:** These results might indicate that oxylipins display complex pharmacological profiles probably mediated through diverse sites of action and affinity over the endothelium.

**Keywords: Oxylipins; Bioactive Compounds; Bioaccessibility; Bioavailability; Endothelial Dysfunction; Inflammation.**

## Introduction

The sea is a source of a large unexplored diversity of organisms. Concerning macroalgae, almost ten thousand species have been described in the marine environment (Satabili et al., 2012), while only between 1 and 5% is ingested by humans. On the other hand, nowadays, the growing interest of the food industry in functional foods of natural origin is associated to the health benefits noticed relatively to traditional food (Sahidi et al., 2009). In this regard, powerful bioactive compounds have been described in several species of macroalgae, which are responsible for several health-promoting effects (Lordan et al., 2011). Specifically, *Gracilaria longissima* grows on the coast of Spain. It is a red edible seaweed, widely commercialized and ingested (de Almeida et al., 2011). Hence, recently, oxylipins have been suggested as (even partially) responsible for a wide range of biological activities, inducing the biosynthesis of bioactive secondary metabolites, the expression of genes involved in detoxification, and the regulation of the oxidative stress-related mitogen-activated protein kinase pathway (Barbosa et al., 2016).

Regarding plant oxylipins, phytoprostanes (PhytoPs) and phytofurans (PhytoFs) are autoxidation products of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA, C18:3  $\omega$ 3), one of the most abundant polyunsaturated fatty acids in the membrane of higher plants (Mueller et al., 2004). Two regioisomeric series (16-G1- and 9-G1-PhytoPs) are generated depending on the position oxidation the ALA structure (Durand et al., 2009). In turn, G1-

PhytoPs are precursors of A1, B1, D1, E1, F1, dJ1, and L1-PhytoPs, with the latter being the regioisomer of B1-PhytoP (Jahn et al., 2010; Porta et al., 2014). The cellular redox balance produced under oxidative stress, lead to enhanced formation of such plant constitutive prostaglandin-like compounds (Mueller et al., 2004).

Recent studies have revealed that F1-PhytoPs are absorbed at the intestinal level, are present in plasma in a conjugated form, whilst they are excreted in a free form (Karg et al., 2007). Evidence existing has revealed the involvement of E1-PhytoPs in the inhibition of dendritic cell interleukin-12 (IL-12) production and the polarization of the immune response towards T helper type 2 (Th2) *in vitro* (Traidl-Hoffmann et al., 2005), via peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) and the transcriptional nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) (Gilles et al., 2009 and 2015). Similarly, Guttermuth et al. (2007) found that E1 and F1-PhytoPs partially inhibited Th1, as well as the Th2 cytokine production *in vivo* (Guttermuth et al., 2007); while Karg et al. (2007) reported that A1 and dJ1 PhytoPs display anti-inflammatory activity in HEK human cells and RAW264.7 murine macrophages, by down-regulating the NF- $\kappa$ B factor and inhibiting nitric oxide (NO) synthesis. Besides, more recently, it has been noticed that B1-PhytoPs exhibit neuroprotective effects against oxidant injury and promote myelination through PPAR- $\gamma$  activation (Mingheti et al., 2014). These results have encouraged the application of foodstuffs featured by high concentrations of PhytoPs and PhytoFs in the design of new foods providing health benefits.

Before these materials are incorporated as functional ingredients, it is important to set up the impact of the human gastrointestinal (GI) digestion

process on the interest of administering plant oxylipins by diet (Yang et al., 2017). The current study aimed to report the bioaccessibility of PhytoPs and PhytoFs upon an *in vitro* GI digestion of both, hydromethanolic extracts and raw red macroalgae material, providing accurate information on their stability and profile changes. The second objective was to assess the capacity of such extracts to modify gene expression in a model of endothelial dysfunction. At last, resorting to correlation analysis, it was retrieved information on the potential PhytoPs and PhytoFs responsible for the biological activities observed. Results of this study will help better understand the mechanism of action of the different plant oxylipins studied and broaden their application in new functional foods.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemical and reagents

The PhytoPs 9-F1t-PhytoP, 9-epi-9-F1t-PhytoP, ent-16-F1t-PhytoP, ent-16-epi-16-F1t-PhytoP, 9-D1t-PhytoP, 9-epi-9-D1t-PhytoP, 16-B1-PhytoP, 9-L1-PhytoP and the PhytoFs ent-16-(RS)-9-epi-ST- $\Delta$ 14-10-PhytoF, ent-9-(RS)-12-epi-ST- $\Delta$ 10-13-PhytoF, and ent-16-(RS)-13-epi-ST- $\Delta$ 14-9-PhytoF (Table 1), were synthesized according to our published procedures (El Fangour et al., 2004; El Fangour et al., 2005; Pinot et al., 2008; Guy et al., 2015; Cuyamendous et al., 2016; Cuyamendous et al., 2017) and provided by the Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) (Montpellier, France). Hexane was obtained from Panreac (Castellar del Valles, Barcelona, Spain), butylated hydroxyanisole (BHA), and Bis-Tris (bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris (hydroxymethyl) methane) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All LC-MS grade solvents, methanol and acetonitrile, were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Water was treated in a milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, MA, USA). The solid phase extraction (SPE) cartridges used was Strata cartridge (Strata X-AW, 100 mg 3 mL-1) and

were acquired from Phenomenex (Torrance, CA, USA).

### 2.2. Collection of red macroalgae material

The red seaweed *Gracilaria longissima* was acquired from the company "La huerta marina" (Huelva, Spain). The dried macroalgae material was used for the extraction.

### 2.3. Preparation of analytical and digestive extracts of phytosteranes and phytosterols

The oxylipins from *Gracilaria longissima* were extracted and cleaned-up by SPE following the methodology previously described by Pincioli et al. (2017) and Domínguez-Perles et al. (2018). Briefly, 1 g of powdered algae was mixed with 5 mL of methanol (MeOH)-0.1% butylated hydroxyanisole (BHA). The reconstituted samples were passed through a 0.45  $\mu$ m filter (Millipore, MA USA) and immediately analyzed by UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

For the development of the GI digestion, the analytical (hydromethanolic) extract or the raw algae material were digested according to the consensus *in vitro* digestion method reported by Minekus et al. (2014). Briefly, 5 mL of the analytical extract or 5 g of raw *Gracilaria longissima* were mixed with 0.8 or 4 mL of SGF stock electrolyte solution, respectively (Table 2), to obtain a final ratio of food to SGF of 50:50 (v/v) after the addition of other recipients and water. Porcine pepsin (EC 3.4.23.1) was added up to 2000 U mL<sup>-1</sup>, followed by CaCl<sub>2</sub> (0.075 mM). The final pH 3.0 was achieved by adding 1 M HCl. The gastric digestion was developed during 2 h at 37 °C under agitation. In respect to the intestinal digestion phase, 5 parts of gastric chime were mixed with 4 of SIF electrolyte stock solution (Table 2) to obtain a final ratio of gastric chime to SIF of 50:50 (v/v) after the addition of other recipients and water. 1 M NaOH was added to neutralize the pH mixture. Then, porcine pancreatin and bile salts were also added to the

mixture according to its trypsin activity (100 U mL<sup>-1</sup>) and 10 mM, respectively. The intestinal digestion was performed during 2 h at 37 °C. The (i) gastric, (ii) intestinal and (iii) GI digestion resulting samples were frozen immediately at -80 °C and lyophilized. The lyophilized extracts were then dissolved in 2 mL of MeOH/BHA (9.9:0.1, v/w), sonicated for 10 min, and immediately cleaned-up by SPE.

The SPE clean-up was developed using Strata x-Aw cartridges (100 mg 3 mL<sup>-1</sup>), according to the procedure described previously (Medina et al., 2012; Collado-González et al., 2015). The target compounds were eluted with 1-0 mL of MeOH and dried using a SpeedVac concentrator. The dry extracts were reconstituted with 200 µL of ultrapure-water/MeOH (50:50, v/v), sonicated for 10 min, and passed through a 0.45 µm filter (Millipore, MA, USA).

#### 2.4. UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS analysis

Chromatographic separation of PhytoPs and PhytoFs was performed using a UHPLC coupled with a 6460 triple quadrupole-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and an analytical column BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) (Waters, Milford, M.A.) upon the methodology and instrument settings described by Pinciroli et al. (2017) and Domínguez-Perles et al. (2018). The quantification of the PhytoPs and PhytoFs detected in *Gracilaria longissima* was performed using authentic standards according to standard curves freshly prepared each day of analysis in MeOH/distilled-water (50:50, v/v) to facilitate the ionization in the mass spectrometer. Five successive dilutions ¼ (1.000, 0.250, 0.063, 0.016, and 0.004 µM) were analyzed to obtain the calibration curves. The selected reaction monitoring and chemical names were according to the nomenclature system of Taber and are referred in Table 1.

#### 2.5. Cell lines and culture conditions

Human colorectal Caco-2 and endothelial Ea.hy 926 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Cells were grown in DMEM containing 4.5 g/L glucose, supplemented with GlutaMAX™, 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% non-essential amino acids, at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The passage number of the cells used in this study was between 30-35 and 3-8 for the Caco-2 and the Ea.hy926 cell lines, respectively.

#### 2.6 Cell viability.

Toxicity of the analytical extract (up to 50 ng/mL PhytoPs and 20 ng/mL PhytoFs) dissolved in complete medium was tested in Caco-2 cells for 48 h. Exponentially growing cells were seeded into a 96-well plate at a density of 1 × 10<sup>4</sup> cells/well. After 48 h of incubation with the diluted extract, cells were incubated with tetrazolium (MTT) solution at a final concentration of 1 mg/mL for 4 h at 37 °C. The formazan crystals formed in the intact cells were dissolved in 200 µL dimethyl sulfoxide (DMSO) for 30 min and the absorbance was measured in a microplate reader at 570 nm and 620 nm of reference. Results were calculated as cell viability (%) = average optic density (OD) of wells/average OD of control wells

#### 2.7 Transport experiments

For bioavailability and real bioactivity, Caco-2 cells were seeded at a density of 3 × 10<sup>5</sup> cells/well on high throughput screening (HTS)-Transwell®-12 well permeable supports (0.4 µm pore polyester membrane) (Costar, Corning, Birmingham, UK). The culture medium was replaced every 2–3 days and cells were allowed to differentiate for at least 21 days before experiments. Cell monolayer integrity was checked by transepithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2 cells measured by a commercial apparatus (Millicell ERS; Millipore Co., Bedford, MA) employing Ag–AgCl electrodes, according to manufacturer's instructions. The final values are expressed as Ω\*cm<sup>2</sup> on the basis of the following

equation:  $TEER = (R - R_b)A$ , where R is the resistance of filter insert with cells,  $R_b$  is the resistance of the filter alone and A is the growth area of the filter in  $cm^2$ . Only the inserts with a TEER higher than  $600 \Omega \cdot cm^2$  were used for the experiments. Seventy  $\mu L$  of six analytical extract samples and 300  $\mu L$  of six digested extracts (2 gastric, 2 intestinal and 2 GI) were added to the apical chamber.

### 2.8 Endothelial dysfunction model

In order to study the effects that the extracts containing characterized oxylipins produced on EA.hy926 phenotype, cells were seeded in 24-well plates at  $8 \times 10^5$  cells/well in DMEM supplemented with 5% FBS. Cells were treated with 70  $\mu L$  of the analytical extract (per triplicate) for 16 h. Then, 20 ng/mL TNF- $\alpha$  were added for an additional 6 h incubation time.

In addition, the analytical extract after having passed the Caco-2 cell monolayer (basolateral chamber) was also added to endothelial cells, for 16 h (per duplicate). Then, 20 ng/mL TNF- $\alpha$  were added for an additional 6 h incubation time.

### 2.9. Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from EA.hy926 cells using 300  $\mu L$  Trisure (Bioline, Taunton, MA, USA) reagent and Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research Irvine, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA by using Sensifast cDNA™ Synthesis kit (Bioline, Taunton, MA, USA). The mRNA levels of the target genes were quantified by RT-PCR using SensiFAST SYBER Hi-ROX Kit (Bioline, Taunton, MA, USA) in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, 5  $\mu L$  of 1:5 diluted cDNA was added to the qPCR reaction containing 10  $\mu L$  2X SensiFAST Mix and 400 nM of each primer in a total volume of 20  $\mu L$ .

Specific and validated primers for distinct human genes such as actin, intercellular adhesion marker-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion marker-1 (VCAM-1), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), interleukin 6 (IL-6) were used (all from Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). The relative mRNA expression of the genes of interest was represented by:  $2^{-\Delta\Delta CT} = [CT(\text{gene of interest}) - CT(\text{Actin})]_{\text{test}} - [CT(\text{gene of interest}) - CT(\text{Actin})]_{\text{control}}$ .

The relative quantification of gene expression was evaluated by the comparative fold change  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livac et al., 2001). An average value of each target gene after ACTIN normalization at the time point showing highest expression was used as a calibrator to determine the relative levels in the rest of the experimental conditions. All the experiments and qPCR reactions were performed per triplicate.

### 2.9 Statistical analysis

All the extractions and GI digestions were performed in triplicate (n=3) and the data were expressed as the means and the least significant differences (LSD). All statistical tests were performed at a 5% significance level using the SPSS 24.0 software package (LEAD Technologies, Inc., Chicago, USA). All the data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA). The fulfillment of the one-way ANOVA requirements, specifically the normal distribution of the residuals and the homogeneity of variance, was tested by the Kolmogorov–Smirnov (with Lilliefors correction) and Levene test, respectively. When statistical differences were identified, the variables were compared using Tukey's multiple range test.

For the gene expression study, data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three determinations. A Student's t-test was used to compare the differences between the mean of two groups. Statistical analyses were performed with

SPSS 24.0. Statistical significance was considered at p value < 0.05.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Total and individual PhytoPs and PhytoFs composition in *Gracilaria longissima*.

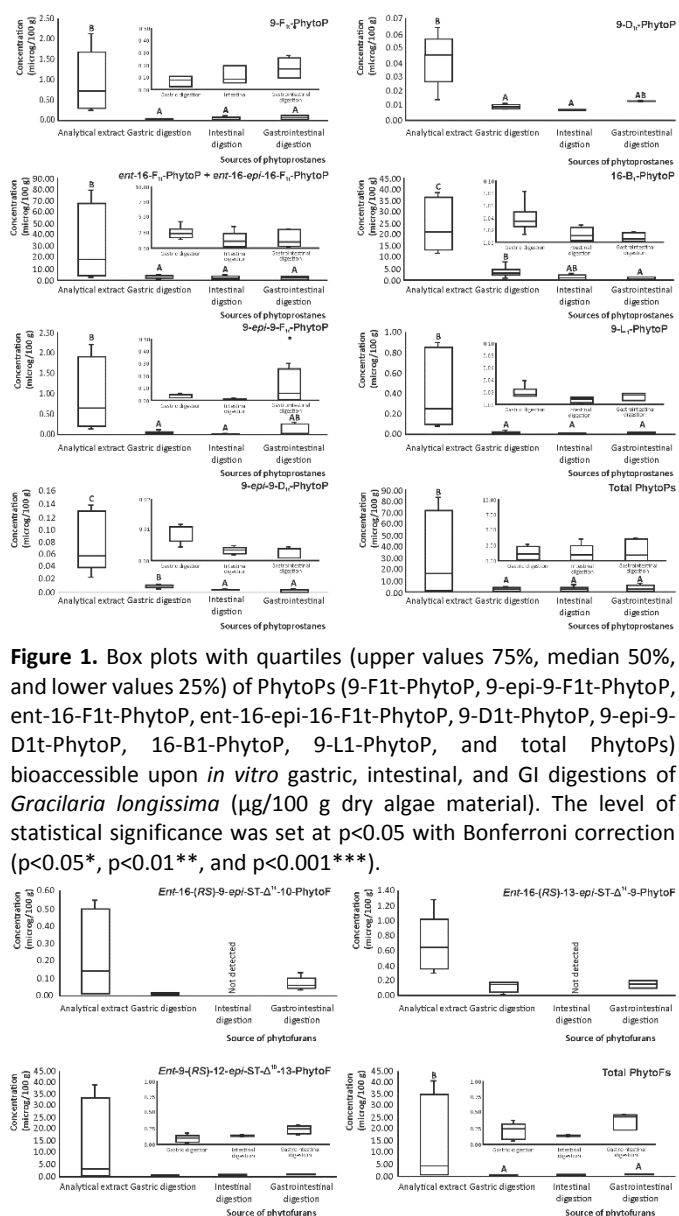
All the characterized PhytoPs and PhytoFs (Table 1) were detected in the analytical (non-digested) extract (Figures 1 and 2, respectively). The most abundant PhytoPs was the Ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP with levels around 18.26 [4.05-67.40] µg/100 g of raw material (Figure 1). In addition, PhytoFs were notoriously lower and the Ent-9-(RS)-12-epi-ST-Δ10-13-PhytoF was found in higher levels 3.49 [0.03-34.20] µg/100 g of raw material (Figure 2).

#### 3.2. Bioaccessibility: Impact of gastrointestinal digestion on the PhytoPs and PhytoFs extracted from *Gracilaria longissima*.

*In vitro* GI digestion (Table 2) strongly broke-down the lipidic compounds in the analytical extract (data not shown). Regarding PhytoPs, a concentration below 0.5 ng/mL was found solely for the Ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP in agreement with its initial higher concentration (data not shown). Whilst, PhytoFs were more sensible to the intestinal attack and none of them were detectable after the GI digestions (data not shown).

When the raw macroalgae material was digested, the PhytoPs and PhytoFs content was significantly reduced (Figures 1-2). However, the total amount of PhytoPs and PhytoFs was slightly higher when raw algae material was GI digested (1.17 µg/100 g and 0.42 µg/100 g of raw material, respectively), compared to the GI digestion of the analytical extract (0.5 ng/mL and undetected, respectively) (data not shown). This fact is probably due to the vegetal wall and other constituents that difficult the accessibility of the enzymes and then protect the

insoluble compounds in the raw material. It is further important to notice that the reduced solubility of oxylipins was also unable to protect them during the intestinal digestion (Figures 1-2). Indeed, the current data confirmed that the addition of bile salts emulsify and solubilize oxylipins. Therefore, the molecular stability of these lipidic compounds under extreme pH and GI digestion was low and that is why the bioactivity assays were further performed with the analytical (non-digested) extract.



**Figure 1.** Box plots with quartiles (upper values 75%, median 50%, and lower values 25%) of PhytoPs (9-F<sub>1t</sub>-PhytoP, 9-epi-9-F<sub>1t</sub>-PhytoP, ent-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP, ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP, 9-D<sub>1t</sub>-PhytoP, 9-epi-9-D<sub>1t</sub>-PhytoP, 16-B<sub>1</sub>-PhytoP, 9-L<sub>1</sub>-PhytoP, and total PhytoPs) bioaccessible upon *in vitro* gastric, intestinal, and GI digestions of *Gracilaria longissima* (µg/100 g dry algae material). The level of statistical significance was set at p<0.05 with Bonferroni correction (p<0.05\*, p<0.01\*\*, and p<0.001\*\*\*).

