

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

APLICACIÓN DE UN ABORDAJE LIPIDÓMICO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD *IN VITRO* DE OXILIPINAS VEGETALES

Autora:

María Campillo Cano

Directores:

Dr. D. Raúl Domínguez Perles

Dra. D^a Sonia Medina Escudero

Dr. D. Ángel Gil Izquierdo

Murcia, septiembre de 2022

TESIS DOCTORAL



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado Ciencias de la Salud

APLICACIÓN DE UN ABORDAJE LIPIDÓMICO PARA EL ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD *IN VITRO* DE OXILIPINAS VEGETALES

Autora:

María Campillo Cano

Directores/as:

Dr. D. Raúl Domínguez Perles

Dra. D^a Sonia Medina Escudero

Dr. D. Ángel Gil Izquierdo

Murcia, septiembre de 2022



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Raúl Domínguez Perles, la Dra. D^a. Sonia Medina Escudero, y el Dr. D. Ángel Gil Izquierdo como Directores de la Tesis Doctoral titulada “*Aplicación de un abordaje lipidómico para el estudio de la bioactividad in vitro de oxilipinas vegetales*” realizada por D^a María Campillo Cano en el Programa de Doctorado 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 de 28 de enero, en Murcia a 28 de septiembre de 2022.

Fdo. D. Raúl Domínguez Perles

Fdo. D^a Sonia Medina Escudero

Fdo. D. Ángel Gil Izquierdo

Esta investigación fue financiada por los proyectos:

- Proyecto AGL2017-83386-R “*Nutrimetabólica de fitoprostanos y fitofuranos de alimentos vegetales oleosos y su relación con la salud humana*” del Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto 20024/SF/16 “*Fitoprostanos en matrices alimentarias: estudios de biodisponibilidad y actividad biológica moduladora de neuroprostanos, dihomoisoprostanos, eicosanoides y catabolitos de oxidación de ADN en humanos*” de la Fundación de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (FUNDACIÓN SENECA).
- Proyecto JLI/20646/SF/18 “*Desarrollo y encapsulación de compuestos bioactivos de origen vegetal con efectos en el sistema cardiovascular*” de la Fundación de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (FUNDACIÓN SENECA).

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA PRESENTE TESIS
DOCTORAL**

1. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

- 1.1. **Campillo M**, Medina S, Fanti F, Gallego-Gómez JI, Simonelli-Muñoz A, Bultel-Poncé V, Durand T, Galano JM, Tomás-Barberán FA, Gil-Izquierdo A, Domínguez-Perles R. (2021). *Phytosteranes and phytofurans modulate COX-2 linked inflammation markers in LPS-stimulated THP-1 monocytes by lipidomics workflow*. Free Radicals Biology and Medicine, 167, 335-347. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.002>

FACTOR DE IMPACTO: 8,101 (Q1 en *Endocrinology & Metabolism*)

- 1.2 Montoro-García, S., Martínez-Sánchez, S., Carmena-Bargueño, M., Pérez-Sánchez, H., **Campillo, M.**, Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., Gil-Izquierdo, Á., & Gabaldón, J. A. (2023). *A Phytosterane from Gracilaria longissima increases platelet activation, platelet adhesion to leukocytes and endothelial cell migration by potential binding to EP3 prostaglandin receptor*. International Journal of Molecular Sciences, 24(3), 2730. <https://doi.org/10.3390/ijms24032730>

FACTOR DE IMPACTO: 6,208 (Q1 en *Biochemistry & Molecular Biology*)

2. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- 2.1. María Campillo Cano, Sonia Medina, Federico Fanti, Juana I. Gallego-Gómez, Agustín Simonelli-Muñoz, Ángel Gil-Izquierdo, Raúl Domínguez-Perles. *Análisis de la capacidad moduladora de la respuesta inflamatoria ligada a COX-2 en monocitos de oxilipinas vegetales*. VII Jornadas de Investigación y Doctorado: ODS con Ciencia. Junio 2021, Murcia, España. Póster.

RESUMEN

La exposición a xenocompuestos tóxicos aumenta considerablemente los procesos inflamatorios, así como los niveles de estrés oxidativo. Dichos eventos son los ejes centrales en la progresión y gravedad de numerosas enfermedades. Las oxilipinas vegetales, representadas por los fitoprostanos y los fitofuranos (FitoP y FitoF, respectivamente), constituyen una amplia familia de metabolitos secundarios de origen vegetal, originados por la oxidación de ácidos grasos (ácido linolénico y linoleico). Los FitoP y FitoF presentan una gran similitud estructural con los isoprostanoides y prostaglandinas descritos en humanos, los cuales suponen una importante herramienta molecular para el mantenimiento del equilibrio redox celular, para la modulación de los procesos inflamatorios y de agregación plaquetaria. La analogía estructural de estas oxilipinas vegetales con los isoprostanoides y prostaglandinas y varios ensayos nutricionales han llevado a la conclusión de que estos mediadores pueden prevenir eventos fisiopatológicos importantes. Las oxilipinas vegetales han sido identificadas en una gran variedad de alimentos de origen vegetal, mostrando respuestas proinflamatorias en algunos FitoP. En este marco, hay que tener en cuenta que dichas sustancias, una vez ingeridas y asimiladas por los mamíferos, pueden desarrollar funciones al tener la capacidad de interactuar con diferentes dianas moleculares. En este contexto, uno de los propósitos de este trabajo fue analizar la capacidad que presentan las oxilipinas identificadas individualmente para prevenir los procesos de estrés oxidativo e inflamación y determinar las posibles interacciones moleculares que se producen en situaciones fisiopatológicas específicas. En la presente Tesis Doctoral se investigó, mediante la aplicación de un modelo *in vitro* de simulación inflamatoria (estimulados por lipopolisacáridos), la capacidad de los FitoP y FitoF individuales para prevenir dichos efectos, profundizando en las formas de acoplamiento molecular responsables de los efectos biológicos desencadenados. De igual forma, a través de la línea monocítica THP-1 y utilizando un enfoque lipidómico se obtuvieron datos sobre las funciones antioxidantes y antiinflamatorias de las oxilipinas vegetales. Asimismo, 9-D₁₁-FitoP estimuló a los receptores Eprostanoides de la PEG₂, los cuales mejoraron la agregación plaquetaria inducida por adenosin di-fosfato (ADP). Además, dicho FitoP se

mostró como un posible receptor potencial al unirse al receptor de prostaglandina 3 (receptor EP3). Los resultados obtenidos han esclarecido las propiedades antiinflamatorias de los FitoP y FitoF, no obstante son necesarios más estudios *in vitro* e *in vivo* para arrojar luz sobre la capacidad funcional de las fracciones bioaccesibles y biodisponibles de estos compuestos.

PALABRAS CLAVE

Fitoprostanos, fitofuranos, prostaglandinas, isoprostanos, inflamación, agregación plaquetaria

ABSTRACT

Exposure to toxic xenocompounds significantly increases inflammatory processes as well as oxidative stress levels. These events are central to the progression and severity of numerous diseases. Plant oxylipins, represented by phytoprostanes and phytofurans (PhytoPs and PhytoFs, respectively), constitute a large family of secondary metabolites of plant origin, originating from the oxidation of fatty acids (linolenic and linoleic acid). PhytoPs and PhytoFs present a great structural similarity with isoprostanoids and prostaglandins described in humans, which represent an important molecular tool for the maintenance of cellular redox balance, for the modulation of inflammatory processes and platelet aggregation. The structural analogy of these oxylipins with isoprostanoids and prostaglandins and several nutritional assays have led to the conclusion that these mediators can prevent important pathophysiological processes. Plant oxylipins have been identified in a wide variety of foods of plant origin, showing proinflammatory responses in some PhytoPs. In this framework, it should be taken into account that these substances once ingested and assimilated by mammals can develop functions by having the ability to interact with different molecular targets. In this context, one of the purposes of this work was to analyze the capacity of the individually identified oxylipins to prevent oxidative stress and inflammation processes and to determine the possible molecular interactions that occur in specific pathophysiological situations. The present Doctoral Thesis investigated by means of an *in vitro* model of prooxidative (through hydrogen peroxide) and inflammatory (stimulated by lipopolysaccharides) simulation the capacity of the different PhytoPs and PhytoFs identified to prevent such effects, delving into the forms of molecular coupling responsible for the biological effects triggered. Similarly, through the monocytic line THP-1 and using a lipidomic approach, data on the antioxidant and anti-inflammatory functions of plant oxylipins were obtained. Likewise, 9-D₁₁-FitoP stimulated PEG₂ Eprostanoid receptors, which enhanced adenosine di-phosphate (ADP)-induced platelet aggregation. In addition, PhytoP was shown to be a potential receptor by binding to the prostaglandin 3 receptor (EP3 receptor). The results obtained have clarified the

anti-inflammatory properties of PhytoP and PhytoF, however, further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to shed light on the functional capacity of the bioaccessible and bioavailable fractions of these compounds.

KEYWORDS

Phytoprostanes, phytofurans, prostaglandins, isoprostanes, inflammation, platelet aggregation

AGRADECIMIENTOS

“Algunos caminos hermosos no se pueden descubrir sin perderse” y mucho menos sin apoyo. Este trabajo va dedicado a todas aquellas personas que me han acompañado durante este duro camino.

En primer lugar, a mis padres Domingo y Encarnita quienes han sabido educarme en el amor, por su apoyo incondicional, por su paciencia y por darme la vida. A mis hermanos Juan Luis, José Domingo, Pablo y Encarni porque nadie me ha cuidado tan bien como ellos.

A Dani por estar siempre a mi lado, por motivarme, por su amor incansable, por creer en mí hasta el final y por alegrar mi día a día.

A ti, Sara por aparecer en mi vida y ser mi mayor regalo, por darle sentido a todos los días de mi vida.

A Agustín y Juani por ser siempre motivadores, inspiradores y formadores, sin ellos nunca hubiera podido cerrar esta etapa; gracias por tanto.

A mis directores Ángel, Raúl y Sonia por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su compromiso y su tiempo dedicado.

A mi prestigiosa Universidad por haberme dado grandes compañeros. Gracias Aarón, Nerea, Lola, Dani, Eloina, Eva, Mayte, Serafín y todos aquellos que me han arropado desde el principio.

A todas mis amigas por el apoyo que siempre muestran, por sacar esas risas aun cuando los días se volvían grises.

"Solo aprende quien admira".
Miguel Ángel Herranz (1978-2020).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	11
I - INTRODUCCIÓN.....	35
1. NUTRICIÓN, DIETA Y SALUD.....	35
2. OXILIPINAS VEGETALES.....	40
2.1. ORIGEN, FORMACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOPROSTANOS.....	44
2.2. ORIGEN, FORMACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOFURANOS	46
2.3. PRESENCIA DE FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS EN LA DIETA	47
2.4 EFECTO DE LAS CONDICIONES AGRONÓMICAS EN EL PERFIL CUANTITATIVO DE FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL.....	49
2.5 EFECTO DEL PROCESADO Y LA CONSERVACIÓN EN EL PERFIL CUANTITATIVO DE FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS EN ALIMENTOS VEGETALES.....	50
3. BIODISPONIBILIDAD DE OXILIPINAS VEGETALES	53
4. CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS OXILIPINAS VEGETALES	58
5. PRINCIPALES ENFERMEDADES LIGADAS A LA INFLAMACIÓN	60
5.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	61
5.2 CÁNCER	62
5.3 ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.....	63
5.4 TRASTORNOS NEUROLÓGICOS.....	64
5.5 ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES	64
6. OXILIPINAS HUMANAS Y SU RELACIÓN CON LA FISIOPATOLOGÍA INFLAMATORIA	65
7. RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y EFECTOS EN LA SALUD DE OXILIPINAS VEGETALES Y HUMANAS	70

II- JUSTIFICACIÓN	79
III- OBJETIVOS.....	83
IV- MATERIAL Y MÉTODO	87
4.1. SUSTANCIAS QUÍMICAS Y REACTIVOS	87
4.2. EXTRACTO ANALÍTICO RICO EN OXILIPINAS.....	87
4.3. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	88
4.4. PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR BASADA EN REDUCCIÓN XTT	88
4.5. MODELO INFLAMATORIO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDOS.....	89
4.6. EXTRACCIÓN DE PROSTAGLANDINAS DE CÉLULAS Y MEDIO DE CULTIVO.....	89
4.7. ANÁLISIS UHPLC-QQQ-MS / MS DE PROSTAGLANDINAS	90
4.8. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVACIÓN DE LAS PLAQUETAS Y DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)-AGREGADOS PLAQUETARIOS.....	93
4.9. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	96
4.10. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR.....	96
4.11. ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN UN MODELO DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	97
4.12. DOCKING CIEGO.....	98
4.13. DINÁMICA MOLECULAR.....	99
4.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	100
V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
5.1 LOS FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS MODULAN LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN LIGADOS A LA ENZIMA CICLOOXIGENASA-2 EN MONOCITOS THP-1 ESTIMULADOS CON LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO MEDIANTE UN ENFOQUE LIPIDÓMICO	103
5.1.1. Respuesta inflamatoria desencadenada por LPS en la línea celular monocítica humana THP-1, <i>in vitro</i>.....	104
5.1.1.1. Viabilidad de la línea celular monocítica humana THP-1	104
5.1.1.2 Modulación de la respuesta inflamatoria mediada a través de prostaglandinas intracelulares por oxilipinas vegetales después de la inflamación inducida por LPS	107

5.1.1.3. Modulación de la respuesta inflamatoria mediada por prostaglandinas excretadas en el sobrenadante de las células por las oxilipinas vegetales después de la inflamación inducida por lipopolisacáridos.....	111
5.1.2. Desentrañar el papel de los fitoprostanos y fitofuranos como moduladores del perfil de prostaglandinas de monocitos THP-1 estimulados con lipopolisacáridos	115
5.2 UN FITOPROSTANO DE GRACILARIA LONGISSIMA AUMENTA LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA, LA ADHESIÓN DE LAS PLAQUETAS A LOS LEUCOCITOS Y LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES MEDIANTE SU POSIBLE UNIÓN AL RECEPTOR DE PROSTAGLANDINAS EP3.....	125
5.2.1 Composición individual de FitoP y FitoF en el extracto de <i>Gracillaria longissima</i>	126
5.2.2 El extracto de FitoP estimula la activación y agregación plaquetaria.....	126
5.2.3 9-D_{1t}-FitoP afecta a la agregación plaquetaria a través de los receptores EP.....	128
5.2.4 9-D_{1t}-FitoP solo no aumenta la adhesión plaquetaria a los leucocitos	132
5.2.5 9-D_{1t}-FitoP no compromete la viabilidad de las células endoteliales.....	135
5.2.6. Bioactividad de 9-D_{1t}-FitoP sobre el endotelio	136
5.2.6.1. 9-D _{1t} -FitoP contribuye a la migración <i>in vitro</i>	136
5.2.6.2. 9-D _{1t} -FitoP induce un estado de disfunción endotelial	137
5.2.7. Métodos computacionales para descubrir los receptores biológicos de la 9-D_{1t}-FitoP	138
5.2.7.1. La 9-D _{1t} -FitoP se une a la cavidad hidrofóbica del EP3	138
5.2.7.2. 9-D _{1t} -FitoP comparte interacciones hidrofóbicas con los agonistas EP3	139
VI- CONCLUSIONES	147
VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
VIII- ANEXOS	191

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AA, Ácido araquidónico

ADP, Adenosín difosfato

ALA, Ácido α -linolénico

AMPc, Adenosín monofosfato cíclico

α -DOX, α -dioxigenasas

AO, Aceite de oliva

AOVE, Aceite de oliva virgen extra

AVAD, Años de vida ajustados por discapacidad

cis-OPDA, Ácido *cis*-(+)-12-*oxo*-fitodienoico

COX, Ciclooxygenasa o prostaglandina-endoperóxido sintasa

CYP, Citocromo P450

DAMP, Patrones moleculares asociados a daños

DHA, Ácido docosahexanoico

DOXs, α -dioxigenasa

EP-3, receptor Eprostanoidede la PEG₂ acoplado a la proteína G

EPA, Ácido eicosapentanoico

FitoF, Fitofuranos

FitoP, Fitoprostanos

GIM, Modelos gastrointestinales

GPCR, Receptores acoplados a proteínas G

GST, Glutati3n-S-transferasa

H₂O₂, Peróxido de hidrógeno

IsoP, Isoprostanos

LA, Ácido linoleico

LOX, Lipoxigenasa

LPS, Lipopolisacárido

MDA, Malondialdehído

NF- κ B, Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nrf2, Factor nuclear eritroide-2

OMS, Organización Mundial de la Salud

PAMP, Patrones moleculares asociados a patógenos

PG, Prostaglandinas

PPAR- γ , Receptor activado por proliferador experimental tipo gamma

PUFA, Ácidos grasos poliinsaturados

SAR, Relación estructura-actividad

SENC, Sociedad Española de Nutrición Comunitaria

ROS, Especies Reactivas de Oxígeno

TX, Tromboxanos

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de defunción en el mundo en el 2019 (Organización Mundial de la Salud).	36
Figura 2. Pirámide de la Alimentación Saludable de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria).	38
Figura 3. Esquema representativo de la vía no enzimática de formación de fitoprostanos y fitofuranos.....	42
Figura 4. Formación de las principales clases de fitoprostanos.	44
Figura 5. Esquema de la síntesis de las distintas clases de fitoprostanos desde ácido α -linolénico. Modificado de Parchmann y Mueller, 1998.	45
Figura 6. Estructura química representativa de la familia de los fitofuranos	46
Figura 7. Biosíntesis y señalización de las oxilipinas humanas.....	65
Figura 8. Resolución del proceso inflamatorio tras una infección o daño tisular..	67
Figura 9. Estrategia de selección de monocitos y otras células PMN (basada en FSC y SSC).....	95
Figura 10. Actividad citotóxica de los FitoP y los FitoF	105
Figura 11. Efecto del tratamiento con FitoP y FitoF individuales de células monocíticas THP-1 estimuladas con LPS en el perfil cuantitativo intracelular de PG (ng / mL)	109
Figura 12. Efecto del tratamiento con fitoprostanos y fitofuranos individuales de las células monocíticas THP-1 estimuladas por LPS en la liberación de prostaglandinas en el medio de crecimiento (ng / mL)	113
Figura 13. Diagrama de Caja-Bigotes (BoxPlot) con cuartiles (valores superiores al 75%, mediana del 50% y valores inferiores del 25%) del efecto <i>in vitro</i> de los FitoP y FitoF sobre las prostaglandinas totales (intraceloulares y extracelulares) de las	

células THP-1 preexpuestas a 50 μ M de oxilipinas vegetales individuales durante 24 horas, seguidas de un tratamiento de 24 horas con 100 ng/mL de LPS	117
Figura 14. Vías metabólicas que afectan al perfil de prostaglandinas evaluado en monocitos (línea celular THP-1) estimulados por LPS preexpuestos a FitoP y FitoF	121
Figura 15. Efectos del extracto de <i>Gracillaria longissima</i> rico en 9-D _{1t} -FitoP sobre los marcadores de activación plaquetaria.....	127
Figura 16. Efectos de la 9-D _{1t} -FitoP sobre los marcadores de activación plaquetaria	128
Figura 17. Efectos de la 9-D _{1t} -FitoP y de los ligandos del receptor EP sobre los marcadores de activación plaquetaria, bajo estimulación con ADP	130
Figura 18. Efectos de 100 nM 9-D _{1t} -FitoP aislado o en combinación con distintos ligandos del receptor EP sobre la expresión de marcadores de activación plaquetaria.	131
Figura 19. El agonista EP4 Cay10598 inhibe el efecto de 9-D _{1t} -FitoP.....	132
Figura 20. Efectos de los ligandos 9-D _{1t} -FitoP y EP3 en el recuento de agregados de PMNs y plaquetas.....	133
Figura 21. Efecto de 9-D _{1t} -FitoP sobre la formación de plaquetas-leucocitos en sangre fresca EDTA.....	134
Figura 22. Ensayo de viabilidad celular realizado con el reactivo AlamarBLue..	135
Figura 23. Valores de cuantificación de la migración (cierre de la herida) en células endoteliales humanas Ea.hy926 en presencia de 300 nM de PGE ₂ y 9-D _{1t} -FitoP, respectivamente.....	136
Figura 24. Expresión relativa de ARNm en células Ea.hy926.....	137
Figura 25. Diagrama 2D de interacción proteína-ligando generado entre EP3 (PDB: 6M9T)	138
Figura 26. Energía de interacción entre 9D _{1t} y los diferentes clusters del receptor EP3.....	139

- Figura 27.** Interacciones bidimensionales proteína-ligando de los diagramas de dinámica molecular generados entre el receptor EP3 (PDB: 6M9T) y (A) Misoprostol (agonista EP3), (B) 9-D₁₁-FitoP, y (C) L-798,106 140
- Figura 28.** Simulación MD, interacciones receptor-ligando en el interior del bolsillo de unión de 100 nanosegundos. Comparación de la energía de unión por residuo de (A) misoprostol; (B) 9-D₁₁-FitoP y (C) L798,106 141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tiempo de retención y transiciones MRM de prostaglandinas evaluadas.	92
Tabla 2. Niveles de oxilipinas (FitoP y FitoF, ng/muestra) en la materia prima, después de la extracción con metanol.....	94

ÍNDICE DE ANEXOS

VIII- ANEXOS 191

ANEXO 1. PHYTOPROSTANES AND PHYTOFURANS MODULATE COX-2-LINKED INFLAMMATION MARKERS IN LPS-STIMULATED THP-1 MONOCYTES BY LIPIDOMICS WORKFLOW..... 191

ANEXO 2. A PHYTOPROSTANE FROM GRACILARIA LONGISSIMA INCREASES PLATELET ACTIVATION, PLATELET ADHESION TO LEUKOCYTES AND ENDOTHELIAL CELL MIGRATION BY POTENTIAL BINDING TO EP3 PROSTAGLANDIN RECEPTOR 204

I – INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1. NUTRICIÓN, DIETA Y SALUD

La concienciación acerca de la estrecha relación existente entre los hábitos dietéticos y la salud se basa en las evidencias arrojadas por diversos estudios epidemiológicos y de intervención nutricional realizados hasta la fecha (Panagiotakos *et al.*, 2008; Sellem *et al.*, 2022), así como en el desarrollo, a lo largo de las últimas décadas, de numerosas actividades de divulgación y concienciación sobre de la relevancia del mantenimiento de hábitos dietéticos saludables. En este sentido, los resultados obtenidos de las distintas investigaciones realizadas indican que una dieta saludable puede mejorar la salud a medio y largo plazo, al contribuir a reducir el riesgo de numerosas patologías (Bartels *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2021; Ramezani-Jolfaie *et al.*, 2019).