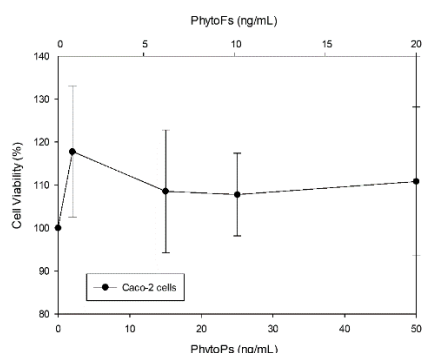
**Figure 2.** Box plots with quartiles (upper values 75%, median 50%, and lower values 25%) of PhytoFs (ent-16-(RS)-9-epi-ST-Δ<sup>10</sup>-10-PhytoF, ent-16-(RS)-13-epi-ST-Δ<sup>14</sup>-9-PhytoF, and total PhytoFs) bioaccessible upon *in vitro* gastric, intestinal, and GI digestions of *Gracilaria longissima* (µg/100 g dry algae material). The level of



statistical significance was set at  $p < 0.05$  with Bonferroni correction ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ , and  $p < 0.001^{***}$ ).

### 3.3. Cytotoxicity of the analytical extract on the epithelium tract.

To investigate the impact of these lipidic compounds on the viability of Caco-2 cells, cytotoxicity of increasing concentrations of the analytical (non-digested) extract was measured by the MTT method. The data revealed that cells were not damaged when exposed up to concentrations of 50 and 20 ng/mL PhytoPs and PhytoFs, respectively (Figure 3).



**Figure 3.** Colorectal Caco-2 cell line viability assay after 48 h treatment. The effect of the total PhytoPs and PhytoFs concentrations on the cell viability is shown.

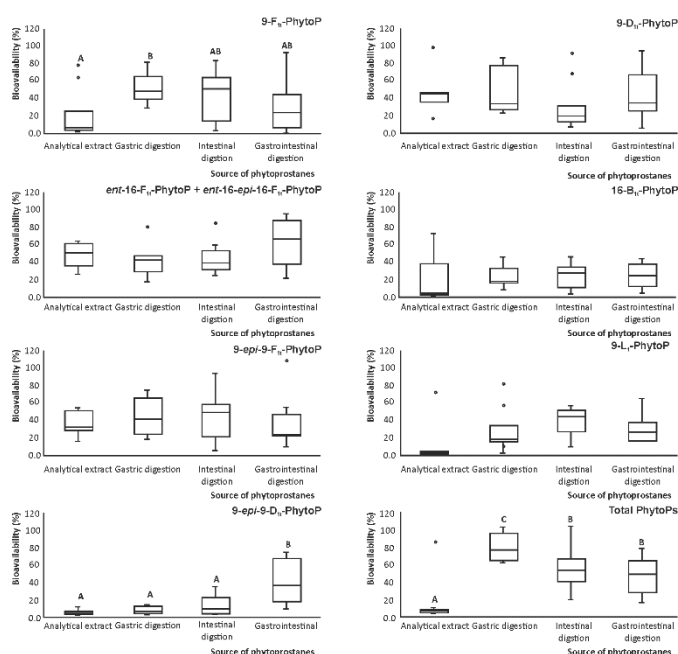
### 3.4. Bioavailability of PhytoPs and PhytoFs of extracts from *Gracilaria longissima*.

On the basis of their overall hydrophobicity, oxylipins are likely permeable. However, the metabolic vulnerability of the analytical and digested extracts (gastric, intestinal and GI) was evaluated across differentiated Caco-2 monolayers after calculating apical (AP) to basolateral (BL) concentrations.

Obviously, to a better understanding of the biological activity, it is essential to first study their absorption and metabolism by Caco-2 cells. The current results showed that oxylipins from the red macroalgae could be absorbed through the

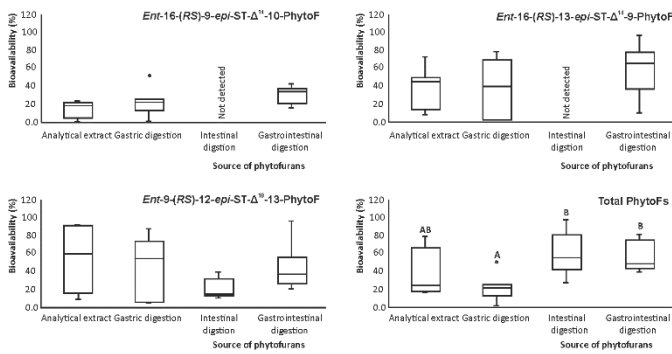
epithelial cell monolayer (Figures 4 and 5) with a better transport/absorption efficiency than other compounds such as phenolic compounds (Hithamani et al., 2017). The ent-16-(RS)-13-epi-ST- $\Delta$ 14-9-PhytoF showed the highest transport/absorption efficiency reaching almost a 50 % and 16-B1-PhytoP the least. No significant difference in transport/absorption efficiency was observed for these oxylipins after the distinct digestions (Figures 4 and 5). Scarce data are available on the application of animal or humans models regarding the bioavailability of oxylipins that are gathered in only two studies (Karg et al., 2007; Barden et al., 2009). These data together with the efficient bioaccessibility of raw algae material (Figure 1 and 2) indicate the potential for partial human oral bioavailability, and thus functionality.

Nonetheless, it should be noted that *in vitro* GI models used here cannot accurately simulate the complex physiochemical and physiological processes that occur within the human GI tract, and therefore it is important to verify the results obtained from *in vitro* models with animal or human feeding studies.



**Figure 4.** Box plots with quartiles (upper values 75%, median 50%, and lower values 25%) of % of PhytoPs (9-F1t-PhytoP, 9-epi-9-F1t-PhytoP, ent-16-F1t-PhytoP, ent-16-epi-16-F1t-PhytoP, 9-D1t-PhytoP, 9-epi-9-D1t-PhytoP, 16-B1-PhytoP, 9-L1-PhytoP, and total PhytoPs) bioavailable upon a Caco-2 cell monolayer. The level of statistical

significance was set at  $p < 0.05$  with Bonferroni correction ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ , and  $p < 0.001^{***}$ ).



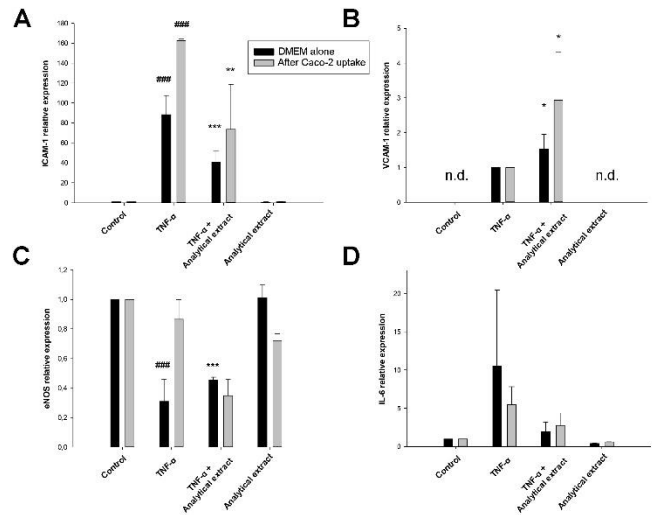
**Figure 5.** Box plots with quartiles (upper values 75%, median 50%, and lower values 25%) of % of PhytoFs (ent-16-(RS)-9-epi-ST- $\Delta$ 14-10-PhytoF, ent-16-(RS)-13-epi-ST- $\Delta$ 14-9-PhytoF, and total PhytoFs) bioavailable upon a Caco-2 cell monolayer. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$  with Bonferroni correction ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ , and  $p < 0.001^{***}$ ).

### 3.5. Bioactivity of the analytical extract in endothelial cells.

Because PhytoPs display some structural homology to human prostanoids such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), anti-inflammatory compounds with notable effects on the vasculature, we aim to investigate whether the analytical extract could mediate an immunomodulatory effect on human endothelial cells. The analytical extract was used directly towards the endothelial cells or following the Caco-2 cells uptake.

For that purpose, human endothelial cells were stimulated with TNF- $\alpha$  to simulate inflammatory conditions. As expected, TNF- $\alpha$  treatment rapidly increased the transcription of ICAM-1, VCAM-1, and IL-6 genes and decreased eNOS expression compared to control conditions (Figure 4). The incubation of cells in the presence of the analytical extract alone did not affect the basal expression of any of the studied markers, even after having crossed the epithelium monolayer (Figure 4). Besides, a decrease of ICAM-1 levels was found ( $p < 0.005$ ) when oxylipins were added to the TNF- $\alpha$  stimulated cells (after the Caco-2 cell assay as well). Similar data were found for the IL-6 expression, whilst a huge SD difficulties the later comparisons. Indeed, the addition of the analytical extract

strongly contribute to the recovery of the basal IL-6 expression although it did not reach significance due to SD. When incubating the stimulated endothelial cells with the analytical extract, a significant increase regarding the VCAM-1 expression was shown. Although, the extract alone did not increase the adhesion marker expression (Figure 6).



**Figure 6.** Relative mRNA expression in Ea.hy926 cells (A) ICAM-1; (B) VCAM-1; (C) eNOS; (D) IL-6 after treatment with the analytical extract and the basolateral content of the transwell. Data shown represent averaged values of five independent experiments. The asterisks \*, \*\* and \*\*\*, indicate statistically significant differences compared to 20 ng/mL TNF- $\alpha$  stimulated cells ( $p < 0.005$ , 0.01 and 0.05, respectively). ### indicate statistically significant differences compared to unstimulated cells (CONTROL) ( $p < 0.05$ ).

Moreover, the bioactivity of the analytical extract was also tested after the addition to differentiated Caco-2 cells (Figure 4). Interestingly, a similar trend was shown for the distinct inflammation and adhesion markers, although the relative expression was slightly higher when the extract after the Caco-2 cells assay was used. For instance, the analytical extract following the Caco-2 cells assay significantly increased the VCAM-1 levels in stimulated cells. Human prostanoids regulate secretion and motility in the GI tract together with homeostasis regulation (Dey et al., 2006). The current data might suggest that oxylipins exert a wide variety of actions in human Caco-2 cells which affect the basolateral composition. However, the mechanisms underlying

such actions remained a mystery until the receptors responsible are identified.

### 3.6 Correlation structure-activity.

For the investigation of the relative potency of each compound, a relationship between the concentration of each oxylipin and their immunomodulatory effects under stimulated conditions was performed.

Similarly to human prostanoids, comparison of the potencies of various PhytoPs revealed that each compound possesses multi-target features (Table 3). For instance, the 9-epi-9-D<sub>11</sub>-PhytoP and Ent-16(RS)-F<sub>11</sub>-PhytoP showed a negative relationship with IL-6 and VCAM-1 levels (all  $p < 0.05$ ), showing thus an anti-inflammation activity profile. However, these two compounds further correlate positively with the eNOS expression and then could also hamper vasorelaxation. Besides, the 9-D<sub>11</sub>-PhytoP, 9-F<sub>11</sub>-PhytoP, 9-L1-PhytoP and Ent-16-(RS)-13-epi-ST-A14-9-PhytoF also favour the NO dysfunction whilst they do not mediate changes in the rest of the studied markers.

It is remarkable and intriguing how these bioactive oxylipins can play such opposite roles. In relation to that, up to nine human G protein-coupled prostanoids receptors with distinct affinities have been described (Hata and Breyer, 2004). Interestingly, the existence of multiple affinity-receptors, the cross-reactivity for each oxylipin, and the relative concentration of each compound could explain the diverse effects found in the current study. Notably, these pharmacological actions occur over the endothelium in functionally opposing directions, as it is also found with human prostanoids such as tromboxane A<sub>2</sub> (vasoconstrictor) and prostacyclin (vasodilator and anti-inflammatory effects). This might indicate that oxylipins display complex pharmacological profiles probably mediated through diverse sites of action and affinity over the endothelium. Hereafter, whether oxylipins display endothelial protective

effects has not been formally demonstrated here, but the current observations support a dose-dependent role over the vasculature.

## 4. Conclusions

**The mass spectrometry technology has allowed the measurement of different oxylipins at the nanomolar level. Our goal was to evaluate the *in vitro* bioaccessibility/bioavailability of oxylipins from a red macroalgae and to provide insight into how these compounds might potentially impact endothelial dysfunction and inflammation conditions. Further, functionally opposing effects in response to the extract are shown making it difficult to attribute the final cellular response to any one particular oxylipin.**

**Thereafter, evidence provided here suggests a major role of bioactive oxylipins, as chemical signals in humans. Nonetheless, we consider that these data are controversial and must be interpreted with caution since the existence of distinct prostanoids receptors and affinities complicates the elucidation of their biological functions. In this regard, modeling approaches could have good potential in complementing the *in vitro* studies.**

## References

- Barbosa, M.; Valentão, P.; Andrade, P.B. (2016). Biologically Active Oxylipins from Enzymatic and Nonenzymatic Routes in Macroalgae. *Mar Drugs*. 14(23), 1-26.
- Collado-González, J.; Medina, S.; Durand, T.; Guy, A.; Galano, J.M.; Torrecillas, A.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. (2015). New UHPLC–QqQ-MS/MS method for quantitative and qualitative determination of free phytoprostanes in foodstuffs of commercial olive and sunflower oils. *Food Chem*. 178, 212–220.
- Cuyamendous, C.; de la Torre, A.; Lee, Y. Y.; Leung, K. S.; Guy, A.; Bultel-Ponce, V.; Galano, J. M.; Lee, J. C. Y.; Oger, C.; Durand, T. (2016). The novelty of phytofurans, isofurans, dihomio-isofurans and neurofurans: Discovery, synthesis and potential application: a review'. *Bioch*. 130, 49-62.
- Cuyamendous, C.; Leung, K. S.; Bultel-Poncé, V.; Guy, A.; Durand, T.; Galano, J. M.; Chung-Yung, L. J.; Oger, C. (2017). Total Synthesis and *In Vivo* Quantitation of Phytofurans Derived from  $\alpha$ -Linolenic Acid. *Eur. J. of Org. Chem*. 2486–2490.

- Durand, T.; Bultel-Poncé, V.; Guy, A.; Berger, S.; Mueller, M. J.; Galano, J.M. (2009). New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. *Lipids*. 44, 875–888.
- Dey I., Lejeune M., Chadee K. (2006) Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol*. 149:611–23.
- El Fangour, S.; Guy, A.; Despres, V.; Vidal, J. P.; Rossi, J. C.; Durand, T. (2004). Total syntheses of the eight diastereoisomers of the syn-anti-synphytoprostanes F1 types I and II. *J. Org. Chem*. 69, 7, 2498–2503.
- El Fangour, S.; Guy, A.; Vidal, J. P.; Rossi, J. C.; Durand, T. (2005). A flexible synthesis of the phytoprostanes B1 Type I and II. *J. Org. Chem*. 70, 3, 989–997.
- Gilles, S.; Mariani, V.; Bryce, M.; Mueller, M.J.; Ring, J.; Jakob, T.; Pastore, S.; Behrendt, H.; Traidl-Hoffmann, C. (2009). Pollen-derived E1-phytoprostanes signal via PPAR-gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms. *J. Immunol*. 182, 6653–6658.
- Gilles, S.; Beck, I.; Lange, S.; Ring, J.; Behrendt, H.; Traidl-Hoffmann, C. (2015). Non-allergenic factors from pollen modulate T helper cell instructing notch ligands on dendritic cells. *World Allergy Organ. J*. 2015, 8.
- Gutermuth, J.; Bewersdorff, M.; Traidl-Hoffmann, C.; Ring, J.; Mueller, M.J.; Behrendt, H.; Jakob, T. (2007). Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo. *J. Allergy Clin. Immunol*. 120, 293–299.
- Guy, A.; Flanagan, S.; Durand, T.; Oger, C.; Galano, J.M. (2015). Facile synthesis of cyclopentenone B1- and L1- type phytoprostanes. *Front Chem*. 3(41), 1-10.
- Hithamani, G., Kizhakayil, D., Srinivasan, K. (2017). Uptake of phenolic compounds from plant foods in human intestinal Caco-2 cells. *J Biosci*. 42(4):603-611.
- Jahn, U.; Galano, J.M.; Durand, T. (2010). A cautionary note on the correct structure assignment of phytoprostanes and the emergence of a new prostane ring system. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids*. 82, 83–86.
- Karg, K.; Dirsch, V.; Vollmar, A.M.; Cracowski, J.-L.; Laporte, F.; Mueller, M.J. (2007). Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition. *Free Radic. Res*. 41, 25–37.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 25, 402–408.
- Lordan, S.; Ross, R. P.; Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs*. 9, 1056–1100.
- Medina, S.; Dominguez-Perles, R.; Gil, J.I.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Martínez Sanz, J.M., Gil-Izquierdo, A. (2012). Ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Comm. Mass Spectrom*. 26(10), 1249–1257.
- Minghetti, L.; Salvi, R.; Lavinia Salvatori, M.; Ajmone-Cat, M.A.; de Nuccio, C.; Visentin, S.; Bultel-Poncé, V.; Oger, C.; Guy, A.; Galano, J.M.; Greco, A.; Bernardo A.; Durand, T. (2014). Nonenzymatic oxygenated metabolites of  $\alpha$ -linolenic acid B1- and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR- $\gamma$  activation. *Free Radic. Biol. Med*. 73, 41–50.
- Mueller, M.J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol*. 7, 441–448.
- Pinot, E.; Guy, A.; Fournial, A.; Balas, L.; Rossi, J. C.; Durand, T. (2008). Total synthesis of the four enantiomerically pure diastereoisomers of the phytoprostanes E1 Type II and of the 15-E2t-isoprostanes. *J. Org. Chem*. 73, 8, 3063–3069.
- Porta, A.; Chiesa, F.; Quaroni, M.; Persico, M.; Moratti, R.; Zanoni, G.; Vidari, G. (2014). A divergent enantioselective synthesis of 9-J1-phytoprostane and 9-A1-phytoprostane methyl ester. *Eur. J. Org. Chem*. 2014, 2111–2119.
- Shahidi, F. (2009). Nutraceutical and functional foods: whole versus processed foods. *Trends Food Sci. Technol*. 20, 376–387
- Stabili, L.; Acquaviva, M.I.; Biandolino, F.; Cavallo, R.A.; De Pascali, S.A.; Fanizzi, F.P.; Narracci, M.; Petrocelli, A.; Cecere, E. (2012). The lipidic extract of the seaweed *Gracilariaopsis longissima* (Rhodophyta, Gracilariales): a potential resource for biotechnological purposes? *New Biotechnol*. 29(3), 443-450.
- Traidl-Hoffmann, C.; Mariani, V.; Hochrein, H.; Karg, K.; Wagner, H.; Ring, J.; Mueller, M.J.; Jakob, T.; Behrendt, H. (2005). Pollen associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J. Exp. Med*. 201, 627–636.
- Yang, C.; Zhang, H.; Liu, R.; Zhu, H.; Zhang, L.; Tsao, R. (2017). Bioaccessibility, Cellular Uptake, and Transport of Astaxanthin Isomers and their Antioxidative Effects in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem*. 65, 10223–10232.