A pesar de los beneficios demostrados en relación con hábitos dietéticos equilibrados, durante las últimas cuatro décadas se han producido cambios significativos en los patrones de nutrición global, abandonando las dietas tradicionales, como la dieta mediterránea, cuyas características en relación a las materias primas utilizadas, forma de cocinado, etc., han permitido asociarla con la prevención de numerosas patologías no infectocontagiosas (Domínguez *et al.*, 2021). Por lo tanto, estos patrones tradicionales se han desplazado dando lugar a la instauración de un mayor consumo de alimentos procesados y ultraprocesados, con un alto contenido a azúcares refinados y grasas saturadas, estrechamente relacionados con el desarrollo de determinadas patologías degenerativas, destacando las patologías cardiovasculares (Doustmohammadian & Bazhan, 2021; Monteiro *et al.*, 2013).

Como resultado de los patrones económicos globales y de los referidos cambios en los hábitos dietéticos, actualmente, más de 2500 millones de personas en todo el mundo sufren al menos una forma de desnutrición, existiendo aproximadamente 800 millones de personas desnutridas, alrededor de 2000 millones de adultos con sobrepeso u obesidad, y más de 2000 millones de personas

con deficiencias de micronutrientes (FAO, <https://www.fao.org/publications/sofi/2022/es/>, consultada en septiembre de 2022). Estos cuadros de desnutrición o malnutrición se encuentran asociados fundamentalmente a dietas de mala calidad, que no aportan una cantidad equilibrada de nutrientes (Afshin *et al.*, 2019). Debido a estas circunstancias, los patrones dietéticos actuales constituyen uno de los factores de riesgo fundamentales para las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo (**Figura 1**), ya que no solo no proporcionan los nutrientes necesarios para alcanzar y mantener un funcionamiento óptimo del organismo, conservar o restablecer la salud, disminuir el riesgo de padecer enfermedades, asegurar la reproducción, la gestación y la lactancia y promover un crecimiento y desarrollos óptimos (Afshin *et al.*, 2019; Basulto *et al.*, 2013); sino que conllevan la ingesta de nutrientes asociados con alteraciones metabólicas y comorbilidades que reducen la esperanza de vida y la calidad de vida de la población (Hirvonen *et al.*, 2022).

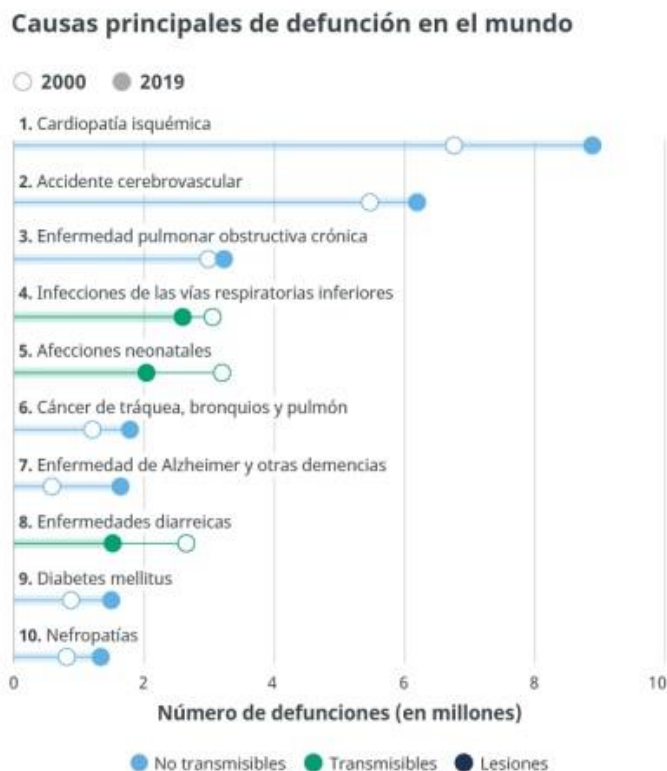


Figura 1. Principales causas de defunción en el mundo en el 2019 (Organización Mundial de la Salud).

Esta situación sociosanitaria ha hecho que las enfermedades y la tasa de mortalidad asociada a alteraciones de los patrones dietéticos y nutricionales sean elevadas, siguiendo una tendencia ascendente en la mayoría de las regiones. De hecho, las muertes atribuibles a deficiencias dietéticas han aumentado un 15% desde 2010, más rápidamente que el crecimiento de la población, siendo responsables en la actualidad de más de 12 millones de muertes por enfermedades no transmisibles en adultos (Global Nutrition Report, 2021).

A pesar de la progresión negativa de los parámetros epidemiológicos asociados a la dieta, los efectos epidemiológicos son susceptibles de ser revertidos mediante la modificación de los hábitos dietéticos. En este sentido, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/healthy-diet>, consultada en septiembre, 2022), una dieta saludable incluye lograr el equilibrio energético, limitar la ingesta de grasas totales, sustituir las grasas saturadas por grasas no saturadas, eliminar los ácidos grasos *-trans*, limitar la ingesta de azúcares libres y el consumo de sal (sodio) de todas las fuentes y aumentar la proporción de frutas y verduras, legumbres y cereales integrales, así como promover el consumo de frutos secos (**Figura 2**). De acuerdo con las evidencias obtenidas en las últimas décadas, un régimen dietético con estas características contribuiría a disminuir la incidencia de numerosas patologías y deficiencias específicas como síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer, infección, deterioro cognitivo, mala calidad de vida, discapacidad y mortalidad (Fiore *et al.*, 2021; Jayanama *et al.*, 2021). Aunque conjuntamente al mantenimiento de patrones dietéticos saludables, existen otros factores relacionados con un estilo de vida saludable (horas de sueño, reducir el estrés y realizar ejercicio físico de forma regular) resulta beneficioso para prevenir el desarrollo de procesos fisiopatológicos degenerativos (Cena & Calder, 2020); de entre todos estos factores de riesgo mencionados, el impacto sobre la morbilidad y mortalidad relacionada con las enfermedades no comunicables de dietas poco saludables es el más significativo, por lo que la investigación e intervención de las autoridades médicas en este ámbito es de especial relevancia.



Figura 2. Pirámide de la Alimentación Saludable de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria).

Entre las diversas alteraciones fisiopatológicas desencadenadas por la alteración de los patrones dietéticos cabe destacar la regulación del estrés oxidativo y la inflamación (Aleksandrova *et al.*, 2021). En este sentido, la ingesta de alimentos calóricos, con alto contenido en azúcares y grasas saturadas, dan lugar a un incremento de los fenómenos de peroxidación lipídica en plasma, así como a la reducción de la capacidad antioxidante total entre 2 y 4 horas tras la ingesta (Khor *et al.*, 2014).

La sociedad es cada vez más consciente de esta relación dieta-salud, por lo que en la última década ha aumentado el interés por optimizar los hábitos dietéticos e incorporar alimentos vegetales, cuyos componentes moleculares se han asociado con actividades biológicas beneficiosas, mejorando la salud en general (Barreiro, 2018). Por ejemplo, alimentos que contienen además de los nutrientes básicos, moléculas biológicamente activas relacionadas con la promoción de la salud y con un potencial uso terapéutico están haciéndose hueco en el mercado.

Así, actualmente contamos con información obtenida del análisis una variedad de matrices vegetales que han permitido describir una amplia diversidad de moléculas en relación con potenciales efectos beneficiosos para la salud, en general y en el sistema cardiovascular, en particular. El efecto saludable de estas

moléculas está basado en su capacidad de prevención del estrés oxidativo y los procesos inflamatorios. Entre las moléculas más frecuentemente identificadas como responsables de esta actividad cabe destacar los esteroides vegetales, los compuestos fenólicos, los ácidos grasos poliinsaturados y los péptidos bioactivos, entre otros (Chakrabarti *et al.*, 2014; Djuricic & Calder, 2021; Han, *et al.*, 2015; Rahman, *et al.*, 2021; Rangel-Huerta *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente no se conoce la totalidad de los constituyentes alimentarios, así como sus propiedades biológicas (bioaccesibilidad, biodisponibilidad y funcionalidad), por lo que son necesarias nuevas investigaciones acerca de su potencialidad para la prevención de enfermedades. Por este motivo nuevos tipos de compuestos son investigados e identificados periódicamente iniciándose la caracterización de su interés biológico en relación con su contribución a la funcionalidad y seguridad de los alimentos en el marco de diversos procesos biológicos asociados a la prevención de enfermedades.

2. OXILIPINAS VEGETALES

Aunque las plantas carecen de un sistema inmunitario en el sentido en que este está presente en los mamíferos, sí poseen mecanismos moleculares destinados a la defensa frente a posibles patógenos y vectores de estrés. Dichos mecanismos están desarrollados por metabolitos secundarios tales como polifenoles, compuestos organosulfurados, alcaloides, terpenos, glucósidos, etc., los cuales actúan frente al estrés biótico y abiótico, siendo sus bioactividades más relevantes las antimicrobianas y captación de radicales libres, entre otras. Actualmente se continúan identificando nuevas moléculas responsables de actividades biológicas complementarias, a través de las cuales participan en la protección frente a agresiones externas. En esta línea de investigación, en el año 1998 se describió un nuevo tipo de compuestos derivados de diversos ácidos grasos mediante reacciones de oxidación, denominadas genéricamente "oxilipinas" (Parchmann & Mueller). Dichos compuestos, al igual que otros metabolitos secundarios, intervienen en la respuesta a los daños físicos causados por animales, insectos y patógenos (estrés biótico), así como el estrés abiótico (por ejemplo, estrés hídrico, salinidad, etc.) (Vicente *et al.*, 2012).

En relación con la formación de oxilipinas vegetales, estas se producen como resultado de reacciones de oxidación de ácidos grasos. Dichas reacciones tienen lugar, preferentemente, de forma enzimática, con la participación de las enzimas lipooxigenasa (LOX) y α -dioxigenasa (DOXs) (Feussner & Wasternack, 2002; Hamberg *et al.*, 1999). No obstante, la incorporación de oxígeno en los ácidos grasos puede ocurrir asimismo mediante reacciones no enzimáticas, las cuales tienen lugar en condiciones de presión parcial de oxígeno superiores al 21%, debido a la interacción de los ácidos grasos precursores (ácido γ -linolénico, c18:3w6, ALA) con especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radical hidroxilo (-OH) y el singlete de oxígeno (O_2^{\cdot}) (Mueller & Berger, 2009).

En condiciones de homeostasis, las oxilipinas vegetales se encuentran en las concentraciones necesarias para desarrollar actividades de señalización, cumpliendo así su papel de fitohormonas encargadas de controlar procesos diversos tales como, la respuesta a estrés biótico o abiótico referidas anteriormente,

o el desarrollo y el crecimiento de los tejidos vegetales (Feussner & Wasternack, 2002; Schaller & Stintzi, 2009). Los FitoP, por tanto, forman parte de una cascada de señalización que sirve como mecanismo de defensa para las plantas ante el estrés oxidativo y foto-oxidativo, pero además presentan numerosas actividades biológicas como la inducción de la glutatión-S-transferasa (GST) (enzima con la capacidad de catalizar productos de peroxidación lipídica), la biosíntesis de fitoalexinas (metabolito secundario con función antimicrobiana), así como la inducción de genes involucrados en el metabolismo primario y secundario (Thoma *et al.*, 2003). Una de las principales características de estos compuestos es que se mantienen en bajas concentraciones en condiciones óptimas de crecimiento, en tanto que su síntesis se incrementa en situaciones de estrés como respuesta a estímulos ambientales o endógenos (Testerink & Munnik, 2011). La formación de oxilipinas vegetales desencadena cascadas de señalización responsables de eventos celulares y respuestas fisiológicas (Lagunas, 2013). Más allá de la participación de las oxilipinas vegetales en la fisiopatología vegetal, su analogía estructural con los eicosanoides de mamíferos, derivados del ácido araquidónico (AA), acerca de los cuales se han descrito capacidades funcionales en el marco de procesos fisiopatológicos inflamatorios, han permitido sugerir un potencial interés biológico de las oxilipinas vegetales ingeridas a través de la dieta, como potenciales moduladores de factores de riesgo frente a procesos degenerativos y de envejecimiento celular (estrés oxidativo y procesos inflamatorios) (Ahmed *et al.*, 2020).

La formación de las oxilipinas vegetales engloba diversas fases. En primer término, las enzimas α -DOX actúan sobre ácidos grasos de distinto tamaño y grado de saturación generando un primer producto, altamente reactivo, que contiene un grupo hidroperóxido en el carbono " α " de la molécula (Hamberg *et al.*, 1999). Este producto primario, se modifica de forma espontánea dando lugar a tres tipos de derivados, un hidroxíácido con el mismo número de carbonos que el ácido graso sustrato, un aldehído y un ácido graso con un carbono menos, que se generan mediante descarboxilación y oxidación de los hidroperóxidos primarios (Hamberg *et al.*, 2003).

Al igual que en el caso de las enzimas α -DOX, la oxidación de ácidos grasos catalizada por LOX da lugar a la formación de hidroperóxidos. Sin embargo, en tanto que las enzimas α -DOX pueden utilizar una amplia variedad de ácidos grasos

como sustrato, las LOX actúan exclusivamente sobre ácidos grasos poliinsaturados que contengan dobles enlaces conjugados en su estructura química, como es el caso de los ácidos linolénico (ALA) y linoleico (LA), quienes constituyen los principales sustratos de este tipo de enzimas (Vicente, 2012).

Entre las oxilipinas producidas por la vía no enzimática de oxidación de ácidos grasos en plantas superiores se encuentran las descritas en la década de 1990 por Parchman & Mueller denominadas fitoprostanos y fitofuranos (FitoP y FitoF, respectivamente). Ambos tipos de oxilipinas se producen desde un sustrato común en respuesta al aumento de los niveles de ROS (**Figura 3**), constituyendo una parte esencial de las herramientas moleculares de las plantas superiores implicadas en la señalización de defensa y en la prevención del daño celular causado por el desequilibrio redox (Domínguez-Perles *et al.*, 2018).

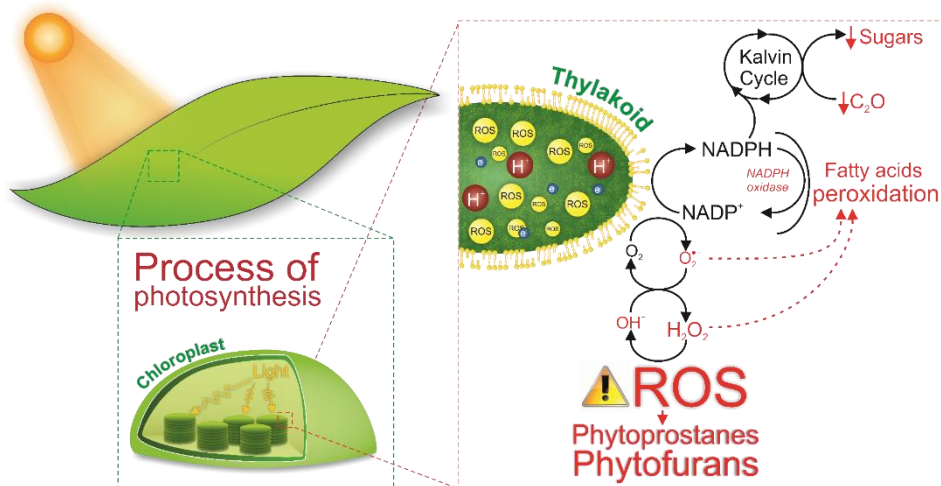


Figura 3. Esquema representativo de la vía no enzimática de formación de fitoprostanos y fitofuranos. Modificado de la Tesis Doctoral: Rol de los fitoprostanos y fitofuranos en los mecanismos de protección y defensa de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) frente al estrés oxidativo causado por agentes abióticos y prácticas tecnológicas. Dra. María Pincirolli, 2018. [Tesis Maria Pincirolli](#)

Tras la descripción primigenia de estos compuestos, se ha sugerido su utilidad en el estudio de la calidad de alimentos vegetales oleosos, como indicadores de procesos de oxidación y enranciamiento, así como indicadores de estrés durante la fase precosecha (Medina *et al.*, 2018). Este conjunto de funcionalidades ha llevado a diversos grupos de investigación a caracterizar su presencia en una amplia variedad de alimentos de origen vegetal, especialmente aquellos de naturaleza oleosa, muchos de ellos fuertemente implantados en la dieta mediterránea como el aceite de oliva, o frutos secos como las almendras (Domínguez-Perles *et al.*, 2018; Leung *et al.*, 2022; Lipan *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2018; Pinciroli *et al.*, 2018). Más recientemente, se ha sugerido el interés de FitoP y FitoF como moléculas bioactivas, más allá de sus funciones en relación con la fisiología de plantas superiores, fundamentalmente debido a su analogía estructural con las oxilipinas de mamíferos derivadas del AA (C20:4, n-6) (isoprostanos y prostaglandinas) que podría estar asociada también con un paralelismo funcional, siendo eventualmente capaces de mimetizar la actividad biológica de prostanoides e isoprostanos en mamíferos (*p.ej.* agregación plaquetaria, vasoconstricción y como herramientas moleculares para el mantenimiento del balance redox a nivel celular) tras su ingestión dietética y su absorción intestinal (Medina *et al.*, 2018). Sin embargo, en la actualidad, esta actividad biológica se ha demostrado solo parcialmente en relación a procesos inmunomediados e inflamatorios (Imbusch & Mueller, 2000a; Imbusch & Mueller, 2000b).

Así pues, más allá de la mera descripción química, la caracterización de FitoP y FitoF en relación con actividades biológicas saludables se ha asociado con capacidades preventivas del estrés oxidativo y la fisiopatología inflamatoria (Arcusa *et al.*, 2022). La descripción de estas propiedades funcionales ha llevado a la búsqueda de evidencias adicionales acerca de los beneficios para la salud de la ingesta de alimentos de origen vegetal, fuente dietética de FitoP y FitoF. Estas caracterizaciones son de especial relevancia, ya que, hasta el momento actual, la información existente acerca de la distribución o acumulación de los FitoP y FitoF en los tejidos y órganos, la formación de derivados esterificados y, en consecuencia, sobre su potencial biológico, permanecen escasamente caracterizados (Domínguez-Perles *et al.*, 2018).

2.1. ORIGEN, FORMACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOPROSTANOS

Como referimos anteriormente, los FitoP pertenecen a una nueva familia de efectores vegetales que se forman de manera no enzimática mediante un mecanismo bioquímico catalizado por radicales libres a partir del ALA. Esta vía de formación da lugar a compuestos con una analogía adicional en relación con las oxilipinas de los mamíferos, y más concretamente de los isoprostanos, formados en mamíferos a través de un proceso no enzimático idéntico a partir del AA (Loeffler *et al.*, 2005).

Las plantas poseen una gran cantidad de prostanoides (**Figura 4**). De hecho, se estima que la concentración de FitoP en tejidos vegetales podría doblar aquella registrada para IsoP en seres humanos (Imbusch & Mueller, 2000a). En relación con los FitoP, la unidad de “trieno” es el principal bloque de construcción de sus sistemas de anillos. Los sustitutos en la unidad de “trieno” son el metilo y el carboxilo terminales del ácido graso. La cadena terminal de metilo en cada unidad de “trieno” distinta puede ocupar las posiciones R1 o R2 del FitoP, dando lugar a dos tipos diferentes de regioisómeros por unidad de trieno (Collado-González *et al.*, 2015a).

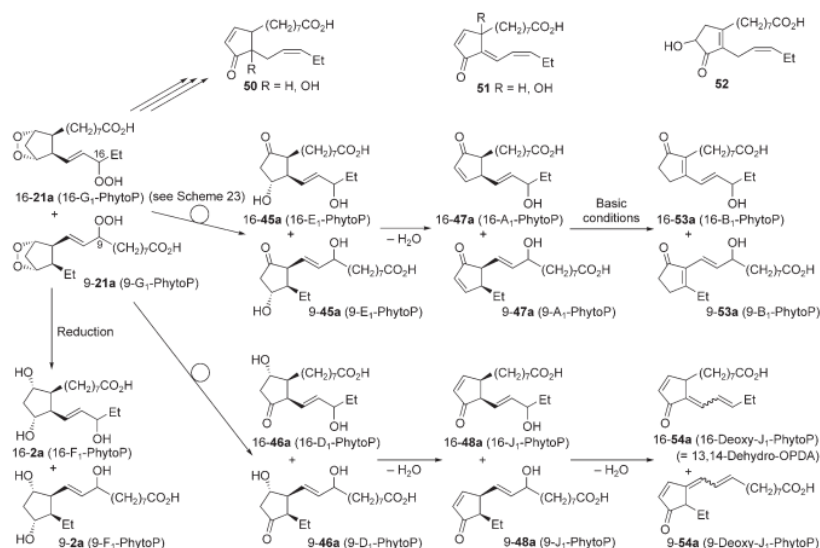


Figura 4. Formación de las principales clases de fitoprostano. Más allá de las prostaglandinas: química y biología de los metabolitos cíclicos oxigenados formados a través vías libres de ácidos grasos poliinsaturados (modificado de Jhan *et al.* (2008)).

Las ROS que se generan como consecuencia del metabolismo y la tasa de respiración en las células vegetales, constituyen moléculas de señalización de la planta, teniendo la capacidad de inducir la expresión de sus genes de defensa a través de diferentes mecanismos (Mansoor *et al.*, 2022). En este escenario, el radical linolenato reacciona con una molécula de oxígeno, formando un radical peroxilo linolenato, el cual también puede reaccionar internamente, formando un radical peroxilo cíclico, que reacciona espontáneamente con una segunda molécula de oxígeno, para reducirse acto seguido y así formar los FitoP del grupo G (**Figura 5A**). Estos a su vez se descomponen espontáneamente, formando MDA (malondialdehído) y otros alcanos y alquenos, o dando lugar a otros grupos de FitoP (Mueller, 2004). Los peróxidos lipídicos se convierten en su correspondiente hidroxiácido graso de forma enzimática o espontánea. Este reordenamiento da lugar a los FitoP de las clases F, D y E (**Figura 5B**) (Collado-González *et al.*, 2019). A través de sucesivas reacciones de oxidación/reducción se forman las clases adicionales de FitoP y FitoF.

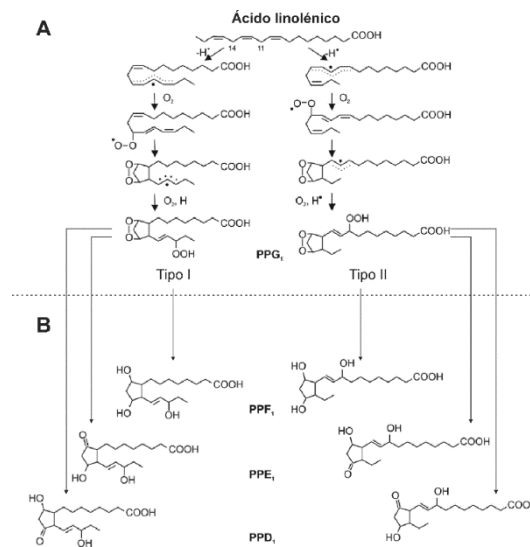


Figura 5. Esquema de la síntesis de las distintas clases de fitoprostano desde ácido α -linolénico.

Modificado de Parchmann y Mueller, 1998.

Así pues, las clases E₁ y F₁-fitoprostanos se encuentran en niveles constantes en las células vegetales (Imbusch y Mueller, 2000a; Parchmann y Mueller, 1998), mientras que F₁-FitoP puede llegar incluso a superar los niveles de jasmonatos en situaciones de elevado estrés oxidativo (Imbusch y Mueller, 2000b; Parchmann *et al.*, 1998).

2.2. ORIGEN, FORMACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS FITOFURANOS

Los FitoF constituyen un grupo de oxilipinas vegetales complementario descrito recientemente. La síntesis de dichos compuestos sigue una ruta análoga a la descrita para isofuranos, neurofuranos y dihomo-isofuranos en mamíferos desde sus ácidos grasos precursores (Cuyamendus *et al.*, 2015), al tiempo que comparten con los FitoP ciertas características de su estructura química como son la presencia de un anillo ciclopentano electrofílico y dos cadenas alquílicas, carboxilo y metilo terminales (**Figura 6**). Al igual que los FitoP, los FitoF son generados por reacciones oxidativas no enzimáticas, siendo la principal diferencia que los FitoF se generan en condiciones de presión parcial de oxígeno superiores (>21%), bajo las cuales se polarizan las rutas biosintéticas hacia su formación (Cuyamendus *et al.*, 2017).

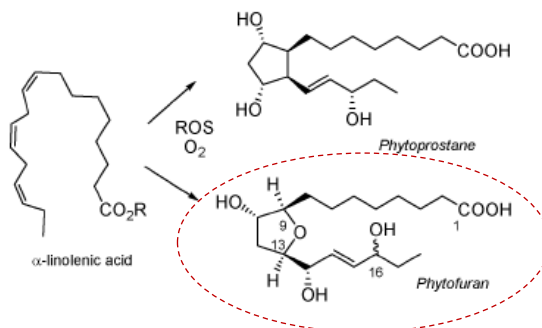


Figura 6. Estructura química representativa de la familia de los fitofuranos. Modificado de Cuyamendus *et al.*, 2015

Los FitoF son estructuralmente similares al ácido *cis*-(+)-12-oxo-fitodienoico (*cis*-OPDA) e inducen la expresión de un conjunto de genes que podrían estar involucrados en la síntesis de ácido jasmónico, con responsabilidades en varias vías relacionadas con una mayor respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico (Borrego & Kolomiets, 2016). Dichas vías modulan numerosos procesos cruciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas superiores, como el crecimiento

vegetativo, el ciclo celular, la biosíntesis de antocianos, el desarrollo de estambres y tricomas, la maduración de los frutos, la senescencia, la inhibición de la biosíntesis de rubisco, la apertura de estomas, la absorción de nitrógeno y fósforo y el transporte de glucosa (Ali & Baek, 2020). Las vías biosintéticas de los FitoF a partir del ALA puede generar dos clases de FitoF (alquenoil y enediol), cada una de las cuales comprende dos familias, lo que implicaría la potencial formación de hasta 128 isómeros de FitoF (Oger *et al.*, 2018).

2.3. PRESENCIA DE FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS EN LA DIETA

La dieta constituye la única fuente de FitoP y FitoF biodisponibles en humanos ya que los mamíferos carecen de la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar el precursor de estas moléculas (ALA) y, hasta el momento actual, no se tiene constancia de la síntesis de los propios FitoP y FitoF de forma endógena tras la ingesta de una fuente dietética de ALA (Chen *et al.*, 2013). En este sentido y dada la similitud estructural de estas oxilipinas vegetales con sus análogos animales (fundamentalmente con isoprostanos y prostaglandinas (IsoP y PG, respectivamente) se ha sugerido la posibilidad de que estos compuestos constituyan asimismo miméticos funcionales de las oxilipinas humanas (Barbosa *et al.*, 2015; Mueller *et al.*, 2004). Este hecho ha promovido un creciente interés por estudiar el perfil cuantitativo de los FitoP y FitoF en los alimentos (especialmente matrices de naturaleza oleosa o con un elevado contenido en ácidos grasos mono- y polinsaturados), así como los efectos que las condiciones agroambientales y el procesamiento de los alimentos vegetales y subproductos derivados ejercen sobre su concentración (Medina *et al.*, 2018). Por otro lado, la caracterización del perfil cuantitativo de FitoP y FitoF en alimentos vegetales proporciona una información esencial para el estudio de su biodisponibilidad, primer paso para la caracterización del efecto biológico de estas oxilipinas vegetales *in vivo* tras su ingesta dietética, a través de estudios preclínicos y clínicos.

Así, en 2015 se reportó por primera vez el perfil cuantitativo de FitoP en aceites comerciales de oliva y girasol, evidenciando que el girasol refinado se caracteriza por concentraciones entre 8 y 20 veces superiores en comparación con el aceite de oliva (AO) y el aceite de oliva virgen extra (AOVE), respectivamente (Collado-González *et al.*, 2015b). Estas diferencias resultan especialmente

relevantes dada la integración de estas matrices oleosas en hábitos dietéticos y el reconocimiento de propiedades singulares como alimentos/ingredientes saludables en el marco de la dieta mediterránea y más específicamente como promotores de la salud cardiovascular (Alemán-Jiménez *et al.*, 2021; Estruch *et al.*, 2013).

Asimismo, se ha caracterizado la presencia de FitoP y FitoF en otros alimentos vegetales fuertemente arraigados en el patrón dietético mediterráneo y sobre los que pesan atribuciones saludables en relación con la prevención de la patología cardiovascular. Este es el caso de la almendra, que mostró una elevada concentración de FitoP, al tiempo que se caracterizó el efecto del déficit hídrico (factor de estrés abiótico) sobre la concentración de estos compuestos, estableciendo una correlación directa (Lipan *et al.*, 2020). Por otro lado, un estudio reciente demostró que las nueces de los árboles de secano tenían concentraciones individuales y totales de FitoP más bajas que las que estaban bajo riego (Carrasco-Del Amor *et al.*, 2015).

Más recientemente, se ha estudiado la presencia de FitoP y FitoF en arroz y harina de arroz enfocando los diseños experimentales en el establecimiento del interés de esta matriz vegetal como fuente dietética de estas oxilipinas vegetales (Pincirolí *et al.*, 2017). Esta caracterización resulta de especial relevancia dada su distribución y consumo a nivel mundial. Por otro lado, el estudio de la presencia de FitoP y FitoF en cultivos de arroz sometidos a diversas condiciones de crecimiento y formas de procesado poscosecha permitió establecer relaciones entre el manejo del cultivo y la abundancia de FitoP y FitoF, indicando la utilidad de estos compuestos, no solo como potenciales compuestos bioactivos, sino también como marcadores de estrés vegetal y calidad alimentaria (Pincirolí *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha descrito su presencia en *Linum usitatissimum* (semillas de lino), *Salvia hispanica* L. (semillas de chía); *Pinus* sp. (pino, nueces) (Cuyamendous *et al.*, 2015), *Cucumis melo* (melón; hojas) (Yonny *et al.*, 2016), leguminosas (judía francesa y guisante) (García-García *et al.*, 2019), residuos de la producción de *Passiflora tripartita* var. *mollissima* (maracuyá bananero curuba) (Medina *et al.*, 2017), *Phoenix dactylifera* (fruto y subproductos de palmera datilera) (Medina *et al.*, 2020), en granos de cacao y residuos de cacao o café (León-Pérez *et al.*, 2019; Ruesgas-

Ramón *et al.*, 2019), o en *Physalis peruviana* (golden berry) (Medina *et al.*, 2019) demostrando la ubicuidad de estos compuestos en alimentos vegetales y por tanto el interés en la caracterización de las concentraciones en cada una de ellas como paso previo al estudio de su interés biológico.

De igual forma, Vigor *et al.* (2018) analizaron el perfil de FitoP y FitoF en macroalgas rojas y marrones, describiendo por primera vez la presencia de FitoF en las algas, al tiempo que establecieron por primera vez la relación existente el cambio del perfil de FitoP en respuesta a estrés oxidativo generado por factores ambientales.

En consecuencia, la amplia diversidad de matrices vegetales en las que se ha descrito la presencia de estos compuestos evidencia el interés de caracterizar su actividad biológica con la finalidad de entender la influencia relativa de dichos compuestos en los efectos beneficiosos para la salud atribuidos a los alimentos vegetales.

2.4 EFECTO DE LAS CONDICIONES AGRONÓMICAS EN EL PERFIL CUANTITATIVO DE FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como se ha sugerido en el apartado anterior, las condiciones medioambientales, las prácticas agronómicas y el procesado poscosecha influyen en la concentración de metabolitos secundarios de respuesta al estrés (compuestos bioactivos) de alimentos vegetales, incluidos FitoP y FitoF (Collado-González *et al.*, 2015b; Collado-González *et al.*, 2015c; Przybylska-Balcerek *et al.*, 2020). En este sentido, a pesar de que las limitaciones más relevantes asociadas a la producción agrícola se asocian a las pérdidas de rendimiento y la modificación del perfil nutricional debidas a las condiciones de estrés biótico y abiótico cada vez más extremas en el contexto actual de cambio climático (FAO, <https://www.fao.org/3/i6030e/i6030e.pdf>, consultada en septiembre de 2022), esta situación influye también en el perfil cuantitativo de compuestos fitoquímicos bioactivos y consecuentemente en la actividad biológica de los mismos, lo que condiciona los beneficios para la salud humana de los alimentos vegetales respecto de los esperables en condiciones de cultivo y producción óptimas (Asseng *et al.*, 2018). Esta situación en relación con los FitoP y FitoF ha sido abordada por diferentes estudios referidos a continuación.

Así, Carrasco-Del Amor *et al.* (2015) analizaron el perfil cuantitativo y cualitativo de FitoP en diferentes cultivos de almendro (convencional, ecológico, de secano y de riego), concluyendo que las condiciones del cultivo ecológico, bajo las cuales las plantas se encuentran sometidas a mayor estrés biótico y abiótico al prescindir del uso de fertilizantes y plaguicidas industriales, aumentaba la síntesis de D₁-FitoP, mientras que las almendras procedentes de cultivos de secano presentaron menores concentraciones de FitoP. Esta relación entre el estrés abiótico y los niveles de oxilipinas vegetales fue confirmada posteriormente en investigaciones adicionales sobre otros cultivos, como el realizado por Collado-González *et al.* (2015b) que mostraron por primera vez el aumento de los niveles de FitoP que produce el déficit hídrico en la composición del AOVE (aumento directamente proporcional al déficit hídrico aplicado). Simultáneamente se estableció que el contenido de FitoP en la pulpa de las aceitunas crudas y procesadas aumentó significativamente (Collado-González *et al.*, 2015c). De igual forma, las legumbres también mostraron modificaciones en el perfil y en la concentración de FitoP y FitoF. Dichos niveles aumentaron de forma significativa al inducir estrés abiótico por déficit de riego (García-García *et al.*, 2020).

Por otro lado, Pinciroli *et al.* (2018) enriqueció los granos de arroz con pulverizaciones foliares de ácido salicílico lo que produjo una reducción de la concentración de FitoP y FitoF, presumiblemente debido a la reducción de estrés abiótico en las plantas de arroz por disponer de un microambiente más propicio para el crecimiento y desarrollo vegetal.

De las evidencias reportadas en los últimos años en relación con el efecto de los factores precosecha en los niveles de FitoP y FitoF se puede concluir que las condiciones agronómicas son un factor muy relevante en la formación y concentración final de las mismas.

2.5 EFECTO DEL PROCESADO Y LA CONSERVACIÓN EN EL PERFIL CUANTITATIVO DE FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS EN ALIMENTOS VEGETALES

El procesado de las producciones agrícolas hace referencia a la transformación de materias primas en alimentos, o de una forma de alimento en otras más adecuadas para el consumo humano (MacDonald & Reitmeier, 2017). Las técnicas de procesado han variado a lo largo del tiempo dependiendo de distintos

factores que incluyen la naturaleza de las materias primas, las características tecnológicas del proceso productivo, y las propiedades del producto final (Khan *et al.*, 2018). Aunque la tendencia actual va encaminada hacia el aumento del consumo de alimentos mínimamente procesados, no siempre se pueden eludir algunas fases de transformación, ya que estas, entre otros objetivos, están enfocadas en garantizar la seguridad alimentaria, contribuyendo a disminuir los residuos generados y prevenir la pérdida de calidad del alimento, manteniendo sus propiedades nutricionales o evitando la contaminación microbiológica y química de los mismos (Al-juhaimiet *al.*, 2018).

Desde una perspectiva fitoquímica, es necesario considerar el efecto que las diferentes metodologías de procesado ejercen sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos, así como sobre las características fisicoquímicas de la matriz alimentaria que, a la postre, condicionará la bioaccesibilidad de los compuestos de interés y su absorción intestinal (Espín *et al.*, 2007). En este sentido, el procesado de los alimentos vegetales influye en la bioaccesibilidad de los compuestos fitoquímicos (incluidos los FitoP y FitoF) principalmente a través de cambios en la estructura y propiedades de las unidades celulares que constituyen los alimentos vegetales (Berry *et al.*, 2008).

Por otro lado, el tipo de procesado puede influir en el contenido de FitoP aumentando o disminuyendo su concentración. Un claro ejemplo lo encontramos en el estudio de Carrasco-Del Amor, donde las condiciones de procesado en almendra (fritura y tostado) disminuyeron considerablemente la concentración inicial de los FitoP, en tanto que en el caso de las nueces (fritas en sal) se generó un aumento de la concentración de estos compuestos (Carrasco-Del Amor, 2016). Estas descripciones evidenciaron que el sometimiento de la matriz vegetal a altas temperaturas puede modificar la eficiencia de las reacciones de oxidación de ácidos grasos necesarias para la formación de FitoP, pero que el sentido de esta modificación dependerá de factores adicionales relacionados con la matriz en cuestión, tales como las características fisicoquímicas o el contenido en ácidos grasos, entre otros (Thoma *et al.*, 2003).

Además, Collado-González *et al.*, (2015b) identificó FitoP libres en aceite de oliva y girasol, observando que el aceite de girasol refinado proporcionó 20 veces más FitoP que el AOVE y 8 veces más que el AOB (mitad virgen extra y mitad aceite de oliva refinado). Este hecho podría estar relacionado con el proceso de refinado

al que son sometidas las diferentes matrices, sugiriendo que el proceso de fabricación resulta clave para la diferente producción de FitoP, ya que la mayoría de los aceites vegetales se someten a un tratamiento de refinado que varía en función de las características de la materia prima original.

Sin embargo, no solamente los procesos térmicos influyen en la formación de FitoP en los alimentos procesados de origen vegetal. En este sentido, Marhuenda *et al.* (2015) describieron el contenido de FitoP en el vino tinto y el mosto al tiempo que reportaron modificaciones en el perfil de dichas oxilipinas durante el proceso de vinificación y crianza, concluyendo que estas fases pueden ser relevantes para la definición de los niveles finales de FitoP, favoreciendo la formación de especies prooxidantes.

El análisis progresivo del efecto de diferentes condiciones de procesado y conservación en la concentración de oxilipinas vegetales en relación con alimentos vegetales sólidos y líquidos proporcionará evidencias adicionales para, una vez establecida la bioactividad y el efecto sobre la salud de estos compuestos, establecer las condiciones óptimas de procesado que garantice una mayor bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los mismos.

3. BIODISPONIBILIDAD DE OXILIPINAS VEGETALES

En el ámbito de la nutrición son esenciales los estudios sobre la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos (nutrientes y no nutrientes) presentes en alimentos, ya que a través de ellos es posible establecer correlaciones entre los diferentes componentes alimentarios y las actividades biológicas asociadas a un alimento (Fernández-García *et al.*, 2013). En este sentido, dilucidar el grado de asimilación de compuestos bioactivos presentes en los alimentos resulta básico a la hora de esclarecer los efectos sobre la salud de dichas moléculas. De hecho, esta característica, la biodisponibilidad, es clave en relación con compuestos que han despertado el interés en base a su capacidad para ejercer un efecto beneficioso en el organismo. Esta información es clave para la identificación de alimentos saludables y/o funcionales, así como para el reconocimiento de las declaraciones de salud de los componentes alimentarios. Adicionalmente, el conocimiento de la naturaleza química de los metabolitos circulantes conduce a la comprensión de los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos presentes en los alimentos (Rein *et al.*, 2013).

Es importante entender que la biodisponibilidad no solamente engloba la absorción, distribución, metabolismo y excreción de una molécula, sino que recientemente, se ha incluido en este concepto la bioaccesibilidad. Esta hace referencia a la fracción de un compuesto determinado que es extraído de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal y conserva su estructura y funcionalidad, estando disponible para su absorción a través del epitelio intestinal y el desarrollo de sus capacidades funcionales en los distintos tipos celulares y tejidos (Carbonell-Capella *et al.*, 2014; Fernández, 2020; Fernández-García *et al.*, 2009). Durante el proceso de digestión los diversos componentes de los alimentos ingeridos son transformados en compuestos más sencillos, susceptibles de ser absorbidos y utilizados por las células para satisfacer sus necesidades estructurales y metabólicas. La transformación de los alimentos en sustancias absorbibles se lleva a cabo por mecanismos mecánicos, químicos y enzimáticos. Así, durante la digestión tienen lugar dos procesos fundamentales y simultáneos: (i) transformaciones mecánicas que reducen el tamaño de partícula de los alimentos;

y (ii) transformaciones químicas y enzimáticas donde los macro y micro nutrientes así como los compuestos fitoquímicos no nutrientes se extraen de la matriz alimentaria y, en mayor o menor medida, se hidrolizan en compuestos más pequeños para ser absorbidos (Paz, 2019; Soto, 2016). Por ello, hoy en día se considera que el estudio de la bioaccesibilidad es fundamental para el establecimiento de las alegaciones de salud.