## Conflicts of interest

“There are no conflicts to declare”.

## Acknowledgements

This work was partially funded by the “Fundación Séneca de la Región de Murcia” Grupo de Excelencia (19900/GERM/15) and the projects “Jovenes Líderes en Investigación”(20646/JLI/18) . This work is included in the framework of the collaboration between the Spanish Research Council (CEBAS-CSIC) and CNRS-University of Montpellier by “Projets Internationaux de Cooperation Scientifique (PICS-2015-261141). RDP was sponsored by a Postdoctoral Contract (Juan de la Cierva de Incorporación ICIJ-2015-25373) from the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness of Spain, respectively. S.M.S. belongs to the “Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud. Universidad Católica de Murcia (UCAM)” and holds an FPU grant (FPU 15/03134) from the Ministry of Education (Spain).

**Table 1.** UHPLC/MS/MS parameters for the quantification and confirmation of phytoprostanes and phytofurans in rice

Compound	Retention time (min)	ESI mode	MRM transition ( <i>m/z</i> )
<i>Phytoprostanes</i>			
<i>Ent</i> -16- <i>epi</i> -16- <i>F</i> <sub>1t</sub> -PhytoP <sup>X</sup>	1.583	Negative	327.1 > 283.2 <sup>Z</sup>
		Negative	327.1 > 225.1 <sup>Y</sup>
9- <i>F</i> <sub>1t</sub> -PhytoP	1.631	Negative	327.2 > 273.1
		Negative	327.2 > 171.0
<i>Ent</i> -16- <i>F</i> <sub>1t</sub> -PhytoP <sup>X</sup>	1.712	Negative	327.2 > 283.2
		Negative	327.2 > 225.1
9- <i>epi</i> -9- <i>F</i> <sub>1t</sub> -PhytoP	1.785	Negative	327.2 > 272.8
		Negative	327.2 > 171.0
9- <i>D</i> <sub>1t</sub> -PhytoP	1.791	Negative	325.2 > 307.3
		Negative	325.2 > 134.7
9- <i>epi</i> -9- <i>D</i> <sub>1t</sub> -PhytoP	2.022	Negative	325.2 > 307.2
		Negative	325.2 > 134.9
16- <i>B</i> <sub>1</sub> -PhytoP	2.620	Negative	307.2 > 223.2
		Negative	307.2 > 235.1
9- <i>L</i> <sub>1</sub> -PhytoP	3.079	Negative	307.2 > 185.1
		Negative	307.2 > 196.7
<i>Phytofurans</i>			
<i>Ent</i> -9-( <i>RS</i> )-12- <i>epi</i> -ST- $\Delta^{10}$ -13-PhytoF	0.906	Negative	344.0 > 300.0
		Negative	344.0 > 255.9
<i>Ent</i> -16-( <i>RS</i> )-9- <i>epi</i> -ST- $\Delta^{14}$ -10-PhytoF	1.501	Negative	343.9 > 209.0
		Negative	343.9 > 201.1
<i>Ent</i> -16-( <i>RS</i> )-13- <i>epi</i> -ST- $\Delta^{14}$ -9-PhytoF	1.523	Negative	343.0 > 171.1
		Negative	343.0 > 97.2

<sup>Z</sup> Quantification transition. <sup>Y</sup> confirmation transition. <sup>X</sup> coeluting diastereoisomers quantified together

**Table 2.** Preparation of stock solutions of Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid.

Constituent	Stock concentration		Simulated gastric fluid (SGF, pH 3)		Simulated Intestinal Fluid (SIF, pH 7)	
	g L <sup>-1</sup>	Mol L <sup>-1</sup>	Volume of stock solution (mL)	Concentration in SGF (mmol L <sup>-1</sup> )	Volume of stock solution (mL)	Concentration in SGF (mmol L <sup>-1</sup> )
KCl	37.3	0.50	6.90	6.90	6.80	6.80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68.0	0.50	0.90	0.90	0.80	0.80
NaHCO <sub>3</sub>	84.0	1.00	12.50	25.00	42.50	85.00
NaCl	117.0	2.00	11.80	47.20	9.60	38.40
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30.5	0.15	0.40	0.10	1.10	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48.0	0.50	0.50	0.50	---	---
<i>For pH adjustment</i>						
NaOH	1.0		---	---	---	---
HCl	6.0		1.30	15.60	0.60	8.40

**Table 3.** Correlations Structure Activities for Each Particular Oxylipin.

	ICAM		IL 6		VCAM		eNOS	
	R	p value	R	p value	R	p value	R	p value
9-epi-9-D11-PhytoP	-0,124	N.S.	-0,428	<b>p&lt;0,05</b>	-0,515	<b>p&lt;0,01</b>	-0,675	<b>p&lt;0,001</b>
9-D11-PhytoP	-0,165	N.S.	-0,339	N.S.	-0,537	<b>p&lt;0,01</b>	-0,559	<b>p&lt;0,01</b>
9-F11-PhytoP	-0,008	N.S.	-0,266	N.S.	-0,522	<b>p&lt;0,05</b>	-0,467	<b>p&lt;0,05</b>
9-epi-9-F11-PhytoP	0,214	N.S.	0,069	N.S.	-0,020	N.S.	0,052	N.S.
9-L1-PhytoP	0,032	N.S.	-0,352	N.S.	-0,512	N.S.	-0,546	<b>p&lt;0,05</b>
16-B1-PhytoP	-0,113	N.S.	0,109	N.S.	0,076	N.S.	0,104	N.S.
Ent-16-epi-16-F11-PhytoP + Ent-16-F11-PhytoP	-0,151	N.S.	-0,472	<b>p&lt;0,05</b>	-0,536	<b>p&lt;0,01</b>	-0,724	<b>P&lt;0,001</b>
Ent-9-(RS)-12-epi-ST-A10-13-PhytoF	0,016	N.S.	0,267	N.S.	-0,302	N.S.	0,374	N.S.
Ent-16-(RS)-13-epi-ST-A14-9-PhytoF	-0,135	N.S.	-0,549	<b>p&lt;0,05</b>	-0,001	N.S.	-0,798	<b>P&lt;0,001</b>
Ent-16-(RS)-9-epi-ST-A14-10-PhytoF	-0,241	N.S.	0,269	N.S.	0,278	N.S.	0,351	N.S.

N.S: non significant.





# **IV – RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Biopéptidos del jamón curado.

Los efectos de los BPs derivados de diversos alimentos en el sistema cardiovascular han sido previamente detallados en la introducción de esta Tesis. Como ya se ha descrito anteriormente, los péptidos bien caracterizados son capaces de modular la actividad ECA y renina del sistema RAS, inhibir la inflamación a través de vías poco conocidas, inhibir la DPP-IV o bien alterar la vía del PPAR- $\gamma$ .

Entre estos alimentos, el jamón curado constituye una importante fuente de BPs, generados habitualmente durante el proceso de elaboración del producto (Mora, Fraser et al. 2013). Así, este producto cárnico fue utilizado en un estudio clínico de intervención nutricional en individuos pre-hipertensos, observando que su ingesta diaria no se relacionó con un incremento de la presión arterial (Montoro-García, Zafrilla-Rentero et al. 2017), a pesar del mayor aporte de sal. No obstante, sí que se mejoraron otros parámetros bioquímicos, como la glucosa basal, el colesterol total y las LDL tras consumir el producto de intervención. Por ello, en la presente Tesis Doctoral se planteó evaluar en mayor profundidad, los cambios a nivel celular y molecular que conllevarían a la mejora en la salud cardiovascular de estos individuos. Así pues, los tres primeros capítulos de la presente Tesis indagan en las propiedades biológicas que presentan los BPs del jamón curado *in vivo* e *in vitro*, a la vez que utilizaron técnicas *in silico* para aportar nuevas informaciones estructurales y ahondar en sus posibles mecanismos de acción.

#### 1.1. Biopéptidos del jamón curado. Efectos moleculares *in vivo*.

Tras realizar una exhaustiva revisión bibliográfica sobre los mecanismos implicados en los efectos biológicos de estas pequeñas secuencias peptídicas, se evaluó el efecto derivado de la ingesta regular de este alimento, rico en BPs, sobre las células humanas. Así, en el segundo capítulo de la presente Tesis se describen los cambios fenotípicos en células vasculares, como son las plaquetas y los monocitos, tras el consumo regular de un jamón curado rico en BPs, previamente caracterizados y con efectos observados *in vitro* (Escudero, Toldra et al. 2012, Escudero, Mora et al. 2013). La implicación de monocitos y plaquetas en la

fisiopatología cardiovascular ha sido ampliamente estudiada (Kling, Stucki et al. 2013, Shantsila, Tapp et al. 2014), siendo imprescindibles en el proceso de aterotrombosis. Además, los monocitos también comprometen la respuesta inflamatoria (Passacquale, Vamadevan et al. 2011), y son importantes en los procesos trombóticos asociados con la rotura de placas vulnerables tan características de síndromes coronarios agudos, y con complicaciones clínicas graves como el infarto de miocardio (Mangold, Hofbauer et al. 2019).

En este producto cárnico concreto, la presencia natural de BPs activos fue confirmada en el Instituto de Tecnología Alimentaria (IATA) del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CSIC, Valencia) mediante análisis peptidómico, para el cual se utilizaron técnicas de espectrometría de masas (Gallego, Mora et al. 2016). Como producto de control, se utilizó un jamón cocido con un contenido en sal superior al comercial, ya que el proceso de cocción no produce BPs, y por ello, el contenido en BPs fue indetectable mediante la misma técnica. Un dato reseñable es que ningún otro estudio clínico de intervención nutricional había asociado el consumo regular de BPs de carne, con cambios fenotípicos a nivel celular. Si bien es cierto que otros estudios *in vitro* sí han sugerido posibles mecanismos de acción, como ya se ha comentado en la introducción (Escudero, Mora et al. 2013, Escudero, Mora et al. 2014, Gallego, Aristoy et al. 2014).

Mediante técnicas de citometría de flujo e inmunoensayo, se analizaron los cambios en el estado de activación plaquetaria de voluntarios, tras el consumo regular de jamón curado durante cuatro semanas. La activación plaquetaria produce una degranulación y translocación de la P-selectina (CD62P) a la membrana plasmática externa. Esta degranulación se ha relacionado directamente con condiciones patológicas como la hipertensión, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca y la diabetes (Blann, Nadar et al. 2003). Así, la P-selectina también ha sido propuesta como una nueva diana terapéutica en la enfermedad vascular, ya que bloqueándola se podría minimizar la agregación plaquetaria de manera significativa (Kling, Stucki et al. 2013). Por todo ello, uno de los hallazgos más significativos de este estudio fue que la ingesta regular de jamón curado rico en BPs, se asocia con una disminución en la expresión plaquetaria de este marcador de activación, la P-selectina ( $p < 0.001$ ) (Artículo II, Tabla 4 y Figura 3). Además, los resultados también evidenciaron una reducción de la P-selectina plasmática (Artículo II, Figura 2), incluso tras restar en efecto del consumo de jamón cocido. De manera que estos datos, aunque preliminares, respaldan el papel de los BPs en la modulación de la función plaquetaria *in vivo*. Es importante

mencionar que la capacidad de inhibir la función plaquetaria *ex vivo* ya había sido descrita previamente en presencia de otros compuestos bioactivos, aunque de origen vegetal, y no animal (Stangl, Lorenz et al. 2005), como en este caso. No obstante, ni nuestro estudio *ex vivo* ni los anteriores señalan cómo ocurriría la modulación de la activación plaquetaria, ni qué implicación podría tener este efecto en condiciones patológicas. Por lo tanto, nuestro estudio *ex vivo* ha sido pionero, ya que señala nuevas líneas de investigación sobre posibles efectos de estos BPs de origen alimentario en la función plaquetaria.

Por otro lado, los monocitos también desempeñan un papel sustancial en las ECV, participando activamente en las respuestas inflamatorias y en la regulación del estado trombogénico. En la hipertensión experimental, los monocitos aumentan su adhesión a las integrinas del endotelio (ICAM-1, VCAM-1), a través de sus receptores (ICAM-1R y VCAM-1R) (Wenzel 2019). Además, los monocitos también han sido implicados en procesos fisiológicamente beneficiosos relacionados con la eliminación de material patológico, la angiogénesis y la reparación a través de la unión del factor-1 derivado del estroma (SDF-1) a receptor CXCR4. La gran variedad de las funciones de los monocitos puede atribuirse en parte, a la existencia de diferentes subpoblaciones de monocitos (Mon1, Mon2 y Mon3), y que sólo pueden distinguirse en base a la expresión de proteínas de membrana y derivan en propiedades funcionales específicas (Shantsila, Wrigley et al. 2011). En este sentido, el segundo hallazgo reseñable de la presente Tesis fue que el consumo regular de jamón curado produjo cambios en la expresión de varios marcadores de membrana de monocitos circulantes (Artículo II, Tabla 4 y Figura 3). Así, la expresión de los receptores de la integrina:  $\alpha 4$  (VCAM-1R), y SDF-1 (CXCR4), se incrementaron significativamente en las tres subpoblaciones de monocitos ( $p < 0.05$ ). Investigaciones anteriores a nuestro estudio han descrito que una mayor expresión en monocitos de los marcadores de membrana VCAM-1R y CXCR4, se relaciona con condiciones de salud más favorables, ya que disminuyen en individuos de edad y género similar, pero con cardiopatía isquémica –condiciones patológicas– (Shantsila, Tapp et al. 2014). Ello indicaría de nuevo que, el consumo regular de BPs de jamón curado podría, efectivamente, mejorar el estado fisiológico de los individuos.

Los CD163 y TLR4 son proteínas implicadas en la inmunidad, la eliminación de residuos y el reconocimiento de antígenos (Patten and Shetty 2018). De nuevo, la expresión de TLR4 aumentó en las tres subpoblaciones de monocitos tras la intervención. No obstante, el hecho de que la expresión de membrana del TLR4 sea mayor, no implica forzosamente que se produzca una mayor dimerización y

activación de la señalización del NF- $\kappa$ B. De manera similar, la expresión de CD163 fue mayor después de la intervención en una subpoblación minoritaria, la subpoblación Mon3 (CD14+, CD16++, CCR2-). En cuanto a la expresión de IL6-R, los niveles permanecieron inalterados tras la intervención en la subpoblación clásica Mon1 (CD14++CD16-), pero se redujo significativamente en la subpoblación Mon3, además de observarse una tendencia en la subpoblación no-clásica Mon2 (CD14++CD16+), resultados que de nuevo concuerdan con los descritos en pacientes con patología isquémica (Shantsila, Tapp et al. 2014). El hecho de que los niveles de IL6-R disminuyan como consecuencia de una menor transcripción/expresión proteica, es algo que no se puede comprobar formalmente en este estudio. En cualquier caso, es poco probable que se deba a una mayor unión de IL6 al IL6-R, ya que los niveles plasmáticos del marcador de inflamación, IL-6, disminuyeron significativamente ( $p=0.037$ ) tras el período de consumo de jamón curado (Artículo II, Figura 2). Como conclusión diremos que las presentes observaciones indican de manera evidente, que la ingesta regular de BPs de jamón curado produce cambios en la activación de monocitos y plaquetas, así como una mejora notable del estado inflamatorio. Estos datos son importantes desde el punto de vista clínico, ya que el jamón, lejos de ser un alimento restringido, podría presentar efectos beneficiosos para la salud cardiovascular humana no descritos hasta la fecha.

### 1.2. Biopéptidos del jamón curado. Efectos moleculares *in vitro*.

No obstante, es importante mencionar que los anteriores efectos *in vivo* se produjeron tras el consumo del jamón curado, sin aislar ni purificar los BPs. Es por ello que el siguiente objetivo de la presente Tesis, fue indagar en los mecanismos moleculares de BPs de jamón curado en un contexto celular aislado (*in vitro*). Para ello, se seleccionaron cuatro BPs presentes en el producto cárnico objeto de estudio y con elevada biodisponibilidad y actividad IECA (Escudero, Mora et al. 2013, Gallego, Grootaert et al. 2016), con el objetivo de testarlos en un modelo de disfunción endotelial. Sin embargo, ya se ha comentado que, por su versatilidad estructural, muchos de los BPs con actividad IECA también ejercen un efecto sobre otras vías moleculares, de ahí el término ya mencionado de “péptidos multifuncionales”. Por lo tanto, el objetivo principal de los siguientes ensayos experimentales publicados en el artículo III, fue evaluar los cambios producidos, a nivel celular, tras incubar células humanas con estos BPs aislados.

Así pues, se seleccionaron los siguientes BPs procedentes del jamón curado: KPVAAP (BP1), KAAAATP (BP2), KPGRP (BP3) y AAATP (BP4). Estos BPs

fueron sintetizados químicamente y testados en un modelo de disfunción endotelial optimizado como parte de la presente Tesis. Se utilizó la línea de células endoteliales humanas Ea.hy926, para detectar posibles cambios en mecanismos de acción inflamatorios, oxidativos, apoptóticos y del SRA.

Como ya se ha mencionado, la actividad IECA de estos BPs había sido previamente testada *in vitro*, y para ello se utilizó ECA aislada de conejo. KPVAAP (BP1), KAAATP (BP2) y KPGRP (BP3) habían demostrado una notable  $IC_{50}$  *in vitro* de 12.37, 25.64 y 67.08  $\mu$ M, respectivamente, además de permanecer intactos tras la digestión gastrointestinal (Escudero, Mora et al. 2014). Por otro lado, el BP AAATP (BP4) había demostrado un valor de  $IC_{50}$  de 100  $\mu$ M *in vitro*, siendo por lo tanto el peor inhibidor peptídico de los estudiados. Además, este último BP disminuyó muy eficazmente la presión arterial sistólica tras inyectarse a REH (Escudero, Mora et al. 2013).

Si bien se ha visto que estos BPs permanecen intactos tras la digestión gastrointestinal y son absorbidos por la barrera epitelial, no se puede descartar que se generen nuevos péptidos a partir de éstos, y que siempre pueden contribuir sinérgicamente, a la actividad biológica IECA obtenida *in vitro*. Es más, en un estudio reciente se observó que el BP1 tiene la capacidad de atravesar la barrera de epitelio intestinal intacto, además de degradarse hasta péptidos más pequeños, que también atraviesan la barrera. Estos fragmentos poseen gran capacidad antihipertensiva *in vitro* (Gallego, Grootaert et al. 2016). Es por ello que también podría ser necesario evaluar la bioactividad de los cuatro BPs seleccionados, en el modelo de disfunción endotelial utilizado. Así, se evaluó la capacidad de estos cuatro BPs para interactuar con la ECA humana, utilizando dos aproximaciones, *ex vivo* y mediante *docking molecular*. Tal y como se postuló inicialmente, los BPs 1-4 mostraron actividad IECA en la enzima humana, aunque las  $IC_{50}$  fueron considerablemente mayores que las cuantificadas *in vitro* con la ECA de conejo. Las  $IC_{50}$  estimadas fueron 59.22, <1000, 485 y <1000  $\mu$ M respectivamente (Artículo III, Tabla 1,). Estas discrepancias con los datos de la ECA de conejo podrían deberse a la presencia de otras proteínas en el extracto de lisado celular que afectan a la unión BPs-centro activo. En cualquier caso, en ambos ensayos, los BP1 y BP4 fueron los más y menos eficaces, respectivamente. Mediante simulaciones informáticas de acoplamiento molecular (*molecular docking*), entre la ECA humana y los cuatro BPs, la presente Tesis trata de explicar los valores experimentales observados de  $IC_{50}$ . La modelización molecular mostró que los BP1, BP2 y BP3 se encuentran estabilizados tanto por interacciones de hidrógeno, como por interacciones hidrofóbicas, con al menos un residuo de los

tres sitios activos de la ECA, ello guarda concordancia con el típico modelo de inhibición competitiva (He, Aluko et al. 2014). Los BP1 y BP2 son particularmente hidrofóbicos, y establecieron interacciones con la HIS387 y enlaces de hidrógeno con los residuos TYR360, TYR523, y GLU411, mientras que el BP3 alcanzaba la estabilidad hidrofóbica con los residuos GLU384 y TRP357 y enlaces de hidrógeno formados con TYR360 y GLU411 (Artículo III, Figura 1). Sin embargo, el BP4 sólo estableció enlaces de hidrógeno con los aminoácidos GLU411, HIS353 y TYR523. De manera que la ausencia de estabilización hidrofóbica para el BP4 podría explicar el mayor valor IC<sub>50</sub>. Por otro lado, el BP2 mostró pequeñas áreas de interacción hidrofóbica en comparación con las de BP1 y BP3, que presentaban áreas más voluminosas de grupos hidrofóbicos. Por lo tanto, la estabilidad del BP2 parecería ser comparable a la de la BP4. Además, el captopril, fármaco comercial inhibidor de la ECA, presenta hasta cinco enlaces de hidrógeno con residuos clave en el sitio activo (GLU384, TYR523, y HIS353). Sí que se ha observado que el BP1 ocupaba los subsitios S1 y S2 (cerca del sitio activo) pero no está localizado en su interior, como lo estaría el captopril (Artículo III, Figura 1). Por lo tanto, concluimos que, estructuralmente, los BP son inhibidores no competitivos de la ECA, ya que sus valores estimados de IC<sub>50</sub> son mucho más altos que los obtenidos con captopril. No obstante, cabe destacar que las técnicas de simulación molecular *in silico* actuales, son de especial interés para predecir y comprender los mecanismos de acción de los BP sobre la ECA, al igual que también pueden ser de ayuda para predecir la interacción con nuevas biomoléculas, incluso antes de que se lleven a cabo los ensayos experimentales pertinentes.

Además de la actividad IECA, los BPs derivados de los alimentos muestran una amplia gama de actividades funcionales sobre el sistema cardiovascular. De hecho, gracias a su versatilidad estructural, los péptidos multifuncionales pueden interactuar con más de una diana biológica, por lo que pueden afectar a la vez varias vías de acción, como la producción de NO, el estrés oxidativo y la inflamación. La línea celular Ea.hy926 fue seleccionada como modelo de disfunción endotelial por sus funciones altamente diferenciadas de endotelio vascular humano, como la expresión de citoquinas de inflamación (por ejemplo, IL-6) y marcadores adhesivos (ICAM-1 y VCAM-1) (Vieira, Van Camp et al. 2018). Mediante el uso de un modelo *in vitro* de disfunción endotelial, en la presente Tesis se indagó en los efectos regulatorios observados tras el tratamiento con los BPs, seleccionados en condiciones inflamatorias. Así, las células endoteliales fueron incubadas conjuntamente con TNF- $\alpha$  y BPs. Como era de esperar, el tratamiento con TNF- $\alpha$  aumentó significativamente la expresión transcriptómica



de los marcadores ICAM-1, VCAM-1 e IL-6, disminuyó además la expresión de la eNOS, en comparación con las condiciones control ( $P < 0.05$ ) (Artículo III, Figura 2). Sin embargo, esta situación patológica mostró una mejoría tras el tratamiento con los BPs. La expresión de la eNOS sólo recuperó valores iniciales en presencia de los BP1 y BP2, siendo incluso superiores al control. Este último efecto sobre el sistema nitrinérgico, también podría ser beneficioso para atenuar la disfunción endotelial. En este sentido, se ha descrito una disminución de los marcadores inflamatorios (IL-6 y eNOS) en presencia de péptidos derivados de la leche (VPP e IPP) en RHE mediante técnicas de chips de ARNm (*microarrays*) (Yamaguchi, Kawaguchi et al. 2009). Por otro lado, el péptido IRW derivado del huevo también inhibió el aumento de moléculas adhesivas endoteliales (Huang, Chakrabarti et al. 2010). Los IPP y VPP derivados de la leche también afectaron las interacciones endotelio-monocito mediante una menor expresión de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina (Chakrabarti and Wu 2015). En este último estudio, la expresión de los marcadores ICAM-1 y VCAM-1 también se analizó mediante citometría de flujo y *western-blot*, técnicas utilizadas en la presente Tesis. Como puede verse en la Tabla 2 del Artículo III, estas técnicas moleculares también han confirmado que el tratamiento con TNF- $\alpha$  induce la sobreexpresión de ICAM-1, reduciéndose en presencia de los BP1, BP2 y BP4 cuando se evaluaron mediante citometría de flujo, mientras que cuando se hizo por *western blot* (técnica semicuantitativa), la disminución sólo fue significativa para los BP2, BP3 y BP4. El hecho de que las técnicas de citometría y *western-blot* no proporcionen los mismos datos significativos para los cuatro BPs, puede deberse a que la PCR cuantitativa o PCR en tiempo real (qPCR o RT-PCR), es más sensible que las otras técnicas. Sin embargo, no se detectaron cambios en el marcador de adhesión VCAM-1 mediante análisis transcriptómico, citometría de flujo o *western-blot*. En cuanto a la expresión superficial de las proteínas, su presencia depende en gran medida del método de desprendimiento de las células de la superficie/membrana. Así el VCAM-1 es mucho menos resistente a la tripsina. De hecho, antes de realizar la citometría de flujo, las células fueron despegadas con esta peptidasa, por lo que probablemente, ello condujera a la degradación de la presencia del VCAM-1 en la superficie celular (Grabner, Till et al. 2000). Este hecho podría explicar los resultados diferentes entre la expresión transcriptómica del VCAM-1 y de otras proteínas analizadas.

Existen pocos estudios que señalen al factor de transcripción NF- $\kappa$ B como una diana de los BPs. Efectivamente, mediante la inhibición del NK- $\kappa$ B se liberan menores niveles de marcadores de inflamación y adhesión celular (Chakrabarti and Wu 2015). Los resultados discutidos ahora, guardan una estrecha relación con el estudio clínico realizado en el segundo artículo de la presente Tesis, en el que la

ingesta regular de jamón curado disminuyó significativamente los niveles plasmáticos de IL-6 y P-selectina, pero no alteró la VCAM-1 plasmática (Artículo II, Figura 2). Toda esta evidencia científica apoya la hipótesis de que el efecto de estos BP para modular los marcadores adhesivos y eNOS, podría deberse a su interacción con el factor NF- $\kappa$ B. Por otro lado, el estrés oxidativo y la inflamación son procesos fisiopatológicos estrechamente relacionados, pudiendo cada uno de ellos afectar al otro.

Con el objetivo de estudiar el efecto sobre el estado oxidativo, las células endoteliales fueron estimuladas *in vitro* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de los BPs. Se analizaron los cambios en los marcadores de apoptosis mediante citometría de flujo, la expresión genética de los genes Bax y Bcl-2, así como otros genes relacionados con el metabolismo oxidativo: la eNOS y enzimas antioxidantes como la SOD, CAT y NADPH oxidasa. Además, se llevó a cabo un ensayo para evaluar el nivel de oxidación de proteínas mediante inmunoelectrotransferencia o *western-blot*, utilizando una reacción de derivatización para detectar proteínas carboniladas. Desafortunadamente, el tratamiento con los BPs junto con la estimulación oxidativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no fue lo suficientemente efectivo para reducir la muerte celular (apoptosis) (Tabla S1, Artículo III). No se observaron diferencias significativas en los marcadores de membrana clásicos para la apoptosis como son la Anexina V y el yoduro de propidio, ni en la expresión de los genes reguladores del ciclo celular Bax y Bcl-2, lo cual indica que los mecanismos de apoptosis o muerte celular no son diana directa de estos BPs. Además, y a pesar de que diferentes fracciones péptidicas del extracto de jamón curado han demostrado actividad antioxidante *in vitro* (Escudero, Mora et al. 2013), estos BPs aislados no presentaron actividad antioxidante en células, ya que las enzimas redox permanecieron inalteradas y el ensayo de carbonilación de proteínas, no fue lo suficientemente sensible como para confirmar una reducción del daño oxidativo tras el tratamiento con los BPs.

Por último, como parte de los distintos ensayos *in vitro*, se cuantificó la activación del factor NF- $\kappa$ B en presencia de TNF- $\alpha$  y BPs, mediante un ensayo de luciferasa. Se utilizó un vector, clonado aguas arriba, que contenía el promotor al que se une el NF- $\kappa$ B del gen de luciferasa, junto con otro plásmido de expresión de Renilla luciferasa (de manera constitutiva), que permite determinar la intensidad de fluorescencia media. Así, se observó una notable inhibición en la actividad del NF- $\kappa$ B en presencia de estos BPs. Varios estudios también han demostrado el rol antiinflamatorio de otros péptidos (Meram and Wu 2017, Vieira, Van Camp et al. 2018). Además, algunos estudios anteriores ya apuntaban al NF- $\kappa$ B como posible

diana de los BPs (de Mejia and Dia 2009, Cam and de Mejia 2012). En una búsqueda posterior sobre los mecanismos de unión al NF- $\kappa$ B, se utilizaron simulaciones *in silico* de acoplamiento ciego (*blind docking*) para modelar las interacciones de unión de los cuatro BPs con NEMO, la subunidad reguladora del NF- $\kappa$ B. Estudios recientes han demostrado que la unión directa de NEMO a cadenas lineales de poliubiquitina (poli-Ub), en la vía de señalización del TNF- $\alpha$ , es crucial para el reclutamiento de la quinasa (IKK $\gamma$ ) y la activación de NF- $\kappa$ B (Tokunaga, Sakata et al. 2009, Vincendeau, Hadian et al. 2016), ello nos llevó a probar con la subunidad IKK $\gamma$  que contiene NEMO. Asimismo, la optineurina y otras moléculas derivadas de la antraquinona, han mostrado ser inhibidoras de la activación de la NF- $\kappa$ B inducida por el TNF- $\alpha$ , compitiendo con la región CC2-LZ de NEMO por la poli-Ub ligada al residuo Lys63 (Agou, Courtois et al. 2004, Chiaravalli, Fontan et al. 2011). Además, un péptido específico de 22 residuos, denominado UBI, fue diseñado para interferir con las interfaces en espiral de NEMO (Agou, Courtois et al. 2004). Todo ello nos llevó a ensayar directamente con NEMO, como posible diana de los cuatro BPs utilizados en este trabajo. Mediante la técnica de simulación molecular "*blind docking*" se demostraría el posible mecanismo de acción para el efecto antiinflamatorio que mostraron los cuatro BPs *in vitro*. Es importante destacar que, en esta técnica, no se delimita la zona concreta donde se espera la posible interacción, sino que es el propio programa informático el que establece las zonas de unión. En efecto, los resultados mostraron que los BPs interaccionarían con zonas muy próximas a las de otras pequeñas moléculas inhibidoras, con una unión experimental confirmada (UBI y optineurina). El descubrimiento de la subunidad IKK $\gamma$  como diana directa de los BPs derivados del jamón curado fue algo inesperado y novedoso, y confirma el papel regulador de la vía canónica de activación del NF- $\kappa$ B, previamente analizada mediante transfección y ensayo de luciferasa, con células humanas.

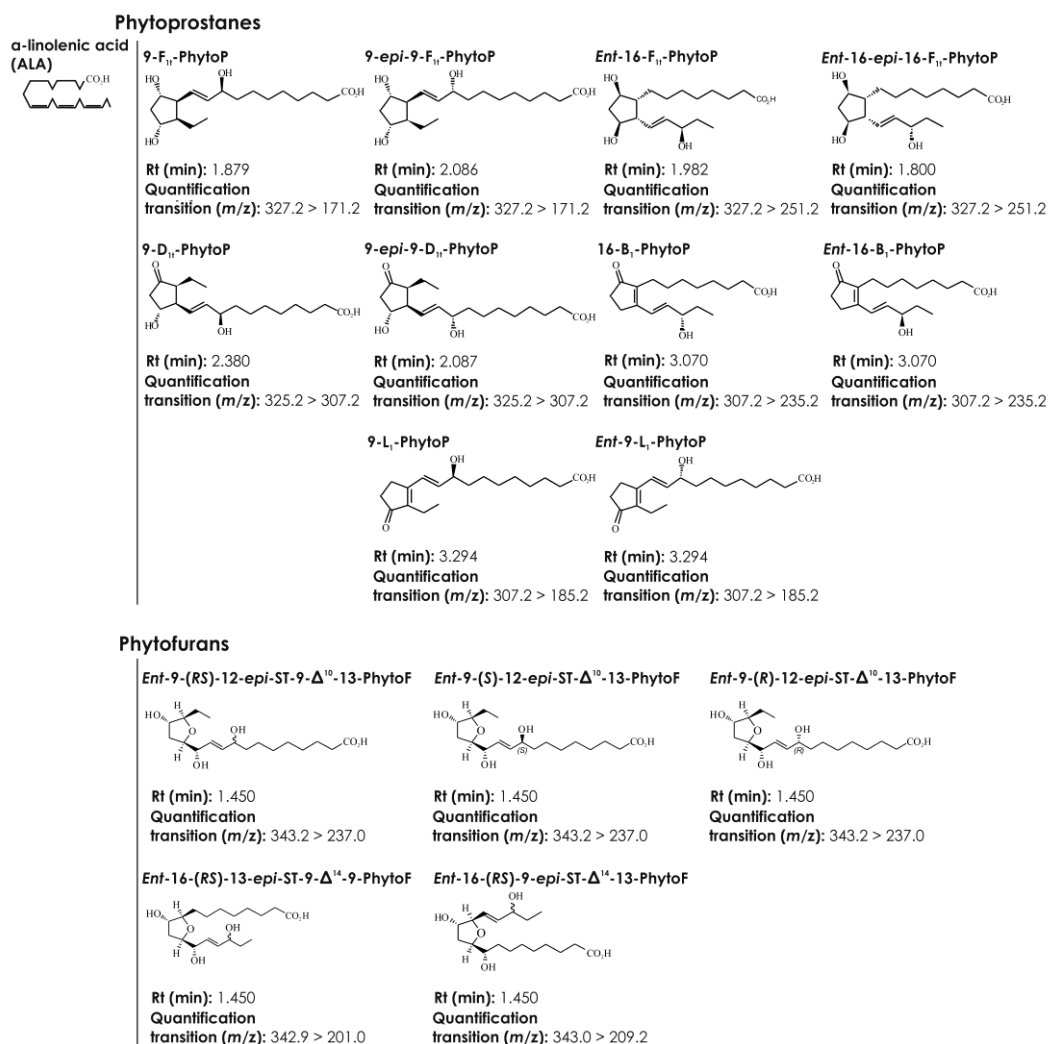
Se ha descrito que la región CCL-Z2 interactúa con cadenas poli-Ub unidas al residuo Lys63 con una afinidad relativamente baja, lo que podría facilitar la disrupción por pequeños compuestos moleculares, como serían los péptidos (Lo, Lin et al. 2009). Por lo tanto, como muestran los estudios *in silico* e *in vitro*, la posibilidad de que los BPs estudiados en la presente Tesis tengan un efecto biológico debido a su interacción con NEMO, antes y/o después de la unión de la poliubiquitina (PDB: 4BWN y 3JSV, respectivamente), es muy probable. Dado que ambas interacciones son posibles, nuestros datos no determinan si estos BPs dificultan la unión de la ubiquitina, compitiendo por el sitio activo, o bien modulando su unión tras la estimulación del TNF- $\alpha$ . Ambas interacciones serían

posibles. No obstante, no debemos olvidar que estos datos deben interpretarse con cautela, ya que la concentración inhibitoria y la biodisponibilidad *in vivo* de los BPs está aún por estudiar, lo cual limita las posibles estrategias terapéuticas clínicas con efecto antiinflamatorio de estos BPs.

## 2. Caracterización de oxilipinas de origen vegetal.

La presente Tesis Doctoral se centra en la caracterización de los efectos moleculares de nuevos compuestos bioactivos sobre el sistema cardiovascular. Tras indagar en las propiedades funcionales de los BPs del jamón curado, decidimos movernos hacia el reino vegetal, dónde aún existen innumerables compuestos bioactivos poco caracterizados. Las oxilipinas constituyen una amplia familia de metabolitos secundarios de origen vegetal, presentan diversas estructuras y actividades biológicas en la planta, y se originan mediante la oxidación de ácidos grasos (ácido linolénico y linoleico). En los últimos años ha aumentado el número de publicaciones en esta familia de metabolitos secundarios, principalmente debido a su analogía estructural con los prostanoïdes de mamíferos (Figura 5).