La digestión comienza con la deglución en la cavidad oral de los alimentos, donde la masticación y las secreciones salivares se transforman en sustancias esenciales que se convierten en el llamado bolo alimenticio. Dicho bolo se dirige al esófago gracias al peristaltismo de sus paredes, ayudando en su descomposición y permitiendo la entrada en el estómago. La presencia de alimentos en el estómago estimula la secreción ácida, gracias a las bombas de protones, disminuyendo el pH a unos valores de ≈ 3 que se mantendrán a lo largo de la fase gástrica de la digestión. En el estómago los alimentos se transforman en una papilla pastosa y ácida llamada quimo. Cuando la descomposición de la matriz alimentaria alcanza un tamaño lo suficientemente pequeño, el quimo atraviesa el píloro hacia el intestino delgado. El quimo ácido se neutraliza con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) hasta alcanzar un pH de ≈ 7 , óptimo para las enzimas pancreáticas (Kalantzi *et al.*, 2006). Para una mayor eficiencia en la fase intestinal de la digestión, así como para la absorción óptima de nutrientes es esencial el contacto del alimento con las paredes intestinales, por ello los numerosos pliegues, así como las microvellosidades son cruciales, pues amplifican la superficie de absorción de los enterocitos (Walton *et al.*, 2018). Las sustancias parcialmente digeridas y no absorbidas en el intestino delgado se dirigen al intestino grueso. Así, las funciones principales del colón en relación con la digestión y asimilación de nutrientes incluyen: (i) la absorción de agua y electrolitos, (ii) la fermentación de polisacáridos y proteínas por microbiota colónica, (iii) la reabsorción de sales biliares y (iv) la formación, almacenamiento y eliminación de heces (Guerra *et al.*, 2012).

Si bien el efecto de la digestión se ha estudiado fundamentalmente en relación con la asimilación de nutrientes esenciales para el normal desarrollo de los procesos biológicos celulares, en los últimos años y en paralelo a la caracterización de compuestos fitoquímicos bioactivos no nutrientes y su interés en relación con la salud humana, diversos estudios se han enfocado en analizar cómo influyen los

procesos digestivos en su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. Al igual que ocurre con los nutrientes, las condiciones fisicoquímicas asociadas a la digestión gastrointestinal suponen un factor significativo en la liberación de dichos compuestos bioactivos (Porrini & Riso, 2008; Parada & Aguilera, 2007). Por lo tanto, estos compuestos, dependiendo de sus características químicas tienen la capacidad de producir diferentes tipos de interacciones que pueden condicionar su liberación de la matriz alimentaria y absorción (Karg *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2018). En términos generales, una alta biodisponibilidad implica una mayor capacidad de interacción de los compuestos bioactivos presentes en los alimentos (nutrientes y no nutrientes) con dianas moleculares y así, de modulación de procesos bioquímicos y rutas de señalización celular como mecanismo para modular la salud. Por ello, solo al comprender los mecanismos y la eficiencia de los procesos de absorción es posible desarrollar estrategias para mejorar su biodisponibilidad y la obtención de mayores beneficios.

Específicamente relacionado con los FitoP y FitoF, nuevamente, sus efectos biológicos dependen de la capacidad para alcanzar las células y tejidos diana donde van a realizar su función. Como referimos anteriormente de forma genérica, en relación a las oxilipinas vegetales esta capacidad está limitada por su estabilidad ante las condiciones fisicoquímicas características del proceso de digestión gastrointestinal y su capacidad para ser absorbidos por los diversos mecanismos existentes y que dependen de las propiedades químicas de las moléculas de interés (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020).

Dada la importancia de los procesos biológicos implicados en la asimilación de compuestos bioactivos, frecuentemente y especialmente en relación con la caracterización de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de moléculas de nueva identificación (como es el caso de los FitoP y FitoF), estas caracterizaciones se realizan, en primera instancia, con recurso a métodos *in vitro* que simulan, en condiciones de laboratorio, el proceso de digestión gastrointestinal y se conocen como modelos gastrointestinales (GIM). En este sentido, dado que investigaciones recientes han suscitado el interés en las oxilipinas vegetales como nuevos compuestos bioactivos acerca de los cuales la información disponible está prácticamente restringida a su identificación y cuantificación en diversas matrices alimentarias, resulta necesaria la caracterización de su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Barden *et al.*, 2009). La aplicación de los referidos modelos *in*

in vitro permite reproducir las condiciones fisiológicas de las fases oral, gástrica e intestinal de la digestión y la subsecuente absorción, permitiendo estimar el comportamiento *in vivo* tras ser ingeridos a través de matrices alimentarias con características específicas (Gutermuth *et al.*, 2007). Los escasos estudios sobre bioaccesibilidad y biodisponibilidad de FitoP y FitoF reportados actualmente se han llevado a cabo a través de métodos estandarizados de digestión *in vitro* mostrando un efecto inmunitario contra ciertos tipos de cáncer y efectos vasculares (Berndorf *et al.*, 2008; Collado-González *et al.*, 2015; Gutiérrez-Pajares *et al.*, 2019; Karg *et al.*, 2007; Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). De hecho, Martínez-Sánchez *et al.* (2020) destacaron la imposibilidad de proporcionar datos generales acerca de la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de las oxilipinas vegetales, siendo estas dependientes de las características químicas de cada FitoP y FitoF.

Adicionalmente, es necesario esclarecer el grado de asimilación de estos compuestos. Las investigaciones realizadas hasta la fecha en relación con la biodisponibilidad de FitoP y FitoF han revelado que los FitoP se absorben a nivel intestinal (*p.e.*, F₁-FitoP) (Martínez *et al.*, 2020), no existiendo actualmente evidencias acerca de la biodisponibilidad de los FitoF. Tras la absorción los FitoP se distribuyen orgánicamente a través del torrente sanguíneo, donde están presentes en forma conjugada, para excretarse finalmente a través de la orina como compuestos libres (Martínez *et al.*, 2020). En este sentido, Barden *et al.* (2009) analizaron el efecto del aceite de semilla de lino, el cual contiene ácido araquidónico; examinaron a treinta y seis no fumadores, de 20 y 65 años, que consumieron 9 g/día de aceite de semilla de lino o aceite de oliva (placebo) durante 4 semanas. Observaron el efecto de una dieta complementada con aceite de linaza en la concentración de F₁-FitoP y F₂-IsoP en la orina y el plasma de hombres sanos. Dicho estudio confirmó la absorción de FitoP por el tracto intestinal. La mayor concentración plasmática de F₁-FitoP en el grupo de aceite de linaza probablemente fue el resultado de un aumento en la concentración plasmática del sustrato ALA que conlleva una mayor concentración de FitoP del aceite de linaza.

Por otro lado, y estrechamente relacionado con la biodisponibilidad, recientemente se ha sugerido que el metabolismo y los efectos biológicos de estos compuestos en el ser humano se encuentran estrechamente relacionados con el metabolismo de la microbiota intestinal, lo que podría dar lugar a compuestos

adicionales con distinto interés biológico (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). No obstante, el efecto del metabolismo de la microbiota intestinal sobre las oxilipinas vegetales se encuentra escasamente estudiado en la actualidad.

Todas estas conclusiones han impulsado la reevaluación de los alimentos que contienen altas concentraciones de FitoP y FitoF en lo que respecta a sus funciones biológicas dependientes de las oxilipinas (*p.e.*, inmunomoduladora), lo que podría proporcionar un apoyo teórico al diseño de nuevos alimentos promotores de la salud.

4. CITOTOXICIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS OXILIPINAS VEGETALES

El interés suscitado por los FitoP y los FitoF está relacionado, no sólo con la fisiología de las plantas, sino también con las actividades biológicas que, potencialmente, son capaces de desarrollar en los seres humanos tras su asimilación intestinal (Barden *et al.*, 2009). En este sentido, la hipótesis de la funcionalidad biológica de estos compuestos se basó en su analogía estructural con las oxilipinas humanas (isoprostanos y prostaglandinas) (Medina *et al.*, 2017a). Las diversas investigaciones realizadas para confirmar esta hipótesis han proporcionado evidencias de que estos derivados lipídicos pueden modificar las funciones de los sistemas inmunitario (Durand *et al.*, 2011) y nervioso (Minghetti *et al.*, 2014). En este sentido, se han recabado evidencias acerca de la capacidad de los FitoP de activar el factor de transcripción Nrf2 (factor nuclear eritroide-2) (Heiss *et al.*, 2014). Este factor de transcripción es un regulador emergente de la resistencia celular a los agentes oxidantes y por tanto contribuye a prevenir el estrés oxidativo, ya que controla e induce la expresión de la respuesta antioxidante. En consecuencia, la activación de Nrf2 contribuye a los beneficios de los productos naturales debido a las interacciones de diferentes compuestos bioactivos (flavonoides, otros polifenoles y FitoP, entre otros) (Waltenberger *et al.*, 2016).

El análisis de las funciones biológicas de FitoP individuales específicos, Minghetti *et al.* (2014) describieron que B₁-FitoP eran biológicamente activos *in vitro* en células inmaduras del sistema nervioso central, mostrando efectos neuroprotectores contra la lesión oxidativa inducida por el peróxido de hidrógeno, y promoviendo la mielinización a través de mecanismos que implican la activación de receptores. Por otro lado, Karg *et al.* (2007) describieron la actividad antiinflamatoria de los FitoP A₁ y J₁ en un modelo de riñón embrionario humano y en macrófagos murinos. Dicha actividad está mediada por la inhibición del factor NF-κB y la síntesis de óxido nítrico (NO). También relacionado con la actividad antiinflamatoria, Leung *et al.* (2021), en un estudio *in vivo* diseñado alimentando ratas Sprague Dawley (SD) con una dieta rica en nueces con el fin de comprender

mejor la actividad biológica que presentaban los FitoP y FitoF, elaboraron un perfil de los PUFAs n-6 y n-3, así como de los mediadores lipídicos relacionados en los tejidos del hígado y del corazón utilizando lipidómica dirigida. De esta forma, describieron por primera vez que el ALA de la nuez aumentó los niveles de PUFAs n-3 así como sus metabolitos FitoP y FitoF en los tejidos del hígado y del corazón. Además, dicho ácido elevó los mediadores lipídicos antiinflamatorios y redujo los inflamatorios, lo que sugiere una actividad biológica preventiva de numerosas enfermedades que cursan con inflamación.

En relación con la actividad inmunomoduladora, Guterth *et al.* (2007) caracterizaron la capacidad de los FitoP E₁ y F₁ de polarizar el perfil de citoquinas inmunomoduladoras derivando la respuesta Th1 hacia Th2 *in vivo*, es decir, inhibieron notablemente la proliferación de células T inducida por el antígeno. En relación con esta potencialidad biológica, el E₁-FitoP, uno de los FitoP más abundantes en el polen, favorece la respuesta inmune mediante la modulación de las células dendríticas (Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005). Recientemente, Minghetti *et al.*, (2014) informaron de que las 16-B₁-FitoP, a través de nuevos mecanismos que implican a PPAR- γ , pueden afectar específicamente a las células cerebrales inmaduras, como los neuroblastos y los progenitores de oligodendrocitos.

En relación con la actividad antitumoral de estas oxilipinas vegetales, Gutiérrez-Pajares *et al.*, (2020) estudiaron la supervivencia celular y la motilidad de las células de cáncer de mama y evaluaron las actividades citotóxicas, de quimiosensibilización y antimigratorias de siete FitoP y un FitoF *in vitro*. En dicha investigación, mostraron que *ent-9-L₁*-FitoP fue el único con actividad citotóxica contra ambas líneas celulares.

Por otro lado, se han detectado oxilipinas vegetales en la avellana chilena, la cual presenta una actividad biológica no sólo antioxidante, sino inhibidora de enzimas proinflamatorias asociadas al síndrome metabólico (Pino *et al.*, 2019).

Todas estas evidencias muestran que las oxilipinas vegetales son candidatas para formar parte de numerosas aplicaciones en cuestiones de salud tales como antioxidantes alimentarios, tratamientos preventivos y/o terapéuticos. Todo ello debido a la favorable actividad biológica que presenta y a la ausencia de citotoxicidad, lo que ha despertado un gran interés en el ámbito de estudios de investigación en Tecnología de los Alimentos y Nutrición.

5. PRINCIPALES ENFERMEDADES LIGADAS A LA INFLAMACIÓN

En los últimos años se han reportado numerosas evidencias acerca de la modulación de los procesos inflamatorios por parte de nutrientes y componentes alimentarios no nutritivos (Julià *et al.*, 2021; Zitvogel *et al.*, 2017). La inflamación, mediada por el sistema inmunitario, es la primera respuesta que emplea el cuerpo humano ante cualquier amenaza o desequilibrio homeostático. En un estado de aptitud inmunitaria, la respuesta inflamatoria está contenida en el tiempo y el espacio, estando programada para resolverse, es decir, volver del estado infectado o lesionado a un estado “sano” correspondiente al del tejido pre-inflamado. Una falla en las vías pro-resolución puede prolongar en el tiempo las acciones de los mecanismos proinflamatorios dando como resultado una inflamación prolongada o crónica con exacerbaciones recurrentes, responsable a largo plazo del daño tisular excesivo y la patología (Barning *et al.*, 2019).

En términos generales el sistema inmunitario innato, ante la invasión de patógenos extraños o daño tisular, se activa inmediatamente en respuesta a moléculas que llevan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados a daños (DAMP), recluta granulocitos en el tejido lesionado para eliminar patógenos, produciendo mediadores inflamatorios. Dichos mediadores incluyen las citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y mediadores de lípidos como PG y leucotrienos, provocando un proceso inflamatorio agudo (de horas a días).

La inflamación aguda se resuelve y el tejido se repara cuando se eliminan los PAMP, los DAMP, los patógenos y los tejidos dañados. El reclutamiento de granulocitos cesa con una regulación a la baja hasta que son eliminados por eferocitosis.

La inflamación se encuentra altamente regulada por multitud de mediadores y reguladores que comprenden factores de crecimiento, citoquinas, complemento, eicosanoides (PG, tromboxanos (TX)) y péptidos. El descubrimiento de dichos mediadores ha generado un gran avance para comprender la regulación básica del proceso inflamatorio, así como para desentrañar su ambigüedad asociada con diversas enfermedades (Megha *et al.*, 2021).

La inflamación no resuelta y descontrolada puede provocar el desarrollo de varias enfermedades cardiovasculares, cáncer, artritis reumatoide, enfermedad periodontal, asma, diabetes, trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer y enfermedades inflamatorias del intestino (EII). La incidencia tanto de las enfermedades provocadas por inflamación aguda como aquellas surgidas de la inflamación crónica es elevada.

Así, las patologías ligadas a los procesos inflamatorios con mayor incidencia se resumen a continuación.

5.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares o cardiovasculopatías incluyen un conjunto de afecciones del corazón y de los vasos sanguíneos, siendo las más comunes: la hipertensión arterial, la cardiopatía coronaria (angina de pecho e infarto de miocardio), la enfermedad y el accidente cerebrovascular (ictus), la vasculopatía periférica, la insuficiencia cardíaca, la cardiopatía reumática, la cardiopatía congénita y las miocardiopatías.

La enfermedad cardiovascular se encuentra asociada a la inflamación, probablemente debido a la estrecha interacción de la inflamación con el estrés oxidativo. La disfunción endotelial producida en la enfermedad cardiovascular promueve la activación de los trombocitos, la vasoconstricción, la activación/infiltración de leucocitos y la proliferación de células del músculo liso (grosor íntima-media) en la pared del vaso. Esta disfunción sirve como predictor temprano para el desarrollo de aterosclerosis, hipertensión y futuros eventos cardiovasculares. Recientemente, se han identificado tres actores clave interdependientes en el proceso de envejecimiento vascular que pueden desencadenar una disfunción endotelial: alteración de la señalización del óxido nítrico, estrés oxidativo e inflamación (El Assar *et al.*, 2013; Steven, *et al.*, 2019).

La inflamación se genera en respuesta a la lesión tisular, el organismo inicia una cascada de señalización que estimula una serie de respuestas destinadas a la reparación de los tejidos afectados a través de la inflamación, las cuales y según su origen pueden ser plasmáticas, celulares o derivadas de microorganismos invasores. Algunos de estos mediadores están preformados y se almacenan en gránulos citoplasmáticos que se liberan con rapidez ante el estímulo inflamatorio. Los más comunes son la histamina, secretada por los mastocitos; el óxido nítrico (NO), los neuropéptidos, citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), los leucotrienos, el factor activador de plaquetas, las quimiocinas o mediadores lipídicos como las prostaglandinas, contribuyendo a amplificar la respuesta inflamatoria (Muller, 2014; Collado, 2015).

Durante el proceso inflamatorio, las células fagocíticas activadas, como los neutrófilos y los macrófagos, producen grandes cantidades de ROS con el fin de eliminar a los agentes invasores. En condiciones inflamatorias patológicas, puede haber una generación exagerada de especies reactivas y algunas de estas pueden propagarse fuera de las células fagocíticas y, por lo tanto, inducir estrés oxidativo localizado y la consiguiente lesión tisular (Biswas, 2016). Los aumentos pronunciados de los niveles de ROS se han relacionado con el inicio, la progresión y las consecuencias clínicas de las enfermedades cardiovasculares, incluidas la aterosclerosis, la hipoxia-reoxigenación, la lesión por isquemia-reperfusión, la enfermedad cardíaca y vascular diabética, la arritmia, el infarto de miocardio, la hipertrofia cardíaca, la miocardiopatía, la insuficiencia cardíaca y la hipertensión sistémica y pulmonar. Se ha demostrado que los factores de riesgo comunes para las enfermedades cardiovasculares, como son el envejecimiento y la inflamación, así como la exposición a factores externos como medicamentos, toxinas y contaminantes del aire, aumentan la carga de ROS en el cuerpo (Brown & Griendling, 2015 ; Kietzmann *et al.*, 2017; Zhang & Shah, 2014).

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte en el mundo, con 17,5 millones de fallecimientos al año (Amgen, 2020). También lo es en España, donde 122.426 personas fallecieron por esta causa en 2017, lo que supuso el 29% de los decesos totales (INE, 2017). La Organización Mundial de la Salud estimó que las ECV serían responsables de más de 23 millones de muertes para 2030 (Wang *et al.*, 2021).

Según los datos de las estimaciones del Estudio de la Carga Global de la Enfermedad (Global Burden Disease) en 2019, los casos prevalentes de ECV totales casi se duplicaron de 271 millones en el año 1990 a 523 millones en 2019. El número de muertes por ECV aumentó de forma constante de 12,1 millones en 1990, llegando a 18,6 millones en 2019. Las enfermedades cardiovasculares han sido la causa de 6,2 millones de muertes en personas de 30 y 70 años en 2019 (Roth *et al.*, 2020).

5.2 CÁNCER

La inflamación predispone al desarrollo de cáncer y promueve todas las etapas de la tumorigénesis. Las células cancerosas, así como las células estromales e inflamatorias circundantes, participan en interacciones recíprocas bien orquestadas para formar un microambiente tumoral inflamatorio. A diferencia de la cicatrización de heridas y las infecciones, que se resuelven después del reclutamiento de células inmunitarias y la proliferación de células epiteliales, los

tumores en crecimiento se presentan con estrés persistente derivado de oncogenes, muerte celular y señales microbianas que, en conjunto, alimentan un circuito de señalización inducida por inflamación y células inflamatorias (Greten & Grivennikov, 2019).

En 2017, se produjeron 24,5 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo y 9,6 millones de muertes a causa de dicha enfermedad, resultando en 233,5 millones de AVAD. A nivel mundial, las probabilidades de desarrollar cáncer a lo largo de la vida (de 0 a 79 años) son de 1 cada 3 para los hombres y de 1 cada 4 para las mujeres (Global Burden of Disease Cancer Collaboration, 2019).

En Europa, la incidencia de nuevos casos de cáncer en el año 2020 fue de 4,0 millones para todos los tipos de cáncer excepto el cáncer de piel no melanoma) y 1,9 millones de muertes por cáncer (Dyba *et al.*, 2021). En 2021, en España, se registraron 285.530 casos nuevos según cifras de la Asociación Española contra el Cáncer, resultando un 2,36% más respecto al año anterior (EpData, 2021). Hay que añadir, que la pandemia de la COVID-19, ha afectado al número de diagnósticos de cáncer en muchos países por lo que probablemente el número real de cánceres diagnosticados en 2020 habrá sido menor. Las estimaciones a nivel mundial indican también que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas a 30,2 millones de casos nuevos al año en 2040 (Sociedad Española de Oncología Médica, 2021).

5.3 ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

La enfermedad respiratoria compite con la posición de la principal causa de muerte en todo el mundo. La inflamación parece ser el principal contribuyente a la progresión de las enfermedades pulmonares. En Europa, la enfermedad pulmonar representa el 15% de todas las muertes.