Así, para responder al segundo objetivo de la presente Tesis, se caracterizaron las oxilipinas presentes en el alga roja comestible *Gracilaria longissima*. Numerosas bioactividades entre ellas antihipertensivas, antiinflamatorias y antimicrobianas habían sido descritas en este género de algas, rico en una gran variedad de compuestos como carotenoides, terpenoides, xantofilas, clorofila, vitaminas, ácidos grasos saturados y poliinsaturados, aminoácidos, acetogeninas, antioxidantes como polifenoles, alcaloides, compuestos halogenados y polisacáridos (de Almeida, Falcao et al. 2011). Pero aún no se habían indagado en la composición de estos isoprostanoides de origen vegetal de esta alga roja. Además, hemos querido caracterizar compuestos con una estructura química muy distinta (BPs *vs.* Oxilipinas) con el objetivo de confirmar la utilidad de nuestro modelo *in vitro* de disfunción endotelial.



**Figura 5.** Relación de FitoProstanos y FitoFuranos caracterizados en el alga roja *Gracilaria longissima* en la presente tesis.

### 2.1. Biodisponibilidad de oxilipinas del alga *Gracilaria longissima*.

La extracción de oxilipinas se realizó siguiendo la metodología empleada por Barbosa y col. (Barbosa, Collado-Gonzalez et al. 2015). Posteriormente, se evaluó la bioaccesibilidad de estos lípidos bioactivos, tanto en el extracto hidrometanólico como en el material vegetal crudo. Para ello, los extractos y alga liofilizada se sometieron a un método *in vitro* de digestión ampliamente utilizado en la comunidad científica (Minekus, Almgier et al. 2014).

Un total de siete FitoPs y tres FitoFs fueron detectados en el extracto analítico mediante el análisis de espectrometría de masas (UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS). Además, se pudieron determinar sus concentraciones por peso seco de materia vegetal. El FitoP más abundante en el extracto hidrometanólico sin digerir fue el estereoisómero Ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP con niveles de 18.26 [4.05-67.40] µg/100 g de alga seca (Artículo 4, Figura 1). Los niveles de FitoFs fueron notablemente más bajos, el Ent-9-(RS)-12-epi-ST-Δ10-13-PhytoF tan sólo llegó a niveles de 3.49 [0.03-34.20] µg/100 g de alga seca (Artículo 4, Figura 2).

Posteriormente, llevaron a cabo tres tipos de digestiones: gástrica, intestinal y gastrointestinal (GI) por separado, con el objetivo de analizar el impacto de cada parte del sistema digestivo en estos compuestos. Ello se realizó sobre el extracto hidrometanólico y sobre el alga seca. Observamos entonces que la digestión GI *in vitro* (Artículo 4, Tabla 2) descompuso fuertemente estos compuestos lipídicos en el extracto analítico. En relación con los FitoPs, la digestión GI del extracto produjo una concentración por debajo de 0.5 ng/mL para el Ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP, pese a ser el más abundante inicialmente. Mientras que los FitoFs fueron más sensibles al ataque intestinal y ninguno de ellos pudo ser detectado después de la digestión GI del extracto analítico. Por otra parte, cuando se realizó la digestión del alga cruda, los valores cuantificados fueron mayores que para el extracto hidrometanólico (Artículo 4, Figuras 1 y 2). El 9-epi-9-D<sub>1t</sub>-PhytoP y 9-D<sub>1t</sub>-PhytoP fueron completamente eliminados tras la digestión de esta alga rodófito. Mientras que, los (R,S) Ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP, 16-B<sub>1t</sub>-PhytoP y 9-L<sub>1t</sub>-PhytoP permanecieron después de la digestión GI, aunque en menor proporción. De manera que la cantidad total de FitoPs y FitoFs después de la digestión GI fue ligeramente mayor cuando se partió el material vegetal (1.17 µg/100 g y 0.42 µg/100 g de materia prima, respectivamente), en comparación con la digestión GI del extracto hidrometanólico (0.5 ng/mL e indetectable, respectivamente). Este hecho se debe probablemente a la existencia de una pared vegetal y otros componentes que dificultan la accesibilidad de las enzimas y, por lo tanto, protegen los compuestos insolubles en el alga seca. Además, es importante mencionar que la solubilidad de las oxilipinas es reducida (compuestos hidrofílicos), aunque este hecho tampoco pudo protegerlas durante la digestión intestinal (Artículo 4, Figuras 1-2). De hecho, los datos actuales confirman que la adición de sales biliares aumenta la solubilización de las oxilipinas y favorece su digestión. Por lo tanto, la estabilidad molecular de estos compuestos lipídicos bajo un pH y una digestión GI extremos fue relativamente baja. Por su mayor

contenido en oxilipinas, los ensayos de bioactividad se realizaron con el extracto analítico hidrometanólico (no digerido).

Debido a su carácter lipídico, las oxilipinas son muy permeables a la membrana epitelial intestinal. Para comprobarlo, la vulnerabilidad metabólica de los extractos analíticos y digeridos (gástricos, intestinales y GI) se evaluó tras pasar por una monocapa diferenciada de células colorectales Caco-2. Los resultados obtenidos mostraron que las oxilipinas podían ser absorbidas a través de la monocapa de células epiteliales de manera muy eficiente (Artículo 4, Figuras 4 y 5), y la eficiencia de transporte/absorción era relativamente alta en comparación con otros compuestos lipídicos como los compuestos fenólicos (Hithamani, Kizhakayil et al. 2017). Los Ent-16-epi-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP, Ent-16-F<sub>1t</sub>-PhytoP y ent-16-(RS)-13-epi-ST- $\Delta$ 14-9-PhytoF mostraron la mayor eficiencia de transporte/absorción mientras que el 16-B1-PhytoP, la menor. No se observó ninguna diferencia significativa en la eficiencia de transporte/absorción de estas oxilipinas después de las distintas digestiones. Se disponen de escasos datos sobre la aplicación de modelos animales o humanos en relación con la biodisponibilidad de las oxilipinas, que sólo han sido recogidos en dos estudios (Karg et al., 2007; Barden et al., 2009). De manera que, la biodisponibilidad de los FitoPs fue alta, con alrededor del 50% de la dosis ingerida absorbida por células intestinales (digestión GI). Estos datos, junto con la bioaccesibilidad del alga cruda (Artículo 4, Figuras 1 y 2), indican el potencial de biodisponibilidad oral humana parcial y, por tanto, de potencial funcionalidad.

## 2.2 Bioactividad en células endoteliales humanas Ea.hy926

Como ya se ha descrito en la introducción, los FitoPs muestran una elevada homología estructural con los prostanoideos humanos como por ejemplo la PGE<sub>2</sub>, compuestos antiinflamatorios con notables efectos en la vasculatura. Es por ello por lo que nos propusimos indagar si el extracto analítico (no digerido) podría desempeñar un efecto inmunomodulador en células endoteliales humanas. El extracto analítico se utilizó directamente sobre las células endoteliales, aunque también se utilizaron los extractos tras ser absorbidos por las células Caco-2 (zona basolateral).

Así, las células endoteliales humanas se estimularon con TNF- $\alpha$  para simular condiciones inflamatorias (Artículo 4, Figura 6). La incubación de las células en presencia del extracto analítico no afectó la expresión basal de ninguno de los marcadores de disfunción estudiados, ni tampoco incubando con el extracto después de haber cruzado la monocapa del epitelio. Sin embargo, cuando se añadieron oxilipinas a las células estimuladas, se encontró una disminución de los

niveles de ICAM-1 ( $p < 0.005$ ) (incluso tras pasar por las células Caco-2). La expresión de IL-6 también disminuyó en presencia de extracto, aunque la desviación estándar dificultó las comparaciones posteriores. De hecho, la adición del extracto analítico contribuyó fuertemente a la recuperación de la expresión basal de IL-6 aunque no alcanzó la significación debido a la gran desviación estándar (Artículo 4, Figura 6). Al incubar las células endoteliales estimuladas con el extracto analítico, se observó también un aumento significativo de la expresión de VCAM-1. Sin embargo, el extracto por sí solo no aumentó la expresión del marcador de adhesión. Además, antes/después de ser absorbidos por las células Caco-2, la combinación entre TNF- $\alpha$  y el extracto analítico aumentó significativamente los niveles de VCAM-1.

Como ya se ha comentado, la bioactividad del extracto también fue testada después de ser absorbidas por el epitelio intestinal diferenciado. Curiosamente, se mostró una tendencia similar para los marcadores de inflamación y adhesión después de pasar el extracto a través de células Caco-2, aunque la expresión relativa fue ligeramente superior, esto ocurría pese a que los extractos digeridos presentaban menores cantidades de los distintos tipos de oxilipinas. Está bien descrito que los prostanoides humanos regulan la secreción y la motilidad en el tracto gastrointestinal (Dei et al., 2006) junto con la regulación de la homeostasis. De manera que los datos actuales podrían también sugerir que las oxilipinas vegetales ejercen una amplia variedad de acciones sobre las células humanas. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a dichas acciones seguirán siendo un misterio hasta que se identifiquen los receptores responsables.

Por último, se realizó una correlación entre la concentración de cada compuesto y sus efectos inmunomoduladores en condiciones inflamatorias. Este análisis estadístico permitió investigar la potencia relativa de cada compuesto por separado.

De manera similar a los prostanoides humanos, la comparación de las potencias de varios FitoPs reveló que cada compuesto posee características multifuncionales (Artículo 4, Tabla 3). Por ejemplo, el 9-epi-9-D<sub>IT</sub>-PhytoP y el Ent-16(RS)-F<sub>IT</sub>-PhytoP mostraron una correlación negativa con los niveles de IL-6 y VCAM-1 (todos  $p < 0.05$ ), mostrando así un perfil de actividad anti-inflamatoria. Sin embargo, estos dos compuestos se correlacionan positivamente con la expresión de eNOS y, por lo tanto, también podrían obstaculizar la vaso-relajación. Además, los compuestos 9-D<sub>IT</sub>-PhytoP, 9-F11-PhytoP, 9-L1-PhytoP y Ent-16-(RS)-13-epi-ST-A14-9-PhytoF también favorecen la disfunción del NO mientras que no se observaron cambios en el resto de los marcadores estudiados.



En relación con esto, se han encontrado hasta nueve receptores de prostanoïdes humanos acoplados a la proteïna G con distintas afinidades (Hata and Breyer 2004). Curiosamente, la existencia de múltiples receptores con una afinidad variable, la reactividad cruzada para cada oxilipina y la concentración relativa de cada compuesto podrían explicar los diversos efectos encontrados en el presente estudio. Cabe destacar que estas acciones farmacológicas se producen sobre el endotelio en direcciones funcionalmente opuestas, como también se encuentra en los prostanoïdes humanos como el tromboxano A<sub>2</sub> (vasoconstrictor) y la prostaciclina (efectos vasodilatadores y antiinflamatorios). Esto podría indicar que las oxilipinas muestran perfiles farmacológicos complejos probablemente mediados por diversos sitios de acción y afinidad sobre el endotelio. No se ha demostrado aquí formalmente si las oxilipinas tienen efectos protectores del endotelio, pero las observaciones actuales apoyarían un papel dependiente de la dosis sobre la vasculatura. Para profundizar en ello, convendría realizar estudios *in vitro* con FitoPs y FitoFs sintetizados químicamente y determinar si existe una relación dosis-respuesta.

A modo de conclusión, podemos afirmar que los compuestos bioactivos presentan efectos en el organismo y propiedades potencialmente beneficiosas para la salud humana (Halliwell y Gutteridge, 2007). Efectivamente, son más que nutrientes propiamente dichos porque no son esenciales y tampoco presentan valores recomendados de ingesta diaria (Gibney et al., 2009; Lanham-New et al., 2010). Entre los compuestos ampliamente estudiados estarían los polifenoles y esteroides de origen vegetal, así como los lactotripéptidos de origen animal (Rangel-Huerta et al., 2015, Aihara et al., 2005).

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios científicos y patentes, todavía hay pocos productos comercializables enriquecidos con otros compuestos bioactivos distintos de los polifenoles y esteroides vegetales. La comercialización de este tipo de productos funcionales debe pasar antes por varias regulaciones, que demuestren que son seguros y que efectivamente presentan los beneficios de salud atribuidos. En la presente Tesis doctoral hemos estudiado las propiedades de compuestos más novedosos como son los péptidos y las oxilipinas, demostrando así su prometedor uso como ingredientes bioactivos de alimentos. Estudios como éste son fundamentales para el desarrollo de nuevos productos antes de que sean lanzados al mercado. Ello da buena cuenta de la aplicabilidad práctica de esta Tesis.



# **V-CONCLUSIONES**



## V - CONCLUSIONES

1. La ingesta regular de jamón curado rico en BPs en individuos prehipertensos produjo una menor activación plaquetaria cuantificada por una disminución en los niveles de P-selectina de membrana y soluble. Esta ingesta también produjo cambios en el fenotipo de los monocitos, favoreciendo un perfil menos trombogénico. Y, por último, la ingesta de jamón curado rico en BPs produjo una disminución de marcadores de inflamación como la Il-6 plasmática.
2. Los cuatro BPs derivados del jamón curado estudiados en esta Tesis poseen actividad IECA humana testada *ex vivo*. Mediante datos experimentales e *in silico*, se concluye que esta inhibición es de tipo no competitivo.
3. El tratamiento con BPs disminuyó la expresión transcripcional de marcadores de adhesión celular ICAM-1, VCAM-1, y de inflamación IL-6, así como aumentó la expresión de eNOS en un modelo de disfunción endotelial *in vitro*. El tratamiento con BPs disminuyó la expresión de la proteína de adhesión celular ICAM-1. El tratamiento con BPs no modifica la expresión de enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, NOS en condiciones oxidativas, pero sí disminuye ligeramente la oxidación de proteínas. Los BPs no parecen inferir en mecanismos de apoptosis como es la expresión de los genes apoptóticos Bax y Bcl2
4. Estudios de *blind-docking* indicarían que los BPs poseen la capacidad de interactuar con NEMO, la unidad reguladora del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el sitio de unión a ubiquitina, del mismo modo que otros compuestos inhibidores ya testados experimentalmente. La actividad del NF- $\kappa$ B *in vitro* también se vio disminuida en presencia de los BPs.

5. Se ha caracterizado la presencia de 10 oxilipinas entre ellas Fitoprostanos y Fitofuranos en el alga roja *Gracilaria longissima* mediante tecnología de espectrometría de masas.
6. Tras digestiones gástricas, intestinales y gastrointestinales del material vegetal, la cantidad de estas oxilipinas se vio drásticamente disminuida. Aun así, estos compuestos presentaron una buena permeabilidad a través del epitelio de células Caco-2.
7. Las oxilipinas presentes en el alga roja *Gracilaria longissima* actuarían como moduladores de la disfunción endotelial y la inflamación. A modo general, los presentes datos aportan evidencia científica sobre las potenciales funciones biológicas que desempeñarían estos prostanoides vegetales en el organismo humano.

## **VI – LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN**





## VI-LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.

En el estudio clínico, las diferencias en los parámetros moleculares determinados mediante citometría de flujo, sólo se mostraron tras el período de intervención. Sin embargo, se analizaron marcadores plasmáticos tras la ingesta de ambos productos cárnicos, lo que permitió una estimación válida del efecto de la ingesta de jamón curado. Es importante mencionar que los voluntarios tomaron menos sal durante la ingesta de jamón cocido (1 g/día menos), en comparación con el período de intervención. El mayor consumo de sal con el producto de intervención podría enmascarar el efecto beneficioso sobre la presión arterial de los BPs, aunque es difícil de demostrar. Además, el efecto del consumo de jamón curado sobre el fenotipo de plaquetas y monocitos no puede atribuirse directamente a los BPs presentes en el jamón curado dado que la carne presenta muchos otros componentes nutricionales. Sin embargo, es importante destacar la amplia gama de péptidos secuenciados presentes en el jamón curado, y ausentes en el producto control. No se ha llegado a determinar la cantidad ideal de BPs ingeridos para producir efectos clínicos cuantificables. Así como, tampoco se han caracterizado cuantitativamente los BPs de este alimento potencialmente funcional.

De igual modo, es importante mencionar que el trabajo *in vitro* no intenta usar niveles de alimentación alcanzables de péptidos bioactivos (300  $\mu$ M), sino que proporciona las herramientas conceptuales y operativas para la investigación de los sitios de acción de los BPs en el contexto de los mecanismos patológicos inflamatorios. El estudio puede conducir a una mayor comprensión de los efectos de los BPs derivados de los alimentos como inhibidores de la ECA. De este modo, quedan abiertas futuras líneas de investigación para determinar tanto la biodisponibilidad de los BPs como las concentraciones necesarias *in vivo* para alcanzar un efecto clínico observable. También, habría que incidir en la elucidación de sus efectos en otros sistemas celulares, como el metabolismo de la glucosa y de la grasa, con relevancia para el sistema cardiovascular.

Con respecto a las oxilipinas del alga roja *Gracilaria longissima* consideramos que estos datos son controvertidos y deben interpretarse con cautela, ya que la existencia de distintos receptores de prostanoïdes y afinidades complica el esclarecimiento de sus funciones biológicas. En este sentido, los enfoques de modelización podrían tener un buen potencial para complementar los estudios in

vitro. En futuras investigaciones propondremos enfoques bioinformáticos para buscar el mecanismo de interacción específico de cada oxilipina descrita con sus posibles receptores.

## **VII – REFERENCIAS**



**REFERENCIAS**

Agou, F., G. Courtois, J. Chiaravalli, F. Baleux, Y. M. Coic, F. Traincard, A. Israel and M. Veron (2004). "Inhibition of NF-kappa B activation by peptides targeting NF-kappa B essential modulator (NEMO) oligomerization." Journal of Biological Chemistry **279**(52): 54248-54257.

Ahn, C. B., Y. S. Cho and J. Y. Je (2015). "Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate." Food Chemistry **168**: 151-156.

Aihara, K., O. Kajimoto, H. Hirata, R. Takahashi and Y. Nakamura (2005). "Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension." Journal of the American College of Nutrition **24**(4): 257-265.

Aleman, J. A., M. P. Z. Rentero, S. Montoro-Garcia, J. Mulero, A. P. Garrido, M. Leal, L. Guerrero, E. Ramos and L. M. Ruilope (2016). "Adherence to the "Mediterranean Diet" in Spain and Its Relationship with Cardiovascular Risk (DIMERICA Study)." Nutrients **8**(11).

Aluko, R. E. (2019). "Food protein-derived renin-inhibitory peptides: in vitro and in vivo properties." J Food Biochem **43**(1): e12648.

Balijepalli, A. S., A. T. Comstock, X. Wang, G. C. Jensen, M. B. Hershenson, M. A. Zacharek, U. S. Sajjan and M. E. Meyerhoff (2015). "Enhancement of Inducible Nitric Oxide Synthase Activity by Low Molecular Weight Peptides Derived from Protamine: A Potential Therapy for Chronic Rhinosinusitis." Molecular Pharmaceutics **12**(7): 2396-2405.