A nivel mundial, cuatro de las diez principales causas de muerte están relacionadas con enfermedades respiratorias. La EPOC resultó ser la tercera causa de muerte, seguida de las infecciones de las vías respiratorias bajas como la cuarta, el cáncer de pulmón como la quinta y la tuberculosis como la décima (WHO, 2014).

Por otro lado, es necesario señalar que las enfermedades respiratorias de origen alérgico (asma, rinitis alérgica y poliposis nasal) son ocasionadas por interacciones celulares y citoquinas (Wenzel, 2016). Así, ante la presencia de un alérgeno en la mucosa respiratoria, las células epiteliales y las interleucinas secretan citoquinas. De esta forma, la respuesta eosinofílica provoca hipersecreción de moco epitelial, broncoconstricción y remodelación de las vías respiratorias, siendo las PG partícipes en todas las etapas de la reacción alérgica (Lee *et al.*, 2020; Samuchiwal & Boyce, 2018).

5.4 TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

La neuroinflamación y la disfunción mitocondrial son características comunes de las enfermedades neurodegenerativas crónicas del sistema nervioso central (Fischer & Maier, 2015).

En todo inicio de patología neurológica se produce la llamada neuroinflamación, siendo esta un sistema que utiliza el cerebro como respuesta inmunitaria ante daños e infecciones. Un daño neuronal prolongado produce la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los astrocitos y la microglía, lo que lleva al reclutamiento del sistema inmunitario y al desarrollo de una reacción inflamatoria local. Además, la microglía activada y los astrocitos pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS), un importante mecanismo de defensa contra la infección microbiana, que puede, sin embargo, contribuir a la neurodegeneración (Schieber & Chandel, 2014; Hsieh & Yang, 2013).

En el año 2016, los trastornos neurológicos fueron a nivel mundial la principal causa de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) (276 millones de personas) y la segunda causa de muerte (9,0 millones de personas). El número absoluto de muertes y AVAD de todos los trastornos neurológicos combinados aumentó en un 39% para los fallecimientos y un 15% para los AVAD (Neurology Collaborators, 2019).

5.5 ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

En la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) se produce una pérdida de la integridad de la propia barrera intestinal, con la consiguiente activación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Se halla una síntesis intensa de mediadores proinflamatorios (leucotrienos y prostaglandinas), así como de citocinas y quimiocinas (Pascoal *et al.*, 2022).

La incidencia de la EII ha aumentado en los últimos años y actualmente afecta aproximadamente a 1 de cada 200 personas en los países desarrollados. En Europa, la EII tiene una prevalencia de 2,5 a 3 millones de personas (Šimurina *et al.*, 2019).

6. OXILIPINAS HUMANAS Y SU RELACIÓN CON LA FISIOPATOLOGÍA INFLAMATORIA

El término "oxilipina" se refiere a aquel lípido bioactivo generado por la oxidación de ácidos poliinsaturados (PUFA) como el ácido araquidónico (C20:4 n-6, AA), el ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA). Son formados a través de la fosfolipasa A2 presente en los fosfolípidos de la membrana para luego ser metabolizados por vía enzimática y no enzimática (Burke & Dennis 2009; Chen & Zhang, 2019). A través de la vía enzimática participan las enzimas ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX) y el citocromo P450 (CYP) dando lugar a las prostaglandinas, mientras que por la vía no enzimática y en presencia de ERO se producen isoprostanos e isofuranos.

Las oxilipinas siguen un esquema general de biosíntesis y señalización (Figura 7).

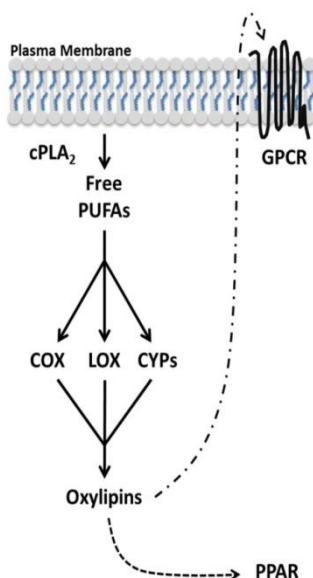


Figura 7. Biosíntesis y señalización de las oxilipinas humanas. La enzima fosfolipasa A₂ cataliza la escisión de los ácidos grasos poliinsaturados dando lugar a PUFAs libres, los cuales son metabolizados por COX, LOX y CYP en oxilipinas humanas. El proliferador de peroxisomas (PPAR) modula la síntesis de oxilipinas junto con los receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

Debido a la potencia y la vida media corta de la mayoría de las oxilipinas, no se almacenan sino que se sintetizan *de novo* de una manera estrictamente regulada (Tourdot *et al.*, 2014). En general, las oxilipinas de PUFA ω -6 tienden a ser proinflamatorias, mientras que las oxilipinas de PUFA ω -3 se consideran antiinflamatorias y favorables a la resolución.

6.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS OXILIPINAS HUMANAS EN PROCESOS INFLAMATORIOS

Como se ha podido observar a lo largo del trabajo, las oxilipinas humanas incluyen cientos de moléculas estructuralmente diferentes que están involucradas en una variedad de procesos fisiológicos (Shearer & Newman, 2009) entre los que destacan los procesos inflamatorios.

La resolución de la inflamación es un proceso activo regulado por mediadores y vías de señalización para prevenir el desarrollo de la inflamación. Los productos de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados generados en reacciones no enzimáticas y enzimáticas (isoprostanos e isofuranos y eicosanoides respectivamente) tienen una potente influencia en los procesos de inflamación.

El proceso de síntesis de eicosanoides está regulado al alza por estímulos inflamatorios mediante la activación enzimática (por ejemplo, de la fosfolipasa A2, que libera ARA de los fosfolípidos de membrana) y la regulación al alza de la expresión de los genes que codifican las enzimas. Muchas terapias antiinflamatorias, como los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los inhibidores de la COX, se dirigen al metabolismo de los ARA, lo que indica la íntima relación del metabolismo de los ARA con los procesos inflamatorios.

Por lo general, en fases tempranas de la inflamación existe un cambio en el metabolismo del AA que va desde la síntesis de leucotrienos a la formación de lipoxina. La movilización local de omega-3 ocurre seguida de la producción de SPM (“mediadores pro-resolutivos de la inflamación especializados”). A medida que estos mediadores se producen, los macrófagos y mastocitos transportan el exceso de neutrófilos junto con los restos celulares que resultan de los patógenos y/o defensas del hospedador.

Las oxilipinas son la base de la iniciación de los signos cardinales de la inflamación: calor, rubor, edema y dolor. Ante esta respuesta vascular los leucocitos son reclutados hacia el lugar de la lesión gracias a la PGE2 y PGI2 (actúan sobre las células vasculares y el flujo sanguíneo) y al leucotrieno B4 (involucrado en la quimiotaxis y adhesión celular). Dichas moléculas estimulan la

quimiotaxis de los neutrófilos hacia los tejidos para fagocitar y neutralizar a los invasores. Seguidamente, el complejo neutrófilo-monocito produce un cambio en el perfil de los mediadores lipídicos secretándose lipoxinas (con actividad antiinflamatoria y pro-resolutiva), dando lugar al final del proceso de respuesta inflamatoria aguda. Los macrófagos fagocitan neutrófilos por eferocitosis y, tras esto, se restablece la estructura normal del tejido llegando así a la fase de resolución (Serhan, 2014). Se habla de resolución de la inflamación como aquel periodo que culmina con la homeostasis del tejido dañado o bien aquella etapa que abarca desde el recuento de neutrófilos en el tejido hasta la ausencia completa de dichos leucocitos en la zona afectada. Por tanto, la inflamación es un proceso activo, evidenciado por la activación de las distintas vías de señalización durante la fase de resolución. La acción de estas células y su dilatación en el tiempo ha permitido establecer índices cuantitativos que definen los cambios precisos en el tráfico de leucocitos y en las vías bioquímicas las cuales se activan en las zonas inflamadas permitiendo determinar el impacto de los distintos mediadores endógenos y exógenos (Ávila, 2014).

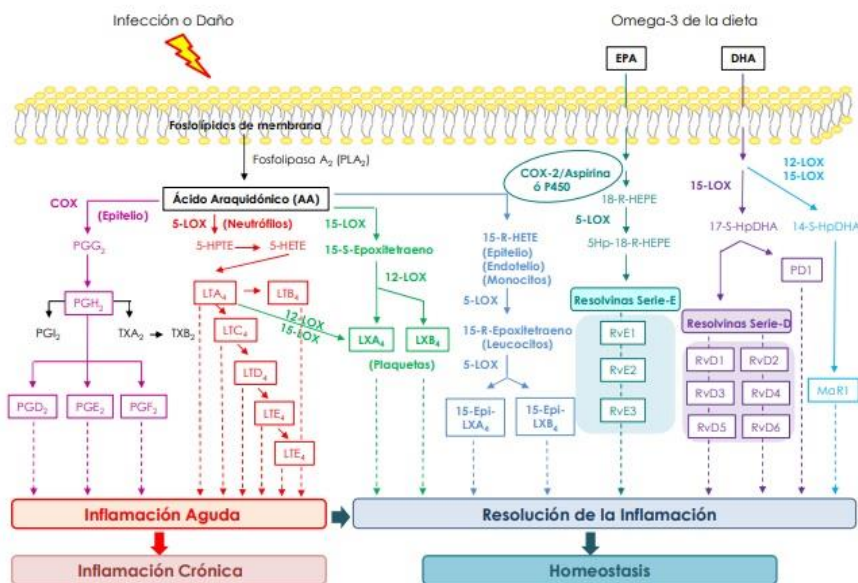


Figura 8. Resolución del proceso inflamatorio tras una infección o daño tisular. Vías biosintéticas y acciones de los mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico (AA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Modificado de Talero et al., 2015

El principal objetivo de la respuesta inflamatoria es suprimir los daños ocasionados en el tejido mediante la fase de resolución. Por ello, es necesario que se produzca la fase inflamatoria aguda, con los mediadores lipídicos

correspondientes (prostaglandinas y leucotrienos) para que, posteriormente, inicien la fase de resolución de la inflamación. En aquellas situaciones en las que dicha fase fracasa y los niveles de prostaglandinas y leucotrienos son elevados se produce una inflamación crónica y fibrosis (Mastrogiovanni, 2022).

Así pues, existe evidencia sobre la capacidad que presentan las oxilipinas derivadas del AA en la modulación del fenotipo inflamatorio de las células, especialmente de los macrófagos (Colson *et al.*, 2019).

En general, los mediadores lipídicos de la inflamación son conocidos por su papel en la homeostasis vascular, la protección de la mucosa gástrica y la agregación plaquetaria, la regulación de procesos inmunopatológicos que van desde respuestas inflamatorias hasta la remodelación tisular crónica, asma, artritis reumatoide, cáncer y diversas enfermedades autoinmunes. La función del tejido graso también está regulada por estos mediadores lipídicos, y se ha demostrado que las oxilipinas intervienen en la regulación de la homeostasis energética de la insulina y sus vías de señalización (Lopategi *et al.*, 2016).

La actividad biológica de las prostaglandinas depende del órgano o tejido, receptor al que se unen y de la situación fisiológica. En general, dichas funciones favorecen la homeostasis de los diferentes órganos/tejidos y conforman un sistema de alerta a los procesos fisiológicos normales y patológicos, gracias a la aparición de signos inflamatorios y de dolor. Además, juegan un papel importante en la regulación de la diferenciación de linfocitos en diferentes subpoblaciones celulares (Wójcik *et al.*, 2021). La diferencia en el receptor es responsable de las diversas funciones de la prostaglandina pudiendo tener una acción inhibidora o estimuladora (Narumiya *et al.*, 1999). Así pues, el papel de las PG en la potenciación de la tumorigénesis, ha hecho evidente que la inducción local de COX-2/PG es un medio importante por el cual muchos factores pueden comprometer la extensa red de señalización de la proteína G, siendo esta determinante para el crecimiento y la diferenciación celular. Parece probable que las acciones en numerosos tejidos de la COX-2/PG, estén definidas por los agonistas específicos de la COX-2 que las inducen y los tipos de células que responden (Blackwell *et al.*, 2010).

Por otro lado, cabe destacar que la PGE₂ es la prostaglandina principal en los modelos de inflamación aguda y crónica, tanto central como periférica. La PGI₂ es la prostaglandina principal formada en los vasos sanguíneos cerebrales, y es un potente vasodilatador (Rumià, 2018). Dichas sustancias presentan valiosas funciones en procesos fisiológicos tales como la homeostasis renal y vascular y el crecimiento y la diferenciación celular. Son fundamentales procesos inflamatorios

relacionados con diversas patologías tales como la artritis, la artrosis, la aterosclerosis y el cáncer (Moreno, 2010).

Con respecto a los índices de isoprostano, como marcador de peroxidación lipídica, aumentan considerablemente tras la inyección de lipopolisacáridos en humanos (McAdam *et al.*, 2000). Además, se encuentran elevados en personas fumadoras de tabaco en comparación con las no consumidoras (Meagher *et al.*, 1999), así como en personas con esclerosis múltiple (Miller *et al.*, 2011). Los niveles elevados de PGE2 empeoran la enfermedad del ojo seco y el leucotrieno B4 incrementa el lagrimeo de aquellos usuarios con molestias causadas por lentes de contacto (Shim *et al.*, 2012; Masoudi *et al.*, 2017).

En resumen, las oxilipinas se han relacionado con multitud de patologías como: enfermedades inflamatorias inducidas por alérgenos (efectos pro y antialérgicos) (Claar *et al.*, 2015; Peebles, 2019), en la neuroinflamación y neurodegeneración (de Asís *et al.*, 2012), enfermedades ginecológicas (dismenorrea, endometriosis, menorragia, carcinoma...) (Sales & Jabbour, 2003), se han implicado en la resorción ósea asociada con la inflamación y la enfermedad ósea metastásica (Blackwell *et al.*, 2010), trastornos psiquiátricos (Yui *et al.*, 2015), alteraciones de la mucosa y la actividad motora digestiva (Blair *et al.*, 2019), enfermedades renales (Li *et al.*, 2018), etc. Por lo tanto las oxilipinas presentan un sinfín de funciones que están en continuo descubrimiento.

7. RELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y EFECTOS EN LA SALUD DE OXILIPINAS VEGETALES Y HUMANAS

La analogía estructural de FitoP y FitoF con los derivados de los ácidos grasos omega 6 sintetizados por los mamíferos desde el AA, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico (EPA y DHA, respectivamente), isoprostanos, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos ha llevado a sugerir una cierta analogía funcional y por tanto la capacidad de modular diversos procesos fisiopatológicos (Medina *et al.*, 2018). Al igual que ocurre actualmente en relación a los FitoP y FitoF, las oxilipinas de mamíferos fueron descritas inicialmente como marcadores de estrés oxidativo, inflamación, y daño vascular, y solamente tras numerosas investigaciones básicas y clínicas se identificaron acciones biológicas de interés en el marco de las enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, desordenes metabólicos, y procesos tumorales e inflamatorios (Medina *et al.*, 2018; Ruesgas-Ramón *et al.*, 2019). Por este motivo, el estudio de analogías funcionales en relación con el panel de oxilipinas vegetales disponibles permitirá establecer funcionalidades y relaciones estructura-actividad (SAR), actualmente escasamente exploradas (Domínguez-Perles *et al.*, 2018; Dupuy *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2018). De hecho, como referimos anteriormente, las limitadas referencias a la funcionalidad de FitoP y FitoF en humanos en relación con la capacidad de polarizar la respuesta inmune hacia Th2 (pro-alérgica) vía proliferadores de peroxisomas y la inhibición de NF- κ B y consecuentemente de la reducción de la producción de IL-2 por las células presentadoras de antígeno, la cual está relacionada con el reconocimiento de autoantígenos y por tanto como regulador de las repuestas de los linfocitos T (Mariani *et al.*, 2007). En este sentido la capacidad de interacción de FitoP con proliferadores de peroxisomas informa sobre un potencial interés funcional de estas moléculas, dada la amplitud de procesos, inflamatorios, vasculares y metabólicos en los que se encuentra involucrada.

Así, la conexión entre las actividades biológicas de FitoP y FitoF con aquellas descritas para oxilipinas humanas se produce de la mano de estudios como el realizado por Karg *et al.* (2007) que estableció la conexión entre las bioactividades de los FitoP A₁ y J₁, con las actividades biológicas previamente descritas para PGA₁

y PGJ₂. En este sentido, ambos tipos de oxilipinas demostraron la capacidad de modular los procesos inflamatorios mediados por el factor de translocación nuclear NF-κB, así como de inducir apoptosis, aunque en este caso no se han establecido los mecanismos de acción.

Estas evidencias han permitido especular acerca de la capacidad de FitoP y FitoF de desarrollar acciones biológicas que contribuyan a lograr los beneficios para la salud asociados al consumo de alimentos vegetales, como análogos estructurales de las oxilipinas bioactivas presentes en mamíferos (isoprostanos y prostaglandinas fundamentalmente).

Sin embargo, dada la evolución experimentada en los últimos años en relación con los patrones existentes para establecer el perfil de FitoP y FitoF en alimentos vegetales, actualmente es posible analizar de forma adicional las funcionalidades asociadas a estos compuestos y establecer relaciones estructura actividad.

Así, se propone evaluar la actividad funcional antiagregante plaquetaria y moduladora de la vasodilatación, y por tanto de la presión sanguínea, de FitoP y FitoF, de interés en el marco de numerosos procesos patológicos cardiovasculares con una grave incidencia en la autonomía de los pacientes. Además de la analogía estructural, la hipótesis de la funcionalidad de dichos compuestos se basa en el hecho de que su concentración circulante es más elevada que aquella descrita para los isoprostanos y prostaglandinas, por lo que estas actividades podrían ser relevantes desde una perspectiva preventiva o terapéutica (Arcusa et al., 2022).

El interés biológico de las oxilipinas radica principalmente en sus funciones como marcadores extremadamente fiables. Sin embargo, más allá del interés diagnóstico y funcional de las oxilipinas humanas, en relación con sus variantes vegetales, las funciones biológicas son tan indeterminadas, como defendidas debido a la similitud estructural de grupos de compuestos. De hecho, la analogía estructural se basa, fundamentalmente en la presencia en ambos grupos de moléculas de una ciclopentenona presente como un elemento común en la estructura química tanto de oxilipinas vegetales como humanas, constituyendo un sitio electrofílico que proporciona a estos compuestos una alta reactividad con las proteínas esenciales para el normal funcionamiento celular. Dada esta situación se

hace necesario llevar a cabo estudios adicionales que amplíen la actividad biológica.

Para avanzar en los conocimientos sobre los beneficios biológicos de las oxilipinas, así como los efectos en la salud, se han sintetizado y evaluado prostaglandinas e isoprostanos humanos, así como FitoP y FitoF vegetales en el marco de diversos modelos fisiopatológicos. Así, entre las actividades biológicas identificadas hasta el momento se encuentran la inmunomodulación, la vasoconstricción, la activación y antiagregación plaquetaria, la contracción del músculo liso de los bronquios, y se pueden observar actividades antiinflamatorias e inductoras de apoptosis en diferentes tejidos. Además, los isoprostanos han sido sugeridos como mediadores del estrés oxidativo en la fisiopatología de enfermedades crónicas cardiovasculares, respiratorias y metabólicas (Montuschi *et al.*, 2007). No en tanto, muchas de las funcionalidades atribuidas a las oxilipinas humanas deben ser exploradas para FitoP y FitoF lo que permitirá identificar nuevos nichos de aplicación de estos compuestos.

Por su parte, los FitoP se han presentado como mediadores primordiales de la respuesta al estrés en las plantas superiores, induciendo la síntesis de metabolitos antimicrobianos secundarios, como las fitoalexinas o los antioxidantes. Estas evidencias proponen una funcionalidad tentativa como mediadores de reacciones de defensa, en respuesta al estrés oxidativo en plantas para lo cual es fundamental la regulación de la expresión de genes relacionados con procesos de detoxificación, como los que codifican las proteínas involucradas en el sistema citocromo-P450 y las proteínas de choque térmico (HSP70) (Medina *et al.*, 2018).

La relación entre las oxilipinas vegetales y los efectos en la salud humana partió de la hipótesis sobre la capacidad que presentaban los FitoP con la inmunomodulación. Siguiendo los estudios de Traidl-Hoffmann *et al.* (2005) se ha descrito que E₁-FitoP es competente para mimetizar la actividad biológica de la E₂-prostaglandina (PGE₂), cuya actividad se ha relacionado, de la mano de modelos *in vitro*, con la inhibición de la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas.

Además de la actividad inmunomoduladora demostrada, se ha reportado que las oxilipinas vegetales presentan una actividad antiinflamatoria en humanos, debido principalmente a la presencia de un sistema de anillo A, J o Desoxi-J (16-E₁-FitoP). Las propiedades antiinflamatorias asociadas a la presencia de estos

compuestos se desarrollan en cierta medida por su capacidad para impedir la señalización mediada por NF-kB (Musiek *et al.*, 2005; Straus & Glass, 2001).

Igualmente, los estudios de la actividad antiinflamatoria de las oxilipinas vegetales se han expandido a diferentes muestras de células y tejidos, incluido el sistema nervioso. Al aplicar este modelo, Minghetti *et al.*, (2014) demostraron que B₁-FitoP posee actividad neuroprotectora en células nerviosas inmaduras (neuroblastos y oligodendrocitos) y promueve la diferenciación de oligodendrocitos, a través de la activación de PPAR γ .

Siguiendo con otras cualidades biológicas, las oxilipinas vegetales han mostrado actividad antitumoral (Gutierrez-Pajares *et al.*, 2019). La comparación de estas atribuciones biológicas con las de FitoP reveló que 16-A₁-FitoP induce la apoptosis de linfoma de células T en mayor medida que PGA2 (casi dos veces mayor). Del mismo modo, estos compuestos inhiben la proliferación de células malignas al modular la expresión de varios genes relacionados con el ciclo celular.

En cuanto a los FitoF, existen pocos estudios hasta la fecha. Hay que destacar el realizado por Gutierrez-Pajares *et al.*, (2019), quienes analizaron ambas oxilipinas vegetales (siete FitoP y un FitoF) en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) para determinar su efecto sobre la viabilidad celular y metastásica. Tras este estudio, se observó que el *ent*-9-L₁-FitoP disminuye la viabilidad celular en ambas líneas celulares, mientras que 16-F_{1t}-FitoP y 9-L₁-FitoP desarrollan su actividad inhibidora de MCF-7 y MDA- Células MB-231, respectivamente.

8. OXILIPINAS VEGETALES Y SU RELACIÓN CON LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA HUMANA A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES PROSTANOIDES

Los prostanoides son ligandos bioactivos presentes en distintos tipos de células humanas y estados fisiológicos. Estos presentan sutiles diferencias en su estructura química y, por ende, tienen la capacidad de unirse a numerosos receptores de la membrana celular conservando la homeostasis y ejerciendo un papel determinante en procesos patogénicos tales como la respuesta inflamatoria, la agregación plaquetaria, así como la regulación del tono vascular (Lara-Guzmán *et al.*, 2018). Todos ellos funcionan a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) afines. Los GPCR son la clase más numerosa de receptores transmembrana y sirven como mediadores de señalización para traducir información de señales extracelulares como neurotransmisores, hormonas o fármacos a respuestas celulares (Kurz *et al.*, 2020).

De todos los prostanoides, la PGE₂ es la biomolécula más sintetizada en el cuerpo humano así como de las células endoteliales del mismo (Charo *et al.*, 1984), presentando una vida media extremadamente corta y mostrándose muy inestable. Debido a la heterogeneidad molecular y a la bioquímica de sus receptores resulta ser el eicosanoide más versátil. Sufre una rápida oxidación y su uso clínico es limitado (Breyer *et al.*, 2001). De esta forma se distinguen cuatro subtipos de receptores estructuralmente diferentes EP (EP1, EP2, EP3 y EP4) (Morimoto *et al.*, 2019) que inducen respuestas biológicas finales diversas y, a menudo, opuestas (Petrucci *et al.*, 2011). Los receptores EP están compuestos por siete segmentos transmembrana y cada subtipo de receptor está acoplado a una subunidad diferente de proteínas G heterotriméricas. La unión del ligando a diferentes receptores EP conduce a la activación de distintas vías de señalización (Konya *et al.*, 2013). Los cuatro subtipos de receptores están presentes en la membrana plasmática y únicamente EP3 y EP4 se expresan en las membranas de los núcleos celulares siendo estos últimos los que más ampliamente se expresan en el ser humano (Bhattacharya *et al.*, 1999).

Las vías de señalización activadas a través de los distintos subtipos de receptores dependen de la concentración y la conformación del ligando afín al

subtipo (Konya *et al.*, 2013). Es por ello por lo que las interacciones entre la PGE₂ y los receptores EP dependen del tipo de tejido o célula, de la expresión específica del receptor y de las diferencias en las afinidades de unión. Cada subtipo se encuentra específicamente distribuido en el cuerpo humano de la siguiente forma: EP1: miometrio, venas pulmonares, colon, piel, mastocitos; EP2: leucocitos, músculo liso, sistema nervioso central (SNC), sistema reproductor, huesos; EP3: SNC, sistema cardiovascular, sistema reproductor, riñón, vejiga; EP4: leucocitos, músculo liso, sistema cardiovascular y huesos (Sugimoto & Narumiya, 2007; Woodwarg *et al.*, 2011).

En el campo de la modulación de dichos receptores, la atención se centra en comprender sus interacciones e implicaciones biológicas en la función plaquetaria. Las plaquetas ejercen una función crítica al mantener la hemostasia e iniciar la formación de trombos. Sin embargo, la hiperreactividad plaquetaria se ha implicado en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, como los síndromes coronarios agudos, el infarto de miocardio y el ictus isquémico (Friedman *et al.*, 2015). Las elevadas concentraciones nanomolares de PGE₂ producidas por macrófagos activados están implicadas en patologías cardiovasculares como la rotura de la placa y la formación de aneurismas de aorta abdominal (Holmes *et al.*, 1997). La PGE₂ derivada de la placa aterosclerótica tiene la capacidad de atravesar dicha placa y actuar directamente sobre las plaquetas y estas, a su vez, producir una gran cantidad de PGE₂ (Gross *et al.*, 2007; Smith & Willis, 1970).

La homeostasis plaquetaria se ha atribuido durante mucho tiempo a un equilibrio de mecanismos que aumentan o disminuyen el adenosín 3'5'-monofosfato cíclico (AMPc) (Haslam *et al.*, 1999). En general, los GPCR estimulan la adenilato ciclasa, elevando el AMPc e inhibiendo la función plaquetaria. Por ejemplo, la PGI₂ inhibe la agregación plaquetaria aumentando el AMPc intracelular a través de la activación de su receptor IP acoplado a Gs. Por el contrario los GPCR, como el receptor ADP, inhiben la adenilciclasa, disminuyen el AMPc y facilitan la agregación plaquetaria (Friedman *et al.*, 2015).

Gran parte de la investigación sobre el papel de la PGE₂ en la función plaquetaria se ha centrado en el uso de agonistas y antagonistas selectivos del subtipo de receptor EP. Los primeros estudios sobre la PGE₂ demostraron su

capacidad para potenciar la agregación plaquetaria en respuesta a concentraciones subumbrales de agonistas (Bruno *et al.*, 1974; Shio & Ramwell, 1972; Vezza *et al.*, 1993). Recientemente, algunas investigaciones se han centrado en identificar a los receptores implicados en la mediación de los efectos de la PGE₂ sobre la función plaquetaria y han mostrado que dichos efectos son principalmente consecuencia de la interacción con los receptores EP3 y EP4. Presentando un efecto protrombótico en la unión con el receptor EP3 y antitrombótico cuando la unión se produce con el receptor EP4, concluyendo así que el efecto global de la PGE₂ es el resultado del equilibrio entre estas acciones opuestas (Iyú *et al.*, 2011).

La principal vía de señalización del receptor EP3 es la inhibición de la adenilato ciclasa a través de la proteína Gi, de esta forma los niveles de AMPc disminuyen (Matsuoka & Narumiya, 2007). La particularidad de dicho receptor radica en que posee diversos *splicing* alternativos que se definen por la cola citoplasmática C-terminal. Dichas variantes explicarían las diferencias en la fosforilación del receptor, desensibilización y variación en las vías de señalización (Namba *et al.*, 1993). El EP3 está implicado en la generación de la hipertemia, la contracción de los músculos lisos, la trombosis y la angiogénesis (Marimoto *et al.*, 2019; Marckovic *et al.*, 2017).

Por su parte, el receptor EP4 se describió inicialmente como un receptor acoplado a proteínas Gas que conducía a la estimulación de la adenilato ciclasa y a la elevación de los niveles intracelulares de AMPc (Coleman *et al.*, 1994). La estimulación de EP4, entre otras funciones, induce la relajación vascular mediada por AMPc, PKA y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Hristovska *et al.*, 2007), y la angiogénesis vía AMPc y PKA C μ (Zhang & Daaka, 2011). Otra molécula de señalización del receptor EP4 independiente de la PKA es Epac, es decir, la proteína de intercambio activada por el AMPc. Como tal, la señalización Epac está generalmente implicada en la proliferación celular, la diferenciación, la migración y las respuestas inflamatorias (Bos, 2003).

De esta forma, la comprensión del papel de la PGE₂ en las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas humanas se ha visto facilitada por el desarrollo de agonistas y antagonistas altamente selectivos de los receptores EP3/EP4 (Markovic *et al.*, 2017).

Entre los agonistas selectivos de los receptores EP3/EP4 encontramos la sulprostona y Cay10598 respectivamente (Pasterk *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2004). Por otro lado, L-798,106 y ONO AE3-208 presentan una función antagónica para EP3/EP4 (Esaki *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2009). Estos compuestos sintéticos pueden ejercer diferentes funciones en tejidos vivos, así la sulprostona potencia la agregación plaquetaria inducida por diferentes agonistas en plaquetas humanas, plasma rico en plaquetas (PRP) y sangre total (Heptinstall *et al.*, 2008; Matthews & Jones, 1993; Schober *et al.*, 2010). Asimismo Cay10598, como potente agonista de EP4, se ha empleado en numerosos estudios clínicos sobre el control de la inflamación y agregación plaquetaria (Kang *et al.*, 2017; Philipose *et al.*, 2012; Vezza *et al.*, 1993). Por el contrario, L-798,106 ha sido analizado en estudios sobre respuestas inflamatorias y lesiones tisulares desencadenadas por plaquetas (Karhausen *et al.*, 2020). ONO-AE3-208 también se ha utilizado para implicar la señalización de EP4 en respuestas inmunitarias y autoinmunes, inflamación y cáncer (Esaki *et al.*, 2010; Iyú *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2012).

El potencial terapéutico de los EP, concretamente de EP3 y EP4, y su relación con las PGE₂ hace ver su importancia en la agregación plaquetaria, más aún cuando dichos receptores presentan una mayor concentración en las plaquetas así como en el propio endotelio (Paul *et al.*, 1998; Petrucci *et al.*, 2011).

Análogamente, las oxilipinas vegetales al ser isómeros geométricos de la PGE₂ (Medina *et al.*, 2018) podrían ejercer potencialmente su efecto a través de la activación de los EP y su posterior señalización intracelular regulando así la agregación plaquetaria. Este hecho se refuerza gracias a estudios como los de Martínez-Sánchez *et al.* (2020), donde los FitoP y FitoF presentes en el alga *Gracillaria longissima* mediaron las vías inflamatorias en las células endoteliales. De esta forma, estas oxilipinas vegetales parecen desempeñar un papel importante como señales químicas en el ser humano, la reactividad putativa de FitoP y FitoF individuales con respecto a los receptores provocan respuestas diversas asociadas al curso de una serie de situaciones fisiopatológicas como puede ocurrir en la agregación plaquetaria.

II – JUSTIFICACIÓN

II- JUSTIFICACIÓN

El patrón dietético es uno de los factores más relevantes en el mantenimiento de la salud, no solo por constituir la fuente de nutrientes esenciales para el normal desarrollo de las funciones y metabolismo celular, sino por proveer al mismo tiempo otros componentes que, no siendo esenciales para la vida, contribuyen a la eficiencia de los diversos procesos fisiológicos y reacciones metabólicas celulares, previniendo el inicio de procesos patológicos. En el caso de los alimentos vegetales, estos compuestos están representados de forma significativa por los compuestos fitoquímicos, metabolitos secundarios de plantas superiores que participan de la respuesta de estas a estreses abiótico y biótico y que, una vez ingeridos y asimilados por los mamíferos, pueden desarrollar funciones biológicas en los distintos tipos celulares al tener la capacidad de interactuar con diferentes dianas moleculares y así contribuir a combatir procesos que afectan de forma transversal a diversas patologías como el estrés oxidativo y la inflamación.

En este contexto, es importante destacar que periódicamente nuevos tipos de compuestos fitoquímicos son identificados. Cuando esto sucede, es necesario caracterizar su presencia en los alimentos y los diferentes perfiles cuantitativos, su bioaccesibilidad y biodisponibilidad y su potencialidad biológica. A este respecto, la reciente descripción de FitoP y FitoF conlleva un desconocimiento significativo de su capacidad para modificar el metabolismo celular, estando sus funciones restringidas a algunos marcadores inflamatorios y especialmente al efecto sobre el sistema inmunitario. No obstante, la creciente diversidad de compuestos descritos en los últimos años en relación a las oxilipinas vegetales, hace necesario profundizar en el estudio de sus funciones biológicas, especialmente en relación con el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios.

En este marco, los resultados obtenidos en este estudio a través de modelos *in vitro* e *in silico* permitirán profundizar en la información disponible acerca de la capacidad de FitoP y FitoF de modular procesos biológicos transversales en diferentes patologías así como identificar aquellos oxilipinas vegetales individuales responsables de los efectos observados, lo que será de gran utilidad en la selección de la matriz alimentaria más adecuada para analizar la funcionalidad de FitoP y FitoF *in vivo*, en el marco de futuros estudios de intervención. Adicionalmente, la

identificación de los compuestos con actividades más prometedoras permitirá el desarrollo de productos alimenticios con nuevas capacidades funcionales, así como fomentar el uso de estos compuestos para el desarrollo de suplementos dietéticos que contribuyan a reducir la prevalencia y severidad de diferentes procesos patológicos.

III – OBJETIVOS

III- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal examinar la capacidad de los diferentes FitoP y FitoF identificados en la actualidad de prevenir procesos de estrés oxidativo e inflamación y establecer la Relación Estructura Actividad (SAR) identificando las posibles dianas moleculares responsables de los efectos biológicos desencadenados por estas oxilipinas vegetales en los escenarios fisiopatológicos referidos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para la consecución del objetivo general de la presente Tesis Doctoral se establecieron los siguientes objetivos secundarios:

1. Evaluar la capacidad de FitoP y FitoF individuales de prevenir el proceso inflamatorio y modular el estrés oxidativo desencadenado por lipopolisacáridos bacterianos sobre la línea monocítica humana THP-1, *in vitro*.
2. Establecer la relación estructura actividad de FitoP *ent-9-D_{1t}*-FitoP en el arco de su actividad sobre la agregación plaquetaria y las células vasculares humanas, así como aclarar con simulaciones de acoplamiento, las posibles interacciones con los receptores eprostanoides de tipo 1 a 4 de la PGE₂.

IV - MATERIAL Y MÉTODO

IV- MATERIAL Y MÉTODO

4.1. SUSTANCIAS QUÍMICAS Y REACTIVOS

En referencia a las oxilipinas vegetales, los FitoP, 9-F_{1t}-FitoP, 9-*epi*-9-F_{1t}-FitoP, *ent*-16-F_{1t}-FitoP, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP, 16-B_{1t}-FitoP y 9-L_{1t}-FitoP, y FitoF *ent*-16 (RS) -9-*epi*-ST- Δ^{14} -10-FitoF, *ent*-9 (RS)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-FitoF, y *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST- Δ^{14} -9-FitoF, se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos publicados (Cuyamendous *et al.*, 2016; Cuyamendous *et al.*, 2017; El Fangour *et al.*, 2004; El Fangour *et al.*, 2005; Guy, *et al.*, 2015; Pinot *et al.*, 2008; Vigor, *et al.*, 2022) y fueron proporcionados por el Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) (Montpellier, Francia). Por otro lado, en relación con las oxilipinas humanas, se analizaron un total de 37 isoprostanoïdes, que al igual que los agonistas/antagonistas de los receptores EP (sulprostona, butaprost, L-798,106; Cay10598 y ONO AE3-208), se adquirieron de Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, EE. UU.). Los disolventes de grado LC-MS (agua desionizada, acetonitrilo y metanol), así como, el ácido fórmico, se adquirieron en J.T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EE. UU.). El hexano se obtuvo de Panreac (Castellar del Valles, Barcelona, España), y el hidroxianisol butilado (BHA) y Bis-Tris (bis- (2-hidroxietil) –amino-tris (hidroximetil) metano) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) utilizados (Strata X-AW, 100 mg / 3 mL) fueron adquiridos de Phenomenex (Torrance, CA, EE. UU.).

4.2. EXTRACTO ANALÍTICO RICO EN OXILIPINAS

Las oxilipinas de *Gracillaria longissima* se extrajeron y caracterizaron de acuerdo a la metodología previamente publicada y validada (Martínez-Sánchez *et al.* 2020; Domínguez-Perles *et al.* 2018). Seguidamente, 1 g de alga deshidratada se mezcló con 5 mL de BHA metanólico (99,9: 0,1, *v/p*) y se procedió a extraer los extractos del material vegetal a través de protocolos de SPE, previamente optimizados y validados (Domínguez-Perles *et al.* 2018). Después de la SPE, los extractos se reconstituyeron en 200 μ L de agua MilliQ/MeOH (50/50, *v/v*), se

filtraron a través a través de membranas PVDF de 0,45 μm (Millipore, MA, EE. UU.) y se analizaron posteriormente por UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

4.3. LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

La línea celular humana monocítica (THP-1) (ECACC® General Cell Collection-88081201) se obtuvo de la *European Collection of Cell Culture* (ECACC, *Public Health England*, Reino Unido). Las células se cultivaron en RPMI 1640, suplementado con glutamina 2 mM y suero bovino fetal (FBS) al 10%, en frascos de cultivo celular de 75 cm^2 hasta la fase de crecimiento logarítmico ($0,6\text{-}1,4 \times 10^6$ células / mL), a 37 °C y 5% de CO_2 . El número de pases de las células utilizadas en este estudio fue entre 17 y 20. La línea celular endotelial humana Ea.hy926 (ATCC®CRL2922) se obtuvo de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EE. UU.), se cultivaron en DMEM que contenía 4,5 g L^{-1} de glucosa, suplementado con GlutaMAX™, 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de aminoácidos no esenciales, a 37°C y 5% de CO_2 , con un número de pases de entre 3 y 8.

4.4. PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR BASADA EN REDUCCIÓN XTT

La toxicidad de FitoP y FitoF individuales se ensayó en células THP-1, recurriendo a la metodología XTT. Para ello, se sembraron células en crecimiento exponencial en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10^4 células / pocillo. Después de la incubación durante 24 y 48 h con concentraciones decrecientes de FitoP y FitoF (100.000, 50.000, 25.000, 5.000, 1.000, 0,200, 0,020 y 0,002 μM), las células se incubaron con una solución de XTT(2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolium-5-carboxanilida) a una concentración final de 1 mg / mL durante 4 h, a 37 °C. La absorbancia se midió a 450 nm, usando 690 nm como longitud de onda de referencia, usando un lector de placas (Victor 3, Perkin Elmer, Jügesheim, Alemania). La toxicidad de la 9-D₁₁-FitoP (hasta 1 μM) disuelta en medio completo se evaluó en células Ea.hy926. Para ello, se sembraron células en crecimiento exponencial a una densidad de 10^4 células/pocillo. Tras el tiempo de incubación (48 horas y 6 días) con concentraciones crecientes de 9D₁₁-FitoP, las

células se incubaron con una solución basada en resazurina (alamarBlue) al 10% de concentración (ThermoFisher, Massachusetts, EE. UU.) durante 4 h a 37 °C. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Bio-Tek Synergy HT, Winooski, VT, EE. UU.) a 570 nm y 600 nm de referencia. La viabilidad celular se calculó como promedio “*densidad óptica (DO) de los pocillos - DO en blanco / DO promedio de los pocillos control*” y se expresó como porcentaje (%).

4.5. MODELO INFLAMATORIO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDOS

Las células humanas monocíticas (THP-1) se sembraron en placas a densidad de 7×10^5 células / pocillo en medio RPMI 1640, suplementado con glutamina 2 mM y suero bovino fetal (FBS) al 10% para estudiar los efectos moduladores de FitoP y FitoF en el perfil de PG en los monocitos. Las células se trataron con 50 μ M de FitoP y FitoF individuales por triplicado ($n = 3$) durante 24 h. Esta concentración se seleccionó en base a estudios previos que detectaron oxilipinas vegetales en varias matrices alimentarias, como aceite de lino o guisantes (Domínguez-Perles *et al.*, 2018; García-García *et al.*, 2019). No obstante, aunque esta concentración podría exceder la concentración teórica alcanzada en las células diana (que aún no se ha descrito), especialmente debido a la degradación de FitoP y FitoF dietéticos durante la digestión gastrointestinal, el diseño experimental establecido fue utilizado para establecer el potencial biológico de las oxilipinas vegetales en consideración. A continuación, se añadió un estímulo inflamatorio (100 ng / mL de lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0127:B8), incubando las células a 37 °C al 5% de CO₂ durante otras 24 h adicionales.

4.6. EXTRACCIÓN DE PROSTAGLANDINAS DE CÉLULAS Y MEDIO DE CULTIVO

El perfil de PG se determinaron tanto en lisados de células THP-1 como en el medio de crecimiento. Una vez recolectadas las células y sobrenadantes, se agregó 0,005% BHA (concentración final) y el medio se conservó a -80 °C durante no más de un mes de almacenamiento. Para proceder a la extracción de PG, se añadió HCl 200 mM a 0,5 mL de medio de crecimiento y se centrifugó a 10000 xg durante 5 min para precipitar las proteínas del medio.