Ballard, K. D., R. S. Bruno, R. L. Seip, E. E. Quann, B. M. Volk, D. J. Freidenreich, D. M. Kawiecki, B. R. Kupchak, M. Y. Chung, W. J. Kraemer and J. S. Volek (2009). "Acute ingestion of a novel whey-derived peptide improves vascular endothelial responses in healthy individuals: a randomized, placebo controlled trial." Nutrition Journal **8**.

Ballard, K. D., B. R. Kupchak, B. M. Volk, E. Mah, A. Shkreta, C. Liptak, A. S. Ptolemy, M. S. Kellogg, R. S. Bruno, R. L. Seip, C. M. Maresh, W. J. Kraemer and J. S. Volek (2013). "Acute effects of ingestion of a novel whey-derived extract on vascular endothelial function in overweight, middle-aged men and women." British Journal of Nutrition **109**(5): 882-893.

Bao, Z. and Y. Chi (2016). "In Vitro and In Vivo Assessment of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Fermented Soybean Milk by *Lactobacillus casei* Strains." Current Microbiology **73**(2): 214-219.

Barbosa, M., J. Collado-Gonzalez, P. B. Andrade, F. Ferreres, P. Valentao, J.-M. Galano, T. Durand and A. Gil-Izquierdo (2015). "Nonenzymatic alpha-Linolenic Acid Derivatives from the Sea: Macroalgae as Novel Sources of Phytosterols." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(28): 6466-6474.

Barden, A. E., K. D. Croft, T. Durand, A. Guy, M. J. Mueller and T. A. Mori (2009). "Flaxseed Oil Supplementation Increases Plasma F-1-Phytosterols in Healthy Men." Journal of Nutrition **139**(10): 1890-1895.

Bautista-Exposito, S., E. Penas, J. Frias and C. Martinez-Villaluenga (2019). "Pilot-scale produced fermented lentil protects against t-BHP-triggered oxidative stress by activation of Nrf2 dependent on SAPK/JNK phosphorylation." Food Chemistry **274**: 750-759.

Beltran-Barrientos, L. M., A. Hernandez-Mendoza, A. F. Gonzalez-Cordova, H. Astiazaran-Garcia, J. Esparza-Romero and B. Vallejo-Cordoba (2018). "Mechanistic Pathways Underlying the Antihypertensive Effect of Fermented Milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 in Spontaneously Hypertensive Rats." Nutrients **10**(3): 15.

Benavente-Garcia, O. and J. Castillo (2008). "Update on uses and properties of Citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(15): 6185-6205.

Bertoluci, M. C. and V. Z. Rocha (2017). "Cardiovascular risk assessment in patients with diabetes (vol 9, 25, 2017)." Diabetology & Metabolic Syndrome **9**.

Blann, A. D., S. K. Nadar and G. Y. H. Lip (2003). "The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease." European Heart Journal **24**(24): 2166-2179.

Boachie, R. T., F. L. Okoro, K. Imai, L. Sun, S. O. Elom, J. O. Nwankwo, C. E. C. C. Ejike and C. C. Udenigwe (2019). "Enzymatic release of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (gliptins) from pigeon pea (*Cajanus cajan*) nutrient reservoir proteins: In silico and in vitro assessments." Journal of Food Biochemistry.

Boschin, G., G. M. Scigliuolo, D. Resta and A. Arnoldi (2014). "ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes." Food Chemistry **145**: 34-40.

Cadee, J. A., C. Y. Chang, C. W. Chen, C. N. Huang, S. L. Chen and C. K. Wang (2007). "Bovine casein hydrolysate (C12 Peptide) reduces blood pressure in prehypertensive subjects." American Journal of Hypertension **20**(1): 1-5.

Cam, A. and E. G. de Mejia (2012). "RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation in human macrophages through interaction with the  $\alpha$  V  $\beta$  3 integrin." Molecular Nutrition & Food Research **56**(10): 1569-1581.

Candari, C. J. (2017). Assessing the economic costs of unhealthy diets and low physical activity: an evidence review and proposed framework. Ellen Nolte. J. Cylus, World Health Organisation.

Carrizzo, A., G. M. Conte, E. Sommella, A. Damato, M. Ambrosio, M. Sala, M. C. Scala, R. P. Aquino, M. De Lucia, M. Madonna, F. Sansone, C. Ostacolo, M. Capunzo, S. Migliarino, S. Sciarretta, G. Frati, P. Campiglia and C. Vecchione (2019). "Novel Potent Decameric Peptide of *Spirulina platensis* Reduces Blood Pressure Levels Through a PI3K/AKT/eNOS-Dependent Mechanism." Hypertension **73**(2): 449-457.

Chakrabarti, S., W. Liao, S. T. Davidge and J. P. Wu (2017). "Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) differentially modulate

angiotensin II effects on vascular smooth muscle cells." Journal of Functional Foods **30**: 151-158.

Chakrabarti, S. and J. Wu (2015). "Milk-Derived Tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) Promote Adipocyte Differentiation and Inhibit Inflammation in 3T3-F442A Cells." Plos One **10**(2).

Chee, M. E., K. Majumder and Y. Mine (2017). "Intervention of Dietary Dipeptide Gamma-L-Glutamyl-L-Valine (gamma-EV) Ameliorates Inflammatory Response in a Mouse Model of LPS-Induced Sepsis." Journal of Agricultural and Food Chemistry **65**(29): 5953-5960.

Chiaravalli, J., E. Fontan, H. Fsihi, Y. M. Coic, F. Baleux, M. Veron and F. Agou (2011). "Direct inhibition of NF-kappa B activation by peptide targeting the NOA ubiquitin binding domain of NEMO." Biochemical Pharmacology **82**(9): 1163-1174.

Christenhusz, M. J. M. and J. W. Byng (2016). "The number of known plants species in the world and its annual increase." Phytotaxa **261**(3): 201-217.

Cicero, A. F. G., F. Fogacci, M. Veronesi, E. Grandi, G. Dinelli, S. Hrelia and C. Borghi (2018). "Short-Term Hemodynamic Effects of Modern Wheat Products Substitution in Diet with Ancient Wheat Products: A Cross-Over, Randomized Clinical Trial." Nutrients **10**(11).

Daskaya-Dikmen, C., A. Yucetepe, F. Karbancioglu-Guler, H. Daskaya and B. Ozcelik (2017). "Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants." Nutrients **9**(4).

de Almeida, C. L. F., H. d. S. Falcao, G. R. d. M. Lima, C. d. A. Montenegro, N. S. Lira, P. F. de Athayde-Filho, L. C. Rodrigues, M. d. F. V. de Souza, J. M. Barbosa-Filho and L. M. Batista (2011). "Bioactivities from Marine Algae of the Genus Gracilaria." International Journal of Molecular Sciences **12**(7): 4550-4573.

de Mejia, E. G. and V. P. Dia (2009). "Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kappa B pathway in the macrophage." Peptides **30**(12): 2388-2398.

Despres, J. P., I. Lemieux, J. Bergeron, P. Pibarot, P. Mathieu, E. Larose, J. Rodes-Cabau, O. F. Bertrand and P. Poirier (2008). "Abdominal obesity and the metabolic syndrome: Contribution to global cardiometabolic risk." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **28**(6): 1039-1049.

Ding, L., L. Y. Wang, Z. P. Yu, T. Zhang and J. B. Liu (2016). "Digestion and absorption of an egg white ACE-inhibitory peptide in human intestinal Caco-2 cell monolayers." International Journal of Food Sciences and Nutrition **67**(2): 111-116.

Escudero, E., M. C. Aristoy, H. Nishimura, K. Arihara and F. Toldra (2012). "Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham." Meat Science **91**(3): 306-311.

Escudero, E., L. Mora, P. D. Fraser, M.-C. Aristoy, K. Arihara and F. Toldra (2013). "Purification and Identification of antihypertensive peptides in Spanish dry-cured ham." Journal of Proteomics **78**: 499-507.

Escudero, E., L. Mora, P. D. Fraser, M.-C. Aristoy and F. Toldra (2013). "Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham." Food Chemistry **138**(2-3): 1282-1288.

Escudero, E., L. Mora and F. Toldra (2014). "Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and in vitro digestion." Food Chemistry **161**: 305-311.

Escudero, E., F. Toldra, M. Angel Sentandreu, H. Nishimura and K. Arihara (2012). "Antihypertensive activity of peptides identified in the in vitro gastrointestinal digest of pork meat." Meat Science **91**(3): 382-384.

Fan, X., L. Bai, L. Zhu, L. Yang and X. Zhang (2014). "Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(38): 9211-9222.

Fekete, A. A., C. Giromini, Y. Chatzidiakou, D. I. Givens and J. A. Lovegrove (2016). "Whey protein lowers blood pressure and improves endothelial function and lipid biomarkers in adults with prehypertension and mild hypertension: results from the chronic Whey2Go randomized controlled trial." American Journal of Clinical Nutrition **104**(6): 1534-1544.

Fekete, A. A., D. I. Givens and J. A. Lovegrove (2013). "The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function: a review of evidence from human intervention studies." Nutrition Research Reviews **26**(2): 177-190.

Fernandez, M., J. A. Ordonez, I. Cambero, C. Santos, C. Pin and L. De la Hoz (2007). "Fatty acid compositions of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications." Food Chemistry **101**(1): 107-112.

Fernandez-Musoles, R., M. Castello-Ruiz, C. Arce, P. Manzanares, M. Dolores Ivorra and J. B. Salom (2014). "Antihypertensive Mechanism of Lactoferrin-Derived Peptides: Angiotensin Receptor Blocking Effect." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(1): 173-181.

Fitzgerald, C., R. E. Aluko, M. Hossain, D. K. Rai and M. Hayes (2014). "Potential of a Renin Inhibitory Peptide from the Red Seaweed *Palmaria palmata* as a Functional Food Ingredient Following Confirmation and Characterization of a Hypotensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(33): 8352-8356.

Fritz, M., B. Vecchi, G. Rinaldi and M. C. Anon (2011). "Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity." Food Chemistry **126**(3): 878-884.

Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos and W. C. Sessa (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.

Gallego, M., M. C. Aristoy and F. Toldra (2014). "Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham." Meat Science **96**(2): 757-761.

Gallego, M., C. Grootaert, L. Mora, M. C. Aristoy, J. Van Camp and F. Toldra (2016). "Transepithelial transport of dry-cured ham peptides with ACE inhibitory



- activity through a Caco-2 cell monolayer." Journal of Functional Foods **21**: 388-395.
- Gallego, M., L. Mora, M. Hayes, M. Reig and F. Toldra (2019). "Peptides with Potential Cardioprotective Effects Derived from Dry-Cured Ham Byproducts." Journal of Agricultural and Food Chemistry **67**(4): 1115-1126.
- Gallego, M., L. Mora and F. Toldra (2016). "Peptidomics as a tool for quality control in dry-cured ham processing." Journal of Proteomics **147**: 98-107.
- Gallego, M., L. Mora and F. Toldra (2018). "Health relevance of antihypertensive peptides in foods." Current Opinion in Food Science **19**: 8-14.
- Gallego-Colon, E., W. Wojakowski and T. Francuz (2018). "Incretin drugs as modulators of atherosclerosis." Atherosclerosis **278**: 29-38.
- Galvez, A. F. and B. O. de Lumen (1999). "A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells." Nature Biotechnology **17**(5): 495-500.
- Gautam, A., K. Chaudhary, S. Singh, A. Joshi, P. Anand, A. Tuknait, D. Mathur, G. C. Varshney and G. P. S. Raghava (2014). "Hemolytik: a database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides." Nucleic Acids Research **42**(D1): D444-D449.
- Gianfranceschi, G. L., G. Gianfranceschi, L. Quassinti and M. Bramucci (2018). "Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy." Journal of Functional Foods **47**: 252-263.
- Gilles, S., V. Mariani, M. Bryce, M. J. Mueller, J. Ring, T. Jakob, S. Pastore, H. Behrendt and C. Traidl-Hoffmann (2009). "Pollen-Derived E-1-Phytosteranes Signal via PPAR-gamma and NF-kappa B-Dependent Mechanisms." Journal of Immunology **182**(11): 6653-6658.
- Girgih, A. T., A. M. Alashi, R. He, S. A. Malomo, P. Raj, T. Netticadan and R. E. Aluko (2014). "A Novel Hemp Seed Meal Protein Hydrolysate Reduces Oxidative Stress Factors in Spontaneously Hypertensive Rats." Nutrients **6**(12): 5652-5666.
- Goncalves-Fernandez, C., J. Sineiro, R. Moreira and O. Gualillo (2019). "Extraction and characterization of phlorotannin-enriched fractions from the Atlantic seaweed *Bifurcaria bifurcata* and evaluation of their cytotoxic activity in murine cell line." Journal of Applied Phycology **31**(4): 2573-2583.
- Grabner, R., U. Till and R. Heller (2000). "Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers." Cytometry **40**(3): 238-244.
- Grundy, S. M., J. I. Cleeman, C. N. B. Merz, H. B. Brewer, L. T. Clark, D. B. Hunninghake, R. C. Pasternak, S. C. Smith, N. J. Stone and C. Coordinating Comm Natl (2004). "Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines." Circulation **110**(2): 227-239.
- Gu, L., P. Ye, H. Li, Y. Wang, Y. Xu, Q. Tian, G. Lei, C. Zhao, Z. Gao, W. Zhao and S. Tan (2019). "Lunasin attenuates oxidant-induced endothelial injury and inhibits atherosclerotic plaque progression in ApoE<sup>-/-</sup> mice by up-regulating heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/Nrf2/ARE pathway." FASEB journal : official

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology: fj201802251R.

Gutierrez-Fisac, J. L., E. Lopez, J. R. Banegas, A. Graciani and F. Rodriguez-Artalejo (2004). "Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain." Obesity Research **12**(4): 710-715.

Hamblin, M., L. Chang, Y. Fan, J. Zhang and Y. E. Chen (2009). "PPARs and the Cardiovascular System." Antioxidants & Redox Signaling **11**(6): 1415-1452.

Han, B. K., H. J. Lee, H. S. Lee, H. J. Suh and Y. Park (2016). "Hypoglycaemic effects of functional tri-peptides from silk in differentiated adipocytes and streptozotocin-induced diabetic mice." Journal of the Science of Food and Agriculture **96**(1): 116-121.

Hansen, F. C., M. Kalle-Brune, M. J. A. van der Plas, A. C. Stromdahl, M. Malmsten, M. Morgelin and A. Schmidtchen (2015). "The Thrombin-Derived Host Defense Peptide GK25 Inhibits Endotoxin-Induced Responses through Interactions with Lipopolysaccharide and Macrophages/Monocytes." Journal of Immunology **194**(11): 5397-5406.

Harnedy, P. A., M. B. O'Keeffe and R. J. FitzGerald (2015). "Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*." Food Chemistry **172**: 400-406.

Hata, A. N. and R. M. Breyer (2004). "Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation." Pharmacology & Therapeutics **103**(2): 147-166.

Hata, Y., K. Nakajima, J. Uchida, H. Hidaka and T. Nakano (2001). "Clinical effects of brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (wakame), on blood pressure in hypertensive subjects." Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition **30**: 43-53.

He, R., R. E. Aluko and X. R. Ju (2014). "Evaluating Molecular Mechanism of Hypotensive Peptides Interactions with Renin and Angiotensin Converting Enzyme." Plos One **9**(3).

He, R., S. A. Malomo, A. Alashi, A. T. Girgih, X. R. Ju and R. E. Alulzo (2013). "Purification and hypotensive activity of rapeseed protein-derived renin and angiotensin converting enzyme inhibitory peptides." Journal of Functional Foods **5**(2): 781-789.

Heo, S. Y., S. C. Ko, C. S. Kim, G. W. Oh, B. Ryu, Z. J. Qian, G. Kim, W. S. Park, I. W. Choi, T. T. V. Phan, S. J. Heo, D. H. Kang, M. Yi and W. K. Jung (2017). "A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells." International Journal of Molecular Medicine **39**(5): 1072-1082.

Hertog, M. G. L., E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout (1993). "dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease - the Zutphen elderly study." Lancet **342**(8878): 1007-1011.

Hidayat, K., H. Z. Du, J. Yang, G. C. Chen, Z. Zhang, Z. N. Li and L. Q. Qin (2017). "Effects of milk proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized control trials." Hypertension Research **40**(3): 264-270.

Hirota, T., A. Nonaka, A. Matsushita, N. Uchida, K. Ohki, M. Asakura and M. Kitakaze (2011). "Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings." Heart and Vessels **26**(5): 549-556.

Hithamani, G., D. Kizhakayil and K. Srinivasan (2017). "Uptake of phenolic compounds from plant foods in human intestinal Caco-2 cells." Journal of Biosciences **42**(4): 603-611.

Hsieh, C. C., M. J. Chou and C. H. Wang (2017). "Lunasin attenuates obesity-related inflammation in RAW264.7 cells and 3T3-L1 adipocytes by inhibiting inflammatory cytokine production." Plos One **12**(2).

Huang, W. Y., S. Chakrabarti, K. Majumder, Y. Y. Jiang, S. T. Davidge and J. P. Wu (2010). "Egg-Derived Peptide IRW Inhibits TNF-alpha-Induced Inflammatory Response and Oxidative Stress in Endothelial Cells." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(20): 10840-10846.

Huang, W. Y., S. W. Shen, C. Nimalaratne, L. Sen, K. Majumder and J. P. Wu (2012). "Effects of addition of egg ovotransferrin-derived peptides on the oxygen radical absorbance capacity of different teas." Food Chemistry **135**(3): 1600-1607.

Ibrahim, M. A., M. J. Bester, A. W. Neitz and A. R. M. Gaspar (2018). "Rational in silico design of novel alpha-glucosidase inhibitory peptides and in vitro evaluation of promising candidates." Biomedicine & Pharmacotherapy **107**: 234-242.

Ibrahim, M. A., J. C. Serem, M. J. Bester, A. W. Neitz and A. R. M. Gaspar (2018). "Multiple antidiabetic effects of three alpha-glucosidase inhibitory peptides, PFP, YPL and YPG: Dipeptidyl peptidase-IV inhibition, suppression of lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes and scavenging activity on methylglyoxal." International journal of biological macromolecules **122**: 104-114.

Ibrahim, M. A., J. C. Serem, M. J. Bester, A. W. Neitz and A. R. M. Gaspar (2019). "Multiple antidiabetic effects of three alpha-glucosidase inhibitory peptides, PFP, YPL and YPG: Dipeptidyl peptidase-IV inhibition, suppression of lipid accumulation in differentiated 3T3-L1 adipocytes and scavenging activity on methylglyoxal." International Journal of Biological Macromolecules **122**: 104-114.

Jahandideh, F., S. Chakrabarti, S. T. Davidge and J. P. Wu (2017). "Egg white hydrolysate shows insulin mimetic and sensitizing effects in 3T3-F442A pre-adipocytes." Plos One **12**(10).