Después de retirar el medio de crecimiento, las células se lisaron mediante incubación con tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al

1%, que contenía BHA al 0,005%, pH 8) durante 1 h, en hielo. Los lisados se centrifugaron a 8000 xg durante 5 min. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80 °C hasta la extracción de oxilipinas humanas.

Tanto el medio de crecimiento preprocesado como los extractos de lisado celular se hidrolizaron primero estenzimáticamente (β -glucuronidasa-sulfatasa tipo HP-2 de *Helix pomatia*), y las PG se extrajeron de acuerdo con la metodología previamente desarrollada y validada (Medina *et al.*, 2012a; Medina *et al.*, 2012b) Después de la hidrólisis, las muestras se sometieron a un procedimiento de limpieza mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Strata X-AW (100 mg / 3 mL), siguiendo el método descrito en la literatura (Medina *et al.*, 2012a). Los compuestos diana se eluyeron con 1 mL de metanol y se llevaron a sequedad usando un sistema concentrador de vacío (SpeedVac™), reconstituyendo, posteriormente el pellet en fases móviles A/B (90:10, v/v), descritas en el siguiente apartado. La concentración de PG se determinó tanto en lisados celulares como en el medio de crecimiento, para obtener la concentración total de oxilipinas sintetizadas por células monocíticas THP-1.

4.7. ANÁLISIS UHPLC-QQQ-MS / MS DE PROSTAGLANDINAS

La separación cromatográfica de oxilipinas en lisados celulares y medio de crecimiento se realizó mediante UHPLC acoplado a un 6460 QqQ-MS / MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), utilizando la metodología descrita anteriormente (García-Flores *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2012a) y la columna ACQUITY BEH C18 (2,1 x 150 mm, tamaño de poro de 1,7 μ m) (Waters, MA, EE. UU.). Las fases móviles utilizadas fueron agua desionizada / ácido fórmico (99,9: 0,1, v / v) (disolvente A) y metanol (disolvente B) mediante el siguiente esquema de gradiente (t, % B): (0,00; 60), (7,00; 60), (7,01; 73), (10,00; 73), (10,01; 80), (18,00; 100), (19,00; 100) y (19,01; 60). El flujo y el volumen de inyección fueron 0,150 mL / min y 20 μ L, respectivamente. La identificación y cuantificación de PG se realizaron mediante el análisis de las masas de iones parentales y patrones de fragmentación específicos de 21 PGs (**Tabla 1**), que se realizó mediante un análisis de espectrometría de masas por modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), e ionización (*Electrospray ionization*, ESI) en modo negativo. Los parámetros del espectrómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolo se optimizaron para

la identificación y detección de oxilipinas, de acuerdo a estudios previos (García-Flores, *et al.*, 2018; Medina, *et al.*, 2012a). Además, la cuantificación de las PG monitorizadas se realizaron utilizando estándares de referencia como está descrito en la **Tabla 1**. La 8-*iso* prostaglandina F_{2α-d4} (contiene 4 átomos de deuterio en las posiciones 3, 3', 4 y 4') se utilizó como estándar interno. La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el software MassHunter versión B.08.00 (Agilent Technologies, Walbronn, Alemania). La concentración de PG se calculó de acuerdo con rectas de calibrado, preparadas cada día de análisis.

Tabla 1. Tiempo de retención y transiciones MRM de prostaglandinas evaluadas.

Prostaglandina	Tr (min)	Ión parental (m/z [M-H] ⁻)	Fragmento (m/z MS2 [M-H] ⁻)
<i>Prostaglandina generada de AA</i>			
<i>Prostaglandina de la vía D</i>			
Tetranor-PGDM	3.17	327.1	108.9
PGDM	3.20	327.1	309.1
Tetranor-PGDM lactano	3.50	309.1	142.9
Tetranor-PGJM	3.60	609.0	155.0
2,3-dinor-11 β -PGF _{2α}	10.57	325.2	237.1
PGD ₂	13.22	350.9	315.0
11- β -PGF _{2α}	13.61	353.0	309.1
<i>Prostaglandina de la vía E</i>			
Tetranor-PGEM	3.17	327.0	308.8
Tetranor-PGAM	3.58	309.0	2900.9
20-OH-PGE ₂	4.66	367.1	349.2
PGE ₂	13.07	351.2	333.1
<i>Prostaglandina de la vía F</i>			
Tetranor-PGFM	3.14	329.4	311.1
<i>ent</i> -20-OH-PGF _{2α}	5.10	369.2	325.1
19(R)-OH-PGF _{2α}	5.15	369.2	325.1
15-keto-PGF _{2α}	12.90	351.1	314.9
PGF _{2α}	13.60	353.1	309.0
<i>Prostaglandina de la vía I</i>			
2,3-dinor-6-keto PGF _{1α}	10.80	341.0	134.9
6-keto-PGF _{1α}	12.69	369.0	245.1
<i>Prostaglandin generada de DGLA</i>			
PGE ₁	12.84	353.2	317.2
PGF _{1α}	13.67	355.2	311.0
<i>Prostaglandin generada de EPA</i>			
17- <i>trans</i> -PGF _{3α}	12.47	350.9	307.0

AA, ácido araquidónico; DGLA, ácido dihomo- γ -linolénico; EPA, ácido eicosapentanoico.

4.8. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVACIÓN DE LAS PLAQUETAS Y DE LOS LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)-AGREGADOS PLAQUETARIOS

Se reclutaron nueve participantes sanos (sin ningún tratamiento) entre el personal de la Universidad Católica de Murcia (UCAM). Las muestras de sangre fresca se recogieron en tubos Vacutainer comerciales de 2 mL de citrato de sodio (32%) y EDTA utilizando una aguja de calibre 20 (se descartó el primer mililitro). Las extracciones de sangre se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki y fueron aprobadas por el Comité Ético de Investigación de la UCAM. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

Se prepararon diluciones salinas de 0,2 µg de oxilipinas caracterizadas (**Tabla 2**) y distintos agonistas plaquetarios y se añadieron a 40 µL de sangre citratada fresca (hasta una concentración final de 129 nM) durante 10 min. Seguidamente se analizaron los marcadores de activación plaquetaria mediante citometría de flujo (FCM). En el dotplot FSC vs SSC e distinguieron las subpoblaciones plaquetarias (plaquetas normales y agregados plaquetarios (PA)) presentes en sangre total y en función de la presencia del receptor de membrana constitutivo de las plaquetas CD42b (glicoproteína Ib) y CD61 (glicoproteína IIIa, para los agregados plaquetarios). A continuación, se evaluó la expresión superficial de los marcadores de activación de plaquetas, como el CD62P (P-selectina) y el CD36 (glicoproteína IV), tal como ya se ha publicado (Montoro-García *et al.*, 2014; van Velzen *et al.*, 2012). Tras la incubación (con el extracto y los agonistas), la sangre total (5 µL) se incubó con CD61--isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD62P-BV786, CD42b-allophycocyanin (APC) y CD36-phycoerythrin (PE) (todos de BD Biosciences, Oxford, Reino Unido) durante 15 minutos, se diluyó con 1 mL de PBS filtrado y luego se analizó en el citómetro de flujo FACS Fortessa (BD, Becton Dickinson, Oxford, Reino Unido). También se evaluaron los controles positivos de la activación de las plaquetas tras la incubación de la sangre total durante 2 min con adenosina-5'-difosfato (ADP, 0,02 mmol/L; Biodata Corporation, Horsham, PA, EE.UU) y ácido araquidónico (AA, 0,25 mg/mL; Biodata Corporation, Horsham, PA, EE. UU.) que producen una agregación monofásica, completa e irreversible (Hechler *et al.*, 2005).

Tabla 2. Niveles de oxilipinas (FitoP y FitoF, ng/muestra) en la materia prima, después de la extracción con metanol

Muestra	FitoP ^z								FitoF ^y		
	FP-1	FP-2	FP-3	FP-4	FP-5	FP-6	FP-7	Total	FF-2	FF-3	Total
1	38,5	1591	55,1	0,2	3,1	9,0	13,6	1717,9	23,1	13,6	208,7
2	25,2	752	26,7	<0,1	1,1	3,6	7,0	717,2	31,7	6,7	1036,7
3	52,8	1967	44,8	0,2	3,4	10,0	12,1	2100,6	7,7	12,1	827,4

^z FP-1, 9-F₁₁-FitoP; FP-2, 9-D₁₁-FitoP; FP-3, ent-16-F₁₁-FitoP + ent-16-epi-16-F₁₁-FitoP; FP-4, 16-B₁₁-FitoP; FP-5, 9-epi-9-F₁₁-FitoP; FP-6, 9-L₁₁-FitoP; FP-7, 9-epi-9-D₁₁-FitoP. ^y FF-1, ent-16-(RS)-9-epi-ST-Δ¹⁴-10-FitoF; FF-2, ent-16-(RS)-13-epi-ST-Δ¹⁴-9-FitoF; FF-3, ent-9-(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD14-BUV395 y CD42b-APC se mezclaron con 50 µL de sangre total fresca anticoagulada con EDTA en tubos TruCount (todo de BD). Estos tubos contienen un número estrictamente definido de beads de recuento fluorescentes. Tras la incubación durante 15 min, los hematíes se lisaron con 450 µL de solución lisante (BD, Oxford, Reino Unido) durante 15 min, seguida de dilución en 1 mL de PBS y se analizó mediante FCM inmediatamente. Los monocitos y otros leucocitos polimorfonucleares (PMN) se seleccionaron mediante una estrategia de separación basada en la dispersión frontal y lateral para seleccionar los monocitos y la dispersión lateral frente a la expresión de CD14 para excluir los granulocitos (algunos linfocitos y neutrófilos podrían incluirse también en esta separación, de ahí que no se puede considerar la población de monocitos exclusivamente) (**Figura 9**). Los recuentos absolutos de leucocitos CD14+ (en células por microlitro) se obtuvieron calculando el número de eventos proporcional al número de beads de recuento, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los agregados leucocito-plaqueta se definieron como eventos positivos a CD14+ y al marcador plaquetario CD42b+ (Shantsila *et al.*, 2014). El número de eventos recogidos fue de 10.000 eventos CD14++. Los controles de isotipo para todos los ensayos de FCM se realizaron con diferentes anti-IgG1 monoclonales (BD Biosciences).

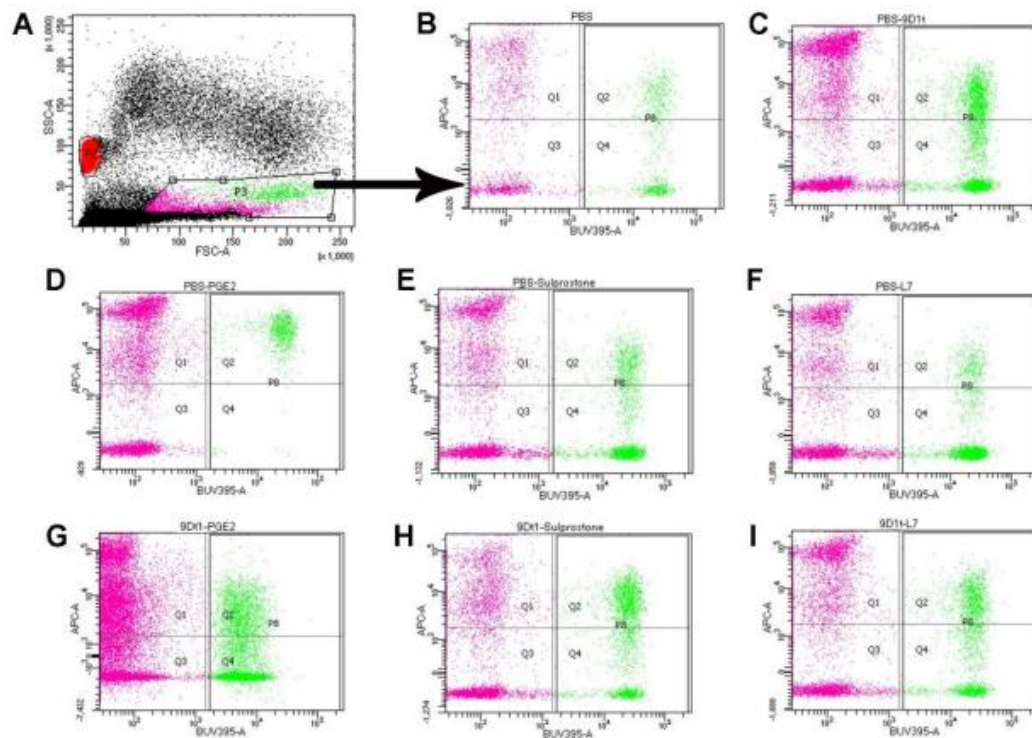


Figura 9. Estrategia de selección de monocitos y otras células PMN (basada en FSC y SSC). (A) La P3seleccionada se analizó posteriormente basándose en las uniones CD14-BUV395 (P8) y CD42b-APC (Q2) en (B) condiciones de control (PBS). Después de 30 min en presencia de: (C) 100 nM 9-D1t-FitoP. (D) 20 nM PGE2. (E) 200 nM Sulprostone. (F) 300 nM L798,106. (G) 20 nM PGE2 más 100 nM 9-D1t-FitoP. (H) 200 nM Sulprostone más 100 nM 9-D1t-FitoP. (I) 300 nM L798,106 más 100 nM 9-D1t-FitoP

La sangre citratada y anticoagulada con EDTA se incubó con ligandos de los receptores EP3 y EP4 durante 10 min a temperatura ambiente (TA). En total, se utilizaron 200 nM de Sulprostone (agonista) y 600 nM de L798,106 (antagonista) para estimular el receptor EP3. Mientras que para estimular el receptor EP4 se utilizaron 600 nM Cay10598 (agonista) y ONO AE3-208 (antagonista), también se utilizaron 20-40 nM PGE₂ en las mismas condiciones. La sangre total se incubó con 20-100 nM de 9-D_{1t}-FitoP purificado más los ligandos mencionados y, a continuación, se procesó mediante FCM.

4.9. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La toxicidad de la 9-D_{1t}-FitoP (hasta 1 μ M, 0,01% DMSO) disuelta en medio completo se testó en la línea celular Ea.hy926. Para ello, se sembraron células en crecimiento exponencial en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células/pocillo. Tras el tiempo de incubación (48 h y 6 días) con concentraciones crecientes de 9-D_{1t}-FitoP, las células se incubaron con solución de AlamarBlue a una concentración del 10% (ThermoFisher, Massachusetts, EE. UU.) durante 4 h a 37 °C. La viabilidad celular se calculó como la densidad óptica (DO) media de los pocillos/DO media de los pocillos de control y se expresó como porcentaje (%).

4.10. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

Se estudió la migración celular utilizando la línea celular Ea.hy926 mediante un ensayo de cicatrización de heridas en medio estándar suplementado con un 5% de FBS. Se sembraron 30.000 células en placas de 35 mm con insertos de migración siguiendo las instrucciones del fabricante (Ibidi, Martinsried, Alemania). Tras la adecuada fijación de las células y la formación de la monocapa (alrededor de 24 h), los insertos se retiraron con pinzas estériles para crear un campo de heridas de aproximadamente 500 μ m. Las células desprendidas se eliminaron suavemente con DPBS antes del tratamiento. Las células confluentes se incubaron en uno de los siguientes tratamientos: control (0,01% DMSO), 300 nM PGE2 o 300 nM 9-D_{1t}-FitoP. A continuación, las células se colocaron en un incubador de cultivo celular y se dejaron migrar. A las 0 y 7 h (fase de crecimiento lineal) (Albuquerque *et al.*, 2020, 2021). Se fotografiaron 10 campos de la zona lesionada con un microscopio invertido de contraste de fases con un aumento de 10 \times . Para cada punto temporal, se determinó el área descubierta por las células mediante el software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, EE. UU.). Cada tratamiento se realizó por triplicado.

La velocidad de migración del cierre de la herida se dio como el porcentaje del área recuperada en cada punto temporal, en relación con el área cubierta inicialmente (t_0). La velocidad de cierre de la herida (%/h) se calculó según la siguiente ecuación y las pendientes se expresan como porcentajes relativos a las condiciones de control:

$$\text{Pendiente (\% \acute{a}rea/h)} = (\% \acute{a}rea\ cubierta\ t\ x) - (\% \acute{a}rea\ cubierta\ t\ 0) / (t\ x - t\ 0)$$

4.11. ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN UN MODELO DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Para estudiar los efectos que la oxilipina 9-D₁₁-FitoP producía sobre el fenotipo de EA.hy926, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a razón de 8×10^4 células/pocillo en DMEM suplementado con 5% de FBS y se trataron con 100 nM de 9-D₁₁-FitoP (por triplicado) durante 16 h, tal y como se había publicado previamente (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). A continuación, se añadieron 20 ng/mL de TNF- α o 100 nM de PGE₂ durante un tiempo de incubación adicional de 6 h.

Se extrajo el ARN total de las células EA.hy926 utilizando 300 μ L del reactivo Trisure (Bioline, Taunton, MA, EE. UU.) y Direct-Zol RNA MiniPrep (Zymo Research Irvine, Irvine, CA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. El ARN total se transcribió inversamente en ADN complementario utilizando un kit de síntesis Sensifast cDNA™ (Bioline, Taunton, MA, EE. UU.). Los niveles de ARNm de los genes diana se cuantificaron mediante RT-PCR utilizando un kit SensiFAST SYBER Hi-ROX (Bioline, Taunton, MA, EE. UU.) en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Brevemente, se añadieron 5 μ L de ADNc diluido 1:5 a la reacción de qPCR que contenía 10 μ L de 2X SensiFAST Mix y 400 nM de cada cebador en un volumen total de 20 μ L.

Se adquirieron cebadores específicos y validados para distintos genes humanos como actina, marcador de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), marcador de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3), interleucina-6 (IL-6) y COX-2 (PGST) (todos ellos de Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, EE. UU.). La expresión relativa de ARNm de los genes de interés se representó mediante: $2^{-(\Delta\Delta CT)} = [CT(\text{gen de interés}) - CT(\text{Actina})]_{\text{prueba}} - [CT(\text{gen de interés}) - CT(\text{Actina})]_{\text{control}}$.

La cuantificación relativa de la expresión génica se evaluó mediante el método comparativo de cambio de pliegues $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se utilizó un valor medio de cada gen diana tras la normalización de la actina en el punto temporal que mostraba la expresión más alta como calibrador para determinar los niveles relativos en el resto de las condiciones experimentales. Todos los experimentos y reacciones de qPCR se realizaron por triplicado.

4.12. DOCKING CIEGO

La técnica de Blind Docking (BD) se aplicó al estudio de las interacciones de los ligandos seleccionados contra el receptor de prostaglandinas EP3. El método BD permite calcular los hotspots de interacción más probables para un determinado ligando en la superficie de la proteína seleccionada (Tapia-Abellán *et al.*, 2019).

En cuanto a la preparación del archivo de entrada, se obtuvo la estructura cristalizada del receptor EP3 con el PDB:6M9T (<https://www.rcsb.org/structure/6M9T>) (Berman *et al.*, 2000). El archivo PDB se procesó con las herramientas de Maestro: Protein Preparation Wizard se utilizó para refinar la estructura, para evitar choques entre átomos, y System Builder se utilizó para obtener las cargas utilizando el campo de fuerza OPLS3e (Roos *et al.*, 2019). Finalmente, se obtuvo la estructura en formato mol2. Los ligandos PGE₂ y L-798,106 se prepararon con la herramienta LigPrep de Maestro aplicando el campo de fuerza OPLS3e. Además, ambas moléculas fueron procesadas con la herramienta LigPrep de Maestro para calcular las cargas de cada átomo utilizando el campo de fuerza OPLS3e. Las estructuras resultantes se guardaron en formato mol2.