Jahandideh, F., S. Chakrabarti, K. Majumder, Q. Y. Li, S. Panahi, J. S. Morton, S. T. Davidge and J. P. Wu (2016). "Egg white protein hydrolysate reduces blood pressure, improves vascular relaxation and modifies aortic angiotensin II receptors expression in spontaneously hypertensive rats." Journal of Functional Foods **27**: 667-673.

Jahandideh, F., K. Majumder, S. Chakrabarti, J. S. Morton, S. Panahi, S. Kaufman, S. T. Davidge and J. P. Wu (2014). "Beneficial Effects of Simulated Gastro-Intestinal Digests of Fried Egg and Its Fractions on Blood Pressure, Plasma Lipids and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats." Plos One **9**(12).

Jakobsen, M. U., E. J. O'Reilly, B. L. Heitmann, M. A. Pereira, K. Balter, G. E. Fraser, U. Goldbourt, G. Hallmans, P. Knekt, S. M. Liu, P. Pietinen, D.

Spiegelman, J. Stevens, J. Virtamo, W. C. Willett and A. Ascherio (2009). "Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies." American Journal of Clinical Nutrition **89**(5): 1425-1432.

Jeong, H. J., J. B. Jeong, C. C. Hsieh, B. Hernandez-Ledesma and B. de Lumen (2010). "Lunasin Is Prevalent in Barley and Is Bioavailable and Bioactive in In Vivo and In Vitro Studies." Nutrition and Cancer-an International Journal **62**(8): 1113-1119.

Jimenez-Colmenero, F., J. Ventanas and F. Toldra (2010). "Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet." Meat Science **84**(4): 585-593.

Kalle, M., P. Papareddy, G. Kasetty, M. J. A. van der Plas, M. Morgelin, M. Malmsten and A. Schmidtchen (2014). "A Peptide of Heparin Cofactor II Inhibits Endotoxin-Mediated Shock and Invasive *Pseudomonas aeruginosa* Infection." Plos One **9**(7).

Karg, K., V. M. Dirsch, A. M. Vollmar, J. L. Cracowski, F. Laporte and M. J. Mueller (2007). "Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition." Free Radical Research **41**(1): 25-37.

Kim, Y. M., E. Y. Kim, I. H. Kim and T. J. Nam (2015). "Peptide derived from desalinated boiled tuna extract inhibits adipogenesis through the downregulation of C/EBP-alpha and PPAR-gamma in 3T3-L1 adipocytes." International Journal of Molecular Medicine **35**(5): 1362-1368.

Kim, Y. M., I. H. Kim, J. W. Choi, M. K. Lee and T. J. Nam (2015). "The anti-obesity effects of a tuna peptide on 3T3-L1 adipocytes are mediated by the inhibition of the expression of lipogenic and adipogenic genes and by the activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway." International Journal of Molecular Medicine **36**(2): 327-334.

Kling, D., C. Stucki, S. Kronenberg, D. Tuerck, E. Rheaume, J. C. Tardif, J. Gaudreault and C. Schmitt (2013). "Pharmacological control of platelet-leukocyte interactions by the human anti-P-selectin antibody inclacumab - preclinical and clinical studies." Thrombosis Research **131**(5): 401-410.

Krotova, K., H. B. Hu, S. L. Xia, L. Belayev, J. M. Patel, E. R. Block and S. Zharikov (2006). "Peptides modified by myristoylation activate eNOS in endothelial cells through Akt phosphorylation." British Journal of Pharmacology **148**(5): 732-740.

Kumar, M. S. (2019). "Peptides and Peptidomimetics as Potential Antiobesity Agents: Overview of Current Status." Frontiers in Nutrition **6**.

Kumar, V., P. Sharma, H. R. Bairagya, S. Sharma, T. P. Singh and P. K. Tiku (2019). "Inhibition of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by peptides leading to cholesterol homeostasis through SREBP2 pathway in HepG2 cells." Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics **1867**(6): 604-615.

Kwak, J. H., M. Kim, E. Lee, S. H. Lee, C. W. Ahn and J. H. Lee (2013). "Effects of black soy peptide supplementation on blood pressure and oxidative stress: a randomized controlled trial." Hypertension Research **36**(12): 1060-1066.

La Manna, S., C. Di Natale, D. Florio and D. Marasco (2018). "Peptides as Therapeutic Agents for Inflammatory-Related Diseases." International Journal of Molecular Sciences **19**(9).

- Lafarga, T., R. E. Aluko, D. K. Rai, P. O'Connor and M. Hayes (2016). "Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats." Food Research International **81**: 91-99.
- Lafarga, T., E. Gallagher, R. E. Aluko, M. A. E. Auty and M. Hayes (2016). "Addition of an Enzymatic Hydrolysate of Bovine Globulins to Bread and Determination of Hypotensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats." Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**(8): 1741-1750.
- Lammi, C., G. Aiello, G. Boschin and A. Arnoldi (2019). "Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides." Journal of Functional Foods **55**: 135-145.
- Lammi, C., C. Bollati, S. Ferruzza, G. Ranaldi, Y. Sambuy and A. Arnoldi (2018). "Soybean- and Lupin-Derived Peptides Inhibit DPP-IV Activity on In Situ Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Human Serum." Nutrients **10**(8).
- Ledebur, H. C. and T. P. Parks (1995). "TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF THE INTERCELLULAR-ADHESION MOLECULE-1 GENE BY INFLAMMATORY CYTOKINES IN HUMAN ENDOTHELIAL-CELLS - ESSENTIAL ROLES OF A VARIANT NF-KAPPA-B SITE AND P65 HOMODIMERS." Journal of Biological Chemistry **270**(2): 933-943.
- Lee, M., H. Lee and J. Kim (2018). "Dairy food consumption is associated with a lower risk of the metabolic syndrome and its components: a systematic review and meta-analysis." British Journal of Nutrition **120**(4): 373-384.
- Li, C. C., Y. C. Lee, H. Y. Lo, Y. W. Huang, C. Y. Hsiang and T. Y. Ho (2019). "Antihypertensive Effects of Corn Silk Extract and Its Novel Bioactive Constituent in Spontaneously Hypertensive Rats: The Involvement of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition." Molecules **24**(10): 14.
- Li, H., N. Prairie, C. C. Udenigwe, A. P. Adebiyi, P. S. Tappia, H. M. Aukema, P. J. H. Jones and R. E. Aluko (2011). "Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(18): 9854-9860.
- Li, S. S., L. Liu, G. Q. He and J. P. Wu (2018). "Molecular targets and mechanisms of bioactive peptides against metabolic syndromes." Food & Function **9**(1): 42-52.
- Liang, Q. F., M. Chalamaiyah, X. F. Ren, H. L. Ma and J. P. Wu (2018). "Identification of New Anti-inflammatory Peptides from Zein Hydrolysate after Simulated Gastrointestinal Digestion and Transport in Caco-2 Cells." Journal of Agricultural and Food Chemistry **66**(5): 1114-1120.
- Liang, Y., Q. Lin, P. Huang, Y. Wang, J. Li, L. Zhang and J. Cao (2018). "Rice Bioactive Peptide Binding with TLR4 To Overcome H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Injury in Human Umbilical Vein Endothelial Cells through NF-kappaB Signaling." Journal of agricultural and food chemistry.
- Lin, Q. L., W. Liao, J. Bai, W. Wu and J. P. Wu (2017). "Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-Ser-Trp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells." Journal of Functional Foods **34**: 248-253.

- Lo, Y. C., S. C. Lin, C. C. Rospigliosi, D. B. Conze, C. J. Wu, J. D. Ashwell, D. Eliezer and H. Wu (2009). "Structural Basis for Recognition of Diubiquitins by NEMO." Molecular Cell **33**(5): 602-615.
- Lopes, G., P. B. Andrade and P. Valentao (2017). "Phlorotannins: Towards New Pharmacological Interventions for Diabetes Mellitus Type 2." Molecules **22**(1).
- Lordan, S., R. P. Ross and C. Stanton (2011). "Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases." Marine Drugs **9**(6): 1056-1100.
- Lucey, A. J., C. Heneghan, E. Manning, P. A. Kroon and M. E. Kiely (2019). "Effect of an egg ovalbumin-derived protein hydrolysate on blood pressure and cardiovascular risk in adults with a mildly elevated blood pressure: a randomized placebo-controlled crossover trial." European Journal of Nutrition **58**(7): 2823-2833.
- Majumder, K., S. Chakrabarti, S. T. Davidge and J. Wu (2013). "Structure and Activity Study of Egg Protein Ovotransferrin Derived Peptides (IRW and IQW) on Endothelial Inflammatory Response and Oxidative Stress." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(9): 2120-2129.
- Majumder, K., S. Chakrabarti, J. S. Morton, S. Panahi, S. Kaufman, S. T. Davidge and J. P. Wu (2013). "Egg-Derived Tri-Peptide IRW Exerts Antihypertensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats." Plos One **8**(11).
- Majumder, K., G. X. Liang, Y. H. Chen, L. L. Guan, S. T. Davidge and J. P. Wu (2015). "Egg ovotransferrin-derived ACE inhibitory peptide IRW increases ACE2 but decreases proinflammatory genes expression in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats." Molecular Nutrition & Food Research **59**(9): 1735-1744.
- Majumder, K. and J. Wu (2015). "Molecular Targets of Antihypertensive Peptides: Understanding the Mechanisms of Action Based on the Pathophysiology of Hypertension." International Journal of Molecular Sciences **16**(1): 256-283.
- Maldonado-Cervantes, E., H. J. Jeong, F. Leon-Galvan, A. Barrera-Pacheco, A. De Leon-Rodriguez, E. G. de Mejia, B. O. de Lumen and A. P. B. de la Rosa (2010). "Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells." Peptides **31**(9): 1635-1642.
- Malomo, S. A., J. O. Onuh, A. T. Girgih and R. E. Aluko (2015). "Structural and Antihypertensive Properties of Enzymatic Hemp Seed Protein Hydrolysates." Nutrients **7**(9): 7616-7632.
- Mangold, A., T. M. Hofbauer, A. S. Ondracek, T. Artner, T. Scherz, W. S. Speidl, K. A. Krychtiuk, R. Sadushi-Kolici, J. Jakowitsch and I. M. Lang (2019). "Neutrophil extracellular traps and monocyte subsets at the culprit lesion site of myocardial infarction patients." Scientific Reports **9**.
- Marcone, S., K. Haughton, P. J. Simpson, O. Belton and D. J. Fitzgerald (2015). "Milk-derived bioactive peptides inhibit human endothelial-monocyte interactions via PPAR-gamma dependent regulation of NF-kappa B." Journal of Inflammation-London **12**.

Marquez Contreras, E., I. Vazquez-Rico, A. Baldonado-Suarez, S. Marquez-Rivero, J. Jimenez, F. Machancoses, R. Morano-Baez and A. Leon-Justel (2018). "Effect of moderate and regular consumption of Cinco Jotas acorn-fed 100% Iberian ham on overall cardiovascular risk: A cohort study." Food Science & Nutrition 6(8): 2553-2559.

Martin, M. and A. Deussen (2019). "Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 59(8): 1264-1283.

Mari, J. T., M. S. Alías, J. N. d. I. Cruz and M. V. Ibáñez Una alimentación sana ;Para todos!, Estrategia Naos.

Medina, S., A. Gil-Izquierdo, T. Durand, F. Ferreres and R. Dominguez-Perles (2018). "Structural/Functional Matches and Divergences of Phytoprostanes and Phytofurans with Bioactive Human Oxylipins." Antioxidants 7(11).

Meisel, H. (2005). "Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins." Current Medicinal Chemistry 12(16): 1905-1919.

Meram, C. and J. P. Wu (2017). "Anti-inflammatory effects of egg yolk livetins (alpha, beta, and gamma-livetin) fraction and its enzymatic hydrolysates in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages." Food Research International 100: 449-459.

Miguel, M., M. M. Contreras, I. Recio and A. Aleixandre (2009). "ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate." Food Chemistry 112(1): 211-214.

Minekus, M., M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu, F. Carriere, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and A. Brodkorb (2014). "A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus." Food & Function 5(6): 1113-1124.

Minghetti, L., R. Salvi, M. L. Salvatori, M. A. Ajmone-Cat, C. De Nuccio, S. Visentin, V. Bultel-Ponce, C. Oger, A. Guy, J. M. Galano, A. Greco, A. Bernardo and T. Durand (2014). "Nonenzymatic oxygenated metabolites of alpha-linolenic acid B-1- and L-1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR-gamma activation." Free Radical Biology and Medicine 73: 41-50.

Minkiewicz, P., J. Dziuba, A. Iwaniak, M. Dziuba and M. Darewicz (2008). "BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences." Journal of Aoac International 91(4): 965-980.

Montone, C. M., R. Zenezini Chiozzi, N. Marchetti, A. Cerrato, M. Antonelli, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, S. Piovesana and A. Lagana (2019). "Peptidomic Approach for the Identification of Peptides with Potential Antioxidant and Anti-Hypertensive Effects Derived From Asparagus By-Products." Molecules (Basel, Switzerland) 24(19).

Montoro-Garcia, S., M. P. Zafrilla-Rentero, F. Celdran-de Haro, J. J. Pinero-de Armas, F. Toldra, L. Tejada-Portero and J. Abellan-Aleman (2017). "Effects of dry-

cured ham rich in bioactive peptides on cardiovascular health: A randomized controlled trial." Journal of Functional Foods **38**: 160-167.

Mooney, C., N. J. Haslam, T. A. Holton, G. Pollastri and D. C. Shields (2013). "PeptideLocator: prediction of bioactive peptides in protein sequences." Bioinformatics **29**(9): 1120-1126.

Mora, L., P. D. Fraser and F. Toldra (2013). "Proteolysis follow-up in dry-cured meat products through proteomic approaches." Food Research International **54**(1): 1292-1297.

Mueller, S., B. Hilbert, K. Dueckershoff, T. Roitsch, M. Krischke, M. J. Mueller and S. Berger (2008). "General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis." Plant Cell **20**(3): 768-785.

Nargis, T. and P. Chakrabarti (2018). "Significance of circulatory DPP4 activity in metabolic diseases." Iubmb Life **70**(2): 112-119.

Nasri, R. and M. Nasri (2013). "Marine-Derived Bioactive Peptides as New Anticoagulant Agents: A Review." Current Protein & Peptide Science **14**(3): 199-204.

Neves, A. C., P. A. Harnedy, M. B. O'Keeffe and R. J. FitzGerald (2017). "Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities." Food Chemistry **218**: 396-405.

Nongonierma, A. B., S. Le Maux, C. Dubrulle, C. Barre and R. J. FitzGerald (2015). "Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties." Journal of Cereal Science **65**: 112-118.

O'Keeffe, M. B. and R. J. FitzGerald (2018). "Whey protein hydrolysate induced modulation of endothelial cell gene expression." Journal of Functional Foods **40**: 102-109.

Ondetti, M. A., N. J. Williams, E. F. Sabo, J. Pluscec, E. R. Weaver and O. Kocy (1971). "angiotensin-converting enzyme inhibitors from venom of bothrops-jararaca isolation, elucidation of structure, and synthesis." Biochemistry **10**(22): 4033-&.

Paiva, L., E. Lima, A. I. Neto and J. Baptista (2017). "Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, Antioxidant Properties, Phenolic Content and Amino Acid Profiles of *Fucus spiralis* L. Protein Hydrolysate Fractions." Marine Drugs **15**(10): 18.

Pan, H. L., X. X. She, H. L. Wu, J. Ma, D. F. Ren and J. Lu (2015). "Long-Term Regulation of the Local Renin-Angiotensin System in the Myocardium of Spontaneously Hypertensive Rats by Feeding Bioactive Peptides Derived from *Spirulina platensis*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(35): 7765-7774.

Panjaitan, F. C. A., H. L. R. Gomez and Y. W. Chang (2018). "In Silico Analysis of Bioactive Peptides Released from Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) Roe Proteins Identified by Proteomics Approach." Molecules **23**(11): 15.



- Parkar, H., O. A. Aiyegoro, P. Steenkamp and V. Steenkamp (2017). "Extracts of *Terminalia sericea* Enhance Cell Migratory Activity of Endothelial Hybrid and Fibroblast Cells In Vitro." Planta Med.
- Passacquale, G., P. Vamadevan, L. Pereira, C. Hamid, V. Corrigan and A. Ferro (2011). "Monocyte-Platelet Interaction Induces a Pro-Inflammatory Phenotype in Circulating Monocytes." Plos One 6(10).
- Patten, D. A. and S. Shetty (2018). "More Than Just a Removal Service: Scavenger Receptors in Leukocyte Trafficking." Frontiers in Immunology 9.
- Pepe, G., E. Sommella, G. Ventre, M. C. Scala, S. Adesso, C. Ostacolo, S. Marzocco, E. Novellino and P. Campiglia (2016). "Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of "Stracchino" soft cheese: Characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability." Journal of Functional Foods 26: 494-505.
- Quiroga, A. V., P. Aphalo, A. E. Nardo and M. C. Anon (2017). "In Vitro Modulation of Renin-Angiotensin System Enzymes by Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein-Derived Peptides: Alternative Mechanisms Different from ACE Inhibition." Journal of Agricultural and Food Chemistry 65(34): 7415-7423.
- Rangel-Huerta, O. D., B. Pastor-Villaescusa, C. M. Aguilera and A. Gil (2015). "A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds." Nutrients 7(7): 5177-5216.
- Reddy, K. V. R., R. D. Yedery and C. Aranha (2004). "Antimicrobial peptides: premises and promises." International Journal of Antimicrobial Agents 24(6): 536-547.
- Ren, G. X., Y. Y. Zhu, Z. X. Shi and J. H. Li (2017). "Detection of lunasin in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and the in vitro evaluation of its antioxidant and anti-inflammatory activities." Journal of the Science of Food and Agriculture 97(12): 4110-4116.
- Rengasamy, K. R. R., H. Khan, I. Ahmad, D. Lobine, F. Mahomoodally, S. Suroowan, S. T. S. Hassan, S. W. Xu, S. Pater, M. Daglia, S. M. Nabavi and S. K. Pandian (2019). "Bioactive peptides and proteins as alternative antiplatelet drugs." Medicinal Research Reviews 39(6): 2153-2171.
- Saban-Ruiz, J., M. Fabregate-Fuente, R. Fabregate-Fuente, A. Andres-Castillo, A. Palomino-Antolin, D. Barrio-Carreras, L. Martin-Fernandez, F. Altamirano, C. Fernandez-Fernandez and C. Andres-Lacueva (2017). "Iberian cured-ham consumption improves endothelial function in healthy subjects." Journal of Nutrition Health & Aging 21(10): 1277-1283.
- Salaga, M., A. Binienda, P. Draczkowski, P. Kosson, R. Kordek, K. Jozwiak and J. Fichna (2018). "Novel peptide inhibitor of dipeptidyl peptidase IV (Tyr-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub>) with anti-inflammatory activity in the mouse models of colitis." Peptides 108: 34-45.
- Santos, R. A. S., A. J. Ferreira, T. Verano-Braga and M. Bader (2013). "Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system." Journal of Endocrinology 216(2): R1-R17.
- Shantsila, E., L. D. Tapp, B. J. Wrigley, B. Pamukcu, S. Apostolakis, S. Montoro-Garcia and G. Y. H. Lip (2014). "Monocyte subsets in coronary artery disease and

their associations with markers of inflammation and fibrinolysis." Atherosclerosis **234**(1): 4-10.

Shantsila, E., B. Wrigley, L. Tapp, S. Apostolakis, S. Montoro-Garcia, M. T. Drayson and G. Y. H. Lip (2011). "Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology." Journal of Thrombosis and Haemostasis **9**(5): 1056-1066.

Stangl, V., M. Lorenz, A. Ludwig, N. Grimbo, C. Guether, W. Sanad, S. Ziemer, P. Martus, G. Baumann and K. Stangl (2005). "The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets." Journal of Nutrition **135**(2): 172-178.

Straus, D. S. and C. K. Glass (2001). "Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets." Medicinal Research Reviews **21**(3): 185-210.

Syed, A. A., K. L. Venkatraman and A. Mehta (2019). "An anticoagulant peptide from *Porphyra yezoensis* inhibits the activity of factor XIIa: In vitro and in silico analysis." Journal of Molecular Graphics & Modelling **89**: 225-233.

Teschemacher, H., G. Koch and V. Brantl (1997). "Milk protein-derived opioid receptor ligands." Biopolymers **43**(2): 99-117.

Tokunaga, F., S. Sakata, Y. Saeki, Y. Satomi, T. Kirisako, K. Kamei, T. Nakagawa, M. Kato, S. Murata, S. Yamaoka, M. Yamamoto, S. Akira, T. Takao, K. Tanaka and K. Iwai (2009). "Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappa B activation." Nature Cell Biology **11**(2): 123-U140.

Toldra, F., M. Reig, M. C. Aristoy and L. Mora (2018). "Generation of bioactive peptides during food processing." Food Chemistry **267**: 395-404.

Tonolo, F., L. Moretto, S. Ferro, A. Folda, V. Scalcon, M. Sandre, F. Fiorese, O. Marin, A. Bindoli and M. P. Rigobello (2019). "Insight into antioxidant properties of milk-derived bioactive peptides in vitro and in a cellular model." Journal of Peptide Science **25**(5).

Toshchakov, V., W. J. Piao and S. Vogel (2013). "Inhibition of TLR4 signaling by TRAM-derived decoy peptides in vitro and in vivo." Journal of Immunology **190**.

Traidl-Hoffmann, C., V. Mariani, H. Hochrein, K. Karg, H. Wagner, J. Ring, M. J. Mueller, T. Jakob and H. Behrendt (2005). "Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization." Journal of Experimental Medicine **201**(4): 627-635.

Tuttolomondo, A., I. Simonetta, M. Daidone, A. Mogavero, A. Ortello and A. Pinto (2019). "Metabolic and Vascular Effect of the Mediterranean Diet." International journal of molecular sciences **20**(19).

Udenigwe, C. C. and A. Howard (2013). "Meat proteome as source of functional biopeptides." Food Research International **54**(1): 1021-1032.

Unnikrishnan, P. S., K. Suthindhiran and M. A. Jayasri (2015). "Alpha-amylase Inhibition and Antioxidant Activity of Marine Green Algae and its Possible Role in Diabetes Management." Pharmacognosy Magazine **11**(44): S511-S515.

Vercruyse, L., J. Van Camp and G. Smaghe (2005). "ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(21): 8106-8115.

Vieira, E. F., J. Van Camp, I. Ferreira and C. Grootaert (2018). "Protein hydrolysate from canned sardine and brewing by-products improves TNF-alpha-induced inflammation in an intestinal-endothelial co-culture cell model." European Journal of Nutrition **57**(6): 2275-2286.

Vigor, C., G. Reversat, A. Rocher, C. Oger, J. M. Galano, J. Vercauteren, T. Durand, T. Tonon, C. Leblanc and P. Potin (2018). "Isoprostanooids quantitative profiling of marine red and brown macroalgae." Food Chemistry **268**: 452-462.

Vilcacundo, R., C. Martinez-Villaluenga and B. Hernandez-Ledesma (2017). "Release of dipeptidyl peptidase IV, alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion." Journal of Functional Foods **35**: 531-539.

Vincendeau, M., K. Hadian, A. C. Messias, J. K. Brenke, J. Halander, R. Griesbach, U. Greczmiel, A. Bertossi, R. Stehle, D. Nagel, K. Demski, H. Velvarska, D. Niessing, A. Geerlof, M. Sattler and D. Krappmann (2016). "Inhibition of Canonical NF-kappa B Signaling by a Small Molecule Targeting NEMO-Ubiquitin Interaction." Scientific Reports **6**.

Wang, J., T. L. Yin, X. W. Xiao, D. He, Z. D. Xue, X. N. Jiang and Y. Wang (2018). "StraPep: a structure database of bioactive peptides." Database-the Journal of Biological Databases and Curation.

Wang, W. Y., E. T. Lee, R. R. Fabsitz, R. Devereux, L. Best, T. K. Welty and B. V. Howard (2006). "A longitudinal study of hypertension risk factors and their relation to cardiovascular disease - The Strong Heart Study." Hypertension **47**(3): 403-409.

Wenzel, P. (2019). "Monocytes as immune targets in arterial hypertension." British Journal of Pharmacology **176**(12): 1966-1977.

Wu, J. H., B. G. Sun, X. L. Luo, M. M. Zhao, F. P. Zheng, J. Y. Sun, H. H. Li, X. T. Sun and M. Q. Huang (2018). "Cytoprotective effects of a tripeptide from Chinese Baijiu against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signaling." Rsc Advances **8**(20): 10898-10906.

Xu, F. R., J. Zhang, Z. G. Wang, Y. J. Yao, G. G. Atungulu, X. R. Ju and L. F. Wang (2018). "Absorption and Metabolism of Peptide WDHAPQLR Derived from Rapeseed Protein and Inhibition of HUVEC Apoptosis under Oxidative Stress." Journal of Agricultural and Food Chemistry **66**(20): 5178-5189.

Yahya, M. A., O. A. Alhaj and A. S. Al-Khalifah (2017). "Antihypertensive effect of fermented skim camel (*Camelus dromedarius*) milk on spontaneously hypertensive rats." Nutricion Hospitalaria **34**(2): 416-421.

Yamada, Y., M. Iwasaki, H. Usui, K. Ohinata, E. D. Marczak, A. W. Lipkowski and M. Yoshikawa (2010). "Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK1 receptor." Peptides **31**(5): 909-914.

Yamaguchi, N., K. Kawaguchi and N. Yamamoto (2009). "Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis." European Journal of Pharmacology **620**(1-3): 71-77.

- Yu, Z. P., Y. G. Yin, W. Z. Zhao, F. Chen and J. B. Liu (2014). "Antihypertensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptide RVPSL on Spontaneously Hypertensive Rats by Regulating Gene Expression of the Renin-Angiotensin System." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(4): 912-917.
- Zamyatnin, A. A., A. S. Borchikov, M. G. Vladimirov and O. L. Voronina (2006). "The EROP-Moscow oligopeptide database." Nucleic Acids Research **34**: D261-D266.
- Zhang, C., H. G. Liu, S. W. Chen and Y. K. Luo (2018). "Evaluating the effects of IADHFL on inhibiting DPP-IV activity and expression in Caco-2 cells and contributing to the amount of insulin released from INS-1 cells in vitro." Food & Function **9**(4): 2240-2250.
- Zheng, J. H., J. Y. Wang, H. L. Pan, H. L. Wu, D. F. Ren and J. Lu (2017). "Effects of IQP, VEP and Spirulina platensis hydrolysates on the local kidney renin angiotensin system in spontaneously hypertensive rats." Molecular Medicine Reports **16**(6): 8485-8492.
- Zheng, Y. J., Y. Li, Y. L. Zhang, X. H. Ruan and R. G. Zhang (2017). "Purification, characterization, synthesis, in vitro ACE inhibition and in vivo antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates." Journal of Functional Foods **28**: 48-58.
- Zhu, Y. J., H. Li and X. Z. Wang (2017). "Lunasin abrogates monocytes to endothelial cells." Molecular Immunology **92**: 146-150.
- Zielinska, E., B. Baraniak and M. Karas (2017). "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrolysates and Peptide Fractions Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Selected Heat-Treated Edible Insects." Nutrients **9**(9).

**ANEXOS**



## ANEXO 1

**Aprobación del comité de ética de la ucam para la realización del ensayo clínico que aparece en el Artículo 2.**



## COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

<b>Sugerencias al Investigador</b>

**A la vista de la solicitud de informe adjunto por el Investigador y de las recomendaciones anteriormente expuestas el dictamen del Comité es:**

Emitir informe favorable	X
Emitir informe desfavorable	
Emitir informe favorable condicionado a subsanación	

<b>MOTIVACIÓN</b>
Contribuirá al avance en el conocimiento en su área

V.º B.º El Presidente,

Fdo.: José Alberto Cánovas Sánchez



El Secretario,

Fdo.: José Alarcón Teruel





## ANEXO 2

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA TESIS.

## 1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

**ARTÍCULO 1:** Martínez-Sánchez, S.M., Gabaldón-Hernández, J.A., Montoro-García, S. (2020). **Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health.** *Journal of functional foods*, 64, 103645.

**ARTÍCULO 2:** Martínez-Sánchez, S. M., Minguela, A., Prieto-Merino, D., Zafrilla-Rentero, M. P., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2017). **The Effect of Regular Intake of Dry-Cured Ham Rich in Bioactive Peptides on Inflammation, Platelet and Monocyte Activation Markers in Humans.** *Nutrients*, 9(4).

**ARTÍCULO 3:** Martínez-Sánchez, S. M., Pérez-Sánchez, H., Gabaldón, J. A., Abellán-Alemán, J., & Montoro-García, S. (2019). **Multifunctional Peptides from Spanish Dry-Cured Pork Ham: Endothelial Responses and Molecular Modeling Studies.** *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17).

**ARTÍCULO 4:** Martínez-Sánchez, S., Domínguez-Perles, R., Montoro-García, S., Gabaldón- Hernández, J.A., Guy, A., Durand. T., Galano, J.M., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A. **Outlining the in vitro Bioaccessibility, Bioavailability and Bioactivity over the Endothelium of *Gracilaria longissima* Oxylipins.** (ENVIADO). *Food & Function*.

## 2. CAPÍTULOS DE LIBRO.

1. Sara María Martínez Sánchez. Avances en Investigación en Salud. **Péptidos bioactivos**, pp. 45 - 52. ASUNIVEP, 2017. ISBN 9788469738160
2. Silvia Montoro García; Sara María Martínez Sánchez. New Trends In Biomarkers and Diseases: An Overview. Physiopathology of, pp. 285 - 308. BENTHAMSCIENCE, 2017. ISBN 978-1-68108-4

## 3. TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS NACIONALES O INTERNACIONALES

1. **Título del trabajo:** Outlining the bioaccessibility and in vitro bioavailability of *Gracilaria longissima* oxylipins.

**Nombre del congreso:** 2<sup>nd</sup> Food Chemistry Conference

**Ciudad de celebración:** Sevilla, Andalucía, España

**Fecha de celebración:** 17/09/2019

**Fecha de finalización:** 19/09/2019

**Entidad organizadora:** Elsevier Tipo de entidad: Editorial

**Autores:** S. Martínez-Sánchez; R. Domínguez-Perles; S. Montoro-García; J.A. Gabaldón; T. Durand; A. Guy; J.M Galano; F. Ferreres; A. Gil-Izquierdo.

2. **Título del trabajo:** Anti-inflammatory peptides from Spanish dry-cured pork ham: in vitro endothelial cell response and docking studies.

**Nombre del congreso:** 2<sup>nd</sup> International symposium on bioactive peptides

**Autor de correspondencia:** Si

**Ciudad de celebración:** Valencia, Comunidad Valenciana, España

**Fecha de celebración:** 22/05/2019

**Fecha de finalización:** 24/10/2019

**Entidad organizadora:** IATA-CSIC Tipo de entidad: Centro de I+D

Ciudad entidad organizadora: Valencia, Comunidad Valenciana, España

**Autores:** Sara M<sup>a</sup> Martínez Sánchez; Horacio Pérez Sánchez; José Antonio Gabaldón Hernández; Silvia Montoro García.

**3. Título del trabajo:** Peptidomic analysis, gastrointestinal stability and potential effects of extracts from *Gracillaria longissima*.

**Nombre del congreso:** 2nd International Symposium on Bioactive peptides

Autor de correspondencia: Si

**Ciudad de celebración:** Valencia,

**Fecha de celebración:** 22/05/2019

**Fecha de finalización:** 24/05/2019

**Entidad organizadora:** IATA-CSIC Tipo de entidad: Centro de I+D

Ciudad entidad organizadora: Valencia, España.

**Autores:** Sara Martínez-Sánchez; María Isabel Rodríguez López; José Antonio Gabaldón Hernández; Silvia Montoro García.

**4. Título del trabajo:** Antihypertensive and Endothelium protective activities of Bioactive Peptides from Spanish Dry Cured Ham.

**Nombre del congreso:** IV Congreso internacional de Investigación en Salud y Envejecimiento & II Congreso Internacional de Investigación en Salud.

**Tipo evento:** Congreso Ámbito geográfico: Nacional

**Tipo de participación:** Participativo - Póster

**Fecha de celebración:** 30/06/2017

**Entidad organizadora:** Asociación Universitaria de Educación y Psicología; CINFOPER

**Autores:** Sara María Martínez Sánchez; José Antonio Gabaldón Hernández; Silvia Montoro García.

**5. Título del trabajo:** Bioactive peptides from a dry cured pork ham improve inflammatory profile in terms of monocyte and platelet activation

**Nombre del congreso:** IV Congreso Internacional de Investigación en Salud y Envejecimiento & II Congreso Internacional de Investigación en Salud

**Tipo evento:** Congreso Ámbito geográfico: Internacional

**Tipo de participación:** Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

**Fecha de celebración:** 30/06/2017

**Entidad organizadora:** Asociación Universitaria de Educación y Psicología; CINFOPER

**Autores:** Sara María Martínez Sánchez; José Antonio Gabaldón Hernández; Silvia Montoro García.

**6. Título del trabajo:** Antihypertensive and endothelium protective activities of bioactive peptides from Spanish dry cured ham.

**Nombre del congreso:** The 1<sup>st</sup> international conference on Food Bioactives and Health

**Tipo evento:** Congreso Ámbito geográfico: Internacional

**Tipo de participación:** Participativo - Ponencia oral (comunicación oral)

**Fecha de celebración:** 15/09/2016

**Entidad organizadora:** Institute of Food Research

**Autores:** Sara María Martínez Sánchez; José Abellán Alemán; Silvia Montoro García.

**7. Título del trabajo:** Novel potential properties of bioactive peptides from Spanish dry-cured ham on the endothelium.

**Nombre del congreso:** Frontiers in Cardio Vascular Biology 2016

**Tipo evento:** Congreso Ámbito geográfico: Internacional.

**Tipo de participación:** Participativo - Póster

**Fecha de celebración:** 10/07/2016

**Entidad organizadora:** European Society of Cardiology

**Autores:** Sara María Martínez Sánchez; Ana Tapia Abellán; Diego Angosto Bazarra; Pablo Pelegrín Vivancos; Silvia Montoro García.

**8. Título del trabajo:** Improving cardiovascular system with functional and regional food: Spanish Cured Ham.

**Nombre del congreso:** Congreso Internacional "Laudato Si'", de Ecología Integral y Medio Ambiente

**Tipo evento:** Congreso Ámbito geográfico: Internacional

**Tipo de participación:** Participativo - Póster

**Fecha de celebración:** 04/03/2016

**Entidad organizadora:** Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM)

**Autores:** Sara María Martínez Sánchez.

#### 4. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO LOS TRABAJOS DE LA PRESENTE TESIS.

**Nombre del proyecto:** Descubrimiento y Optimización de Compuestos Bioactivos Mediante Técnicas Avanzadas de Química Computacional.

**Ciudad entidad realización:** Murcia, Región de Murcia, España

**Nº de investigadores/as:** 11

**Entidad/es financiadora/s:** FUNDACION SENECA AGENCIA DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LA REGION DE MURCIA

**Ciudad entidad financiadora:** España

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2019 - 31/01/2021

**Cuantía total:** 62.000 €

**Nombre del proyecto:** Desarrollo y encapsulación de compuestos bioactivos de origen vegetal con efectos en el sistema cardiovascular.

**Ciudad entidad realización:** Murcia, Región de Murcia, España

**Nº de investigadores/as:** 6

**Entidad/es financiadora/s:** FUNDACION SENECA AGENCIA DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LA REGION DE MURCIA

**Ciudad entidad financiadora:** España

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2019 - 01/01/2021

**Cuantía total:** 49.500 €

**Nombre del proyecto:** Propiedades de moléculas bioactivas de origen animal y vegetal para modular la función endotelial, homeostasis e inflamación en condiciones patológicas. **PMAFI 09/16.**

**Entidad de realización:** Universidad Católica de Murcia

**Nº de investigadores/as:** 2

**Fecha de inicio-fin:** 01/01/2017 - 31/12/2018

**Nombre del proyecto:** Novel properties of POrk Cured BIOactive PEPTides to modulate endothelial function, homeostasis and inflammation in pathological conditions. PCOFUND-GA-2013-608765

**Ámbito geográfico:** Unión Europea

**No de investigadores/as:** 3

**Entidad/es financiadora/s:** WILLIAM HARVEY INTERNATIONAL TRANSLATIONAL RESEARCH ACADEMY- RESEARCH FELLOWSHIP

**Fecha de inicio-fin:** 01/10/2014 - 31/01/2018

## **5..FINANCIACIÓN DE LA DOCTORANDA**

### **CONTRATOS OBTENIDOS EN RÉGIMEN DE CONCURRENCIA COMPETITIVA**

CONTRATO PREDOCTORAL PLAN PROPIO DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MURCIA CONVOCATORIA 2015. (abril 2015-noviembre 2016).

CONTRATO DE FORMACIÓN DEL PROFESORADO UNIVERSITARIO (FPU) MINISTERIO DE EDUCACIÓN. CONVOCATORIA 2015. (diciembre 2016-enero 2020).