Al realizar las ejecuciones de consenso de BD, se seleccionaron dos softwares de acoplamiento molecular, Autodock Vina (Trott & Olson, 2010) y Lead Finder (Stroganov *et al.*, 2008) y se especificó un tamaño de caja de rejilla cuyas dimensiones eran 30×30×30 Å con parámetros por defecto. Todos los cálculos de BD se llevaron a cabo utilizando el conjunto de scripts MetaScreener (<https://github.com/bio-hpc/metascreeener>). Lead Finder acepta archivos de proteínas y ligandos directamente en formato mol2, y para Vina, todas las moléculas se prepararon utilizando cargas Gasteiger (Gasteiger & Marsili, 1980)

con AutoDockTools (<https://autodock.scripps.edu/>) y se convirtieron al formato pdbqt. En el proceso BD, se realizan varios cálculos de docking en paralelo, con una instancia del ligando que comienza en cada carbono alfa del modelo de proteína. A continuación, se generó una distribución de valores de puntuación de docking como aproximación de las energías de unión y sus grupos estructurales de poses (Tapia-Abellán *et al.*, 2019). Por último, se estudiaron los cálculos individuales de BD obtenidos por cada motor de docking para obtener un consenso de BD con la superposición y las puntuaciones de ambos métodos. La función de puntuación de ambos algoritmos considera el término de Lennard-Jones (LJ), los enlaces de hidrógeno (enlaces H), las interacciones electrostáticas, la estabilización hidrofóbica, la penalización entrópica debida al número de enlaces rotatorios y la energía interna de cada ligando. Las interacciones entre los ligandos estudiados y los residuos de la proteína se calcularon mediante PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

4.13. DINÁMICA MOLECULAR

Para cada ligando, se seleccionaron los grupos de interacciones más relevantes tras los cálculos de BD y se especificaron las posturas específicas del ligando. A continuación, se seleccionaron dichas poses para realizar una simulación de Dinámica Molecular (MD). Además, y para comparar con los resultados experimentales conocidos, se preparó con Maestro la pose cristalográfica del misoprostol (código J9P) de la entrada 6M9T para ejecutar otra MD. Los tres cálculos de MD se realizaron con el software Maestro-Desmond (Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2020. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, Nueva York, NY, 2020). Los complejos proteína-ligando se insertaron en una membrana de POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (Koynova & Caffrey 1995) a 300K, mientras que la región transmembrana se obtuvo siguiendo los datos de la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Los complejos creados se sumergieron en una caja llena de moléculas de agua utilizando el esquema de carga puntual simple (SPC). La dimensión de la caja se fijó en 10x10x10 Å. Se añadieron iones Cl⁻ y Na⁺ para obtener una concentración final de NaCl de 0,15 M. La minimización de la energía se llevó a cabo mediante 2000 pasos utilizando el método de descenso más pronunciado con un umbral de 1,0 kcal/mol/Å. Se utilizaron condiciones de

contorno periódicas, y se estableció un corte de 9 Å para las interacciones de van der Waals, y el método Particle Mesh Ewald (PME) con una tolerancia de 10^{-9} se utilizó en la parte electrostática. Las simulaciones NPT se realizaron a 300 K con el algoritmo Nosé-Hoover (Tapias *et al.*, 2016), y la presión se mantuvo a 1 bar con el barostato Martyna-Tobias-Klein (Martyna *et al.*, 1994). En todas las ejecuciones se utilizó el mismo campo de fuerza empleado para preparar las moléculas (Roos *et al.*, 2019). Todas las ejecuciones tuvieron un tiempo de simulación de 100 ns.

4.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los tratamientos y extracciones se realizaron por triplicado ($n = 3$) y los datos se expresaron como la media \pm DE. Todas las pruebas estadísticas se realizaron al 5% del nivel de significación utilizando el software SPSS 25.0 (LEAD Technologies, Inc., Chicago, EE. UU.). Todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), confirmando que se cumplieron los requisitos en lo que respecta a la distribución normal y la homogeneidad de varianza, a través del Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors) y Pruebas de Levene, respectivamente. Cuando se identificaron las diferencias estadísticas, las variables se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey.

V – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 LOS FITOPROSTANOS Y FITOFURANOS MODULAN LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN LIGADOS A LA ENZIMA CICLOOXIGENASA-2 EN MONOCITOS THP-1 ESTIMULADOS CON LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO MEDIANTE UN ENFOQUE LIPIDÓMICO

Es sabido que los monocitos y macrófagos son elementos clave del sistema inmunológico innato y del proceso inflamatorio (Parihar *et al.*, 2010). Por tanto, la denominada THP-1 es una línea celular monocítica de leucemia humana, caracterizada por una fuerte correspondencia con la fracción monocítica de las células mononucleares de sangre periférica, que conserva una sólida capacidad para sintetizar muchas moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio (Auwerx, 1991). Aunque las células THP-1 pueden no expresar características coincidentes en relación con los monocitos primarios y sus mecanismos reguladores, se caracterizan por sus propiedades fisiológicas, que son características de los monocitos primarios *in vivo* (Sharif *et al.*, 2007). Debido a esto, la línea celular THP-1 ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudiar las vías moleculares involucradas en las respuestas inflamatorias, inmunológicas y para evaluar la capacidad de determinados compuestos presentes en los alimentos en la modulación de dichas vías, las cuales están ligadas al desarrollo de determinados estados fisiopatológicos (Sharif *et al.*, 2007). En el presente capítulo, abordaremos a través de un enfoque lipidómico, la capacidad de los FitoP y FitoF de modular las oxilipinas humanas generadas en monocitos tras un estímulo proinflamatorio, lo que nos aportará una relevante información sobre la actividad funcional de las oxilipinas vegetales, presentes en una amplia diversidad de matrices alimentarias, sobre la sobreproducción de radicales libres y la respuesta inflamatoria crónica, el binomio común que incrementa el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles.

5.1.1. Respuesta inflamatoria desencadenada por LPS en la línea celular monocítica humana THP-1, *in vitro*

Como se mencionó anteriormente, este trabajo tuvo como objetivo conocer la capacidad de los FitoP y FitoF individuales para modular la respuesta de PG desencadenada durante la inflamación inducida por LPS en células monocíticas THP-1. Sobre este aspecto, la hipótesis de partida fue que las oxilipinas vegetales (FitoP y FitoF) son capaces de modular el perfil de PG en el curso de un proceso inflamatorio.

5.1.1.1. Viabilidad de la línea celular monocítica humana THP-1

Antes de evaluar la capacidad de FitoP y FitoF para modular la inflamación, no abordado hasta la fecha, y para evitar los efectos nocivos de estas oxilipinas vegetales en las células THP-1 durante el ensayo de inflamación, se evaluó el efecto citotóxico de FitoP y FitoF contra las células THP-1 humanas. Con este objetivo, se llevó a cabo un ensayo XTT después de 24 y 48 h en presencia de concentraciones decrecientes de los FitoP individuales, 9-Fit-FitoP, 9-*epi*-9-F₁₁-FitoP, *ent*-16-F₁₁-FitoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁₁-FitoP, 9-D₁₁-FitoP, 16-B₁-FitoP y 9-L₁-FitoP, y los FitoF *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST- Δ^{14} -10-FitoF, *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-FitoF y *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST- Δ^{14} -9-FitoF (100.000, 50.000, 25.000, 5.000, 1.000, 0.200, 0.020 y 0.002 μ M) (**Figura 10**).

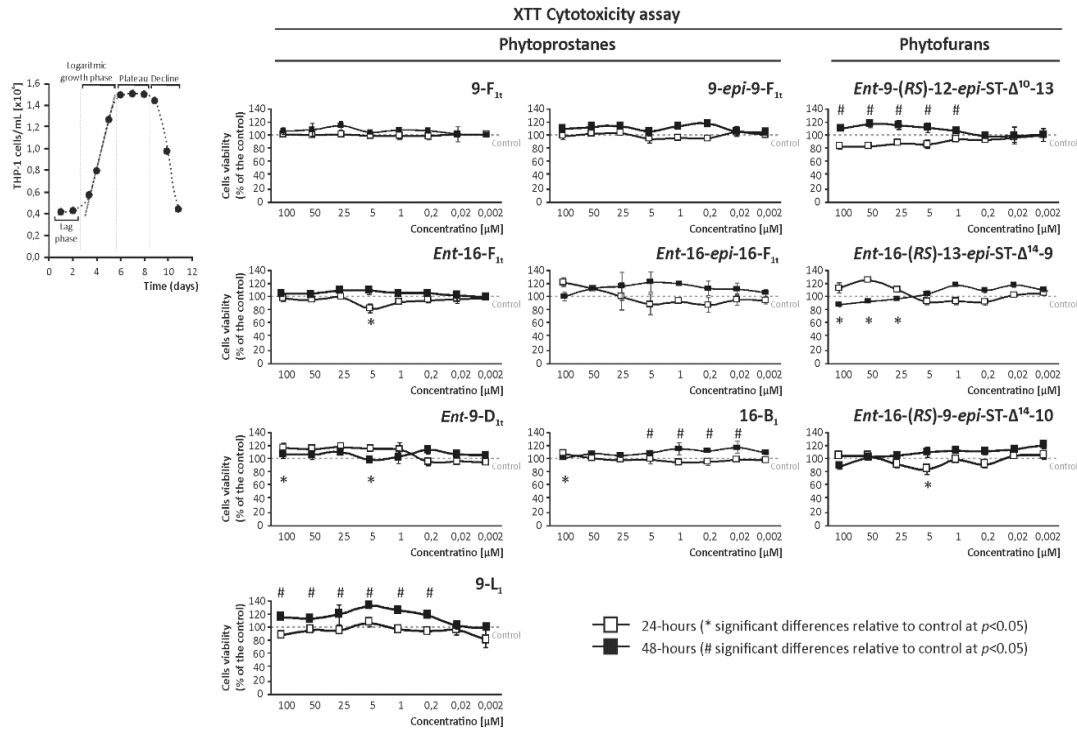


Figura 10. Actividad citotóxica de los FitoP (9-F_{1t}-FitoP, 9-epi-9-F_{1t}-FitoP, ent-16-F_{1t}-FitoP, ent-16-epi-16-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP, 16-B_{1t}-FitoP, y 9-L_{1t}-FitoP) y los FitoF (ent-16(RS)-9-epi-ST-Δ¹⁴-10-FitoF, ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF y ent-16(RS)-13-epi-ST-Δ¹⁴-9-FitoF). Se evaluó la citotoxicidad sobre las células THP-1 (línea celular monocítica humana) de concentraciones decrecientes de FitoP y FitoF (100.000, 50.000, 25.000, 5.000, 1.000, 0.200, 0.020 y 0.002 μM) mediante un ensayo XTT durante la fase de crecimiento logarítmico de los monocitos. La citotoxicidad se expresa como media ± SD del porcentaje de viabilidad a las 24 y 48 horas en relación con el control. Las disminuciones significativas de la viabilidad celular en relación con las condiciones de control después de 24 horas se fijaron en p<0,05 (*) y después de 48 horas en p<0,05 (#).

Los resultados obtenidos evidenciaron una mínima modificación de la viabilidad de las células THP-1 cuando se expusieron a altas concentraciones de FitoP y FitoF individuales. En este sentido, el rango de concentraciones probadas para las diez oxilipinas vegetales evaluadas no disminuyó significativamente la viabilidad de las células THP-1 después de 24 h, en relación con el control no tratado, excepto para *ent-16-F₁₁-FitoP* y *ent-16(RS)-9-epi-ST- Δ^{14} -10-FitoF*, que indujo una reducción significativa en la viabilidad a 5 μ M (15,3% menor que el control, en promedio). Al evaluar la citotoxicidad después de 48 h, nuevamente, no se observó ningún efecto citotóxico. Por el contrario, la exposición a altas concentraciones de FitoP y FitoF, en general, provocó un aumento significativo en la viabilidad de las células, con respecto a 16-B₁-FitoP (5,00-0,02 μ M provocó un aumento de 13,5%, en promedio), 9-L₁-FitoP (100,00-0,20 μ M aumentó un 20,5%, en promedio), y *ent-9(RS)-12-epi-ST- Δ^{10} -13-FitoF* (100,00-1,00 μ M incrementó un 14,2% , en promedio) (**Figura 10**).

En consecuencia, el efecto citotóxico limitado atribuible a FitoP y FitoF después de 24 y 48 h podría depender de las similitudes estructurales con las oxilipinas de mamíferos (isoprostanoides), ya descritas como moléculas sin un efecto deletéreo en concentraciones homeostáticas. Por otro lado, la promoción de la viabilidad inducida por FitoP y FitoF, principalmente después de una exposición de 48 h para la mayoría de las concentraciones, podría estar relacionada con la diferencia en la estructura química de los FitoP y FitoF, que podría modificar la capacidad de dichas moléculas para penetrar en las células. Además, el aumento de la viabilidad celular también podría verse influenciado por la capacidad de FitoP y FitoF para proporcionar ventajas bioquímicas adicionales a las células, por ejemplo, contribuyendo al equilibrio redox en las células (Guaiquil *et al.*, 2001). Esta hipótesis concuerda con descripciones previas sobre la citotoxicidad de extractos de FitoP y FitoF obtenidos de *Gracilaria longissima* (algas rojas comestibles) por Martínez-Sánchez *et al.*, (2020), quienes reportaron que no existió ningún efecto citotóxico ni de proliferación celular, así como de inducción de muerte celular en células epiteliales intestinales (línea celular Caco-2) por FitoP y FitoF en concentraciones de hasta 50 ng / mL después de 48 h.

5.1.1.2 Modulación de la respuesta inflamatoria mediada a través de prostaglandinas intracelulares por oxilipinas vegetales después de la inflamación inducida por LPS

Una vez demostrada la ausencia de citotoxicidad de FitoP y FitoF individuales con respecto a las células THP-1, se inició el estudio de su capacidad para modular la inflamación en monocitos inducida por LPS, monitorizando los cambios en el perfil cuantitativo de PG. Así, la capacidad de modular la respuesta inflamatoria se monitorizó evaluando un panel de 21 PG (ver **Tabla 1**), analizadas tanto en células como en el medio de crecimiento de las mismas para obtener el sumatorio de PG intra y extracelulares, proporcionando una imagen completa de la respuesta de PG.

Este diseño experimental permitió proporcionar más información sobre la modulación inflamatoria específica de FitoP y FitoF individuales mediante la evaluación de cambios en la concentración intracelular y extracelular de las 7 PG que se encuentran en cantidades cuantificables ($>$ LOQ) en las células THP-1 (15-keto-PGF_{2α}, PGF_{2α}, 11β-PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, PGDM y PGF_{1α}). Asimismo, este trabajo aporta información complementaria con respecto a descripciones previas de las funciones biológicas de FitoP y FitoF, sobre el perfil de citocinas y/o el fenotipo de células inmunes, ya que estudios anteriores se enfocaron en una única oxilipina vegetal o en extractos vegetales completos de FitoP y FitoF (Gilles *et al.*, 2009; González *et al.*, 2019; Guterthuth *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2018; Martínez-Sánchez *et al.*, 2020; Pino-Ramos *et al.*, 2019; Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005). En este sentido, el uso de extractos completos constituye un enfoque que permite recuperar resultados valiosos, aunque de alcance limitado. A este respecto, siguen siendo necesarias aportaciones experimentales adicionales para una comparación sólida sobre la contribución antiinflamatoria de las diversas oxilipinas vegetales individuales. De hecho, comprender la relevancia biológica de los distintos FitoP y FitoF permitiría seleccionar aquellos alimentos de origen vegetal que tengan el perfil cuantitativo adecuado, de acuerdo con las diversas condiciones fisiopatológicas, en este caso, la inflamación y el estrés oxidativo asociado. Debido a esto, no es sorprendente que la información resultante sobre las atribuciones biológicas, no solo con respecto a las oxilipinas vegetales sino a otros fitoquímicos bioactivos presentes en alimentos, siga siendo inconclusa. Por lo que, evidencias científicas robustas y consistentes, sobre la funcionalidad de estos fitoquímicos y sus mecanismos de acción, son necesarias para poder avanzar en tratamientos

coadyuvantes de procesos fisiopatológicos que cursan con estrés oxidativo e inflamación, el binomio común de una amplia variedad de enfermedades no transmisibles (Medina *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2017).

En relación con el perfil cuantitativo intracelular de PG en lisados celulares de monocitos THP-1, tratados con FitoP y FitoF individuales como agentes que podrían prevenir la inflamación desencadenada por LPS, se cuantificaron 7 PG (15-keto-PGF_{2α}, PGE₂, PGF_{2α}, PGF_{1α}, PGD₂, 11β-PGF_{2α} y PGDM) tanto en células control (no estimuladas con LPS (*no treatment*)), así como en células expuestas a LPS (**Figura 11**).

Al evaluar el efecto de los diversos FitoP y FitoF sobre la modulación de la concentración de PGF_{2α} inducida por LPS, se observó que casi todos los compuestos (9-F_{1t}-FitoP, 9-*epi*-9-F_{1t}-FitoP, *ent*-16-F_{1t}-FitoP, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP, 16-B₁-FitoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-FitoF, *ent*-9 (RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-FitoF y *ent*-16 (RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-FitoF) mitigaron significativamente el aumento de esta PG causada por LPS, proporcionando valores que oscilan entre 3,50 y 11,56 ng / mL. Por el contrario, 9-L₁-FitoP provocó un aumento significativo de la concentración intracelular de PGF_{2α}, hasta 32,51 ng / mL (**Figura 11**).

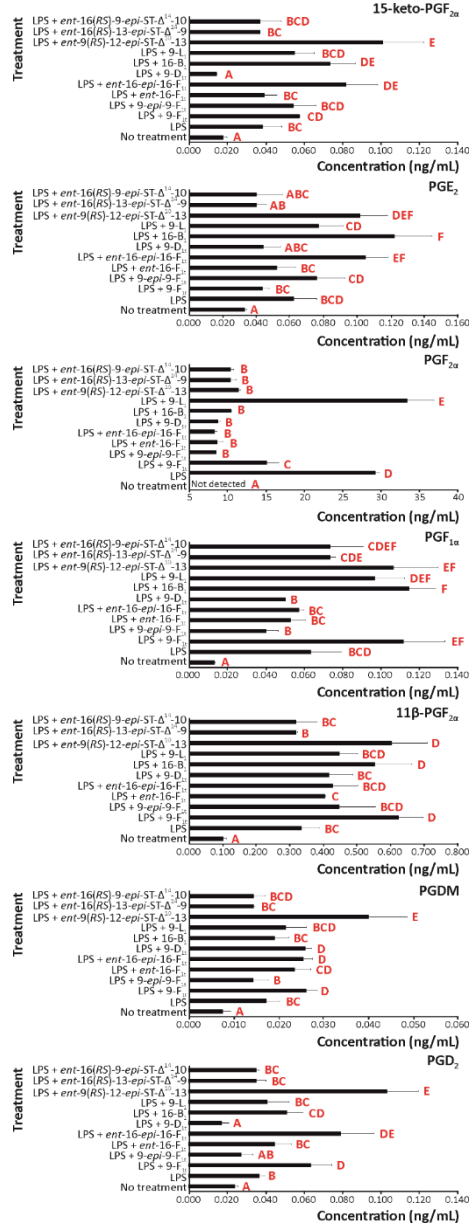


Figura 11. Efecto del tratamiento con FitoP y FitoF individuales de células monocíticas THP-1 estimuladas con LPS en el perfil cuantitativo intracelular de PG (ng / mL). Las PG se determinaron en los extractos de células THP-1 preexpuestas a los 50 μM de las oxilipinas vegetales individuales durante 24 horas, seguida de una coexposición con 100 ng/mL de LPS durante 24 horas adicionales. Los valores muestran la media ± SD (n=3). Las barras con letra mayúscula distinta en cada gráfico de barras fueron significativamente diferentes a p<0,05, según la ANOVA y una prueba de rango múltiple de Tukey.

El nivel las oxilipinas humanas 15-keto-PGF_{2α} y PGE₂ (0,018 y 0,033 ng / mL, respectivamente) aumentó en células estimuladas con LPS 2,1 veces, en promedio, hasta alcanzar 0,038 y 0,062 ng / mL, respectivamente. El aumento de 15-keto-PGF_{2α} (un metabolito de PGF_{2α}) en células estimuladas con LPS fue prevenido por 9-D₁₁-FitoP, ya que disminuyó su concentración a niveles que no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) con respecto a los niveles detectados en células control no tratadas (0,014 ng / mL). Sin embargo, ningún FitoP ni FitoF redujo significativamente la concentración de PGE₂ inducida por LPS (aunque se identificaron tendencias de disminución en las células tratadas con 9-D₁₁-FitoP, 9-F₁₁-FitoP, *ent*-16 (RS) -9-*epi*-ST-Δ¹⁴ -10-FitoF y *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-FitoF, estas no fueron significativas) (**Figura 11**). Por otro lado, las células THP-1 tratadas con 9-F₁₁-FitoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁₁-FitoP o *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-FitoF antes de la exposición a LPS exhibieron una concentración significativamente mayor de 15-keto-PGF_{2α} (0,057, 0,082 y 0,101 ng / mL, respectivamente) en relación con las células tratadas con LPS, mientras que para PGE₂, *ent*-16-*epi*-16-F₁₁-FitoP y 16-B₁-FitoP aumentó su concentración en células THP-1 en un 45,4%, en promedio (**Figura 11**).

En las células THP-1, también se observó que la concentración de PGF_{1α} aumentó de 0,013 ng / mL (células control) a 0,063 ng / mL (células expuestas a LPS). Con relación a la capacidad de FitoP y FitoF para proteger las células contra el efecto proinflamatorio de LPS con respecto a la concentración de PGF_{1α}, se encontró que ninguno de los compuestos probados redujo significativamente el efecto de LPS. Sin embargo, la presencia de 9-*epi*-9-F₁₁-FitoP dio lugar a una concentración más baja (no estadísticamente significativa) (0,040 ng / mL) (**Figura 11**). Por el contrario, algunos FitoP y FitoF impulsaron el aumento inducido por LPS en la concentración de PGF_{1α}, permitiendo la detección de cantidades significativamente aumentadas (0,112, 0,115 y 0,106 ng / mL para 9-F₁₁-FitoP, 16-B₁-FitoP y *ent*-9 (RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-FitoF, respectivamente) (**Figura 11**).

En cuanto a la presencia de PGD₂, cuya concentración en células control (sin exposición a LPS) (0,024 ng / mL) experimentó un aumento significativo después de la exposición a LPS (0,037 ng / mL), 9-D₁₁-FitoP disminuyó la concentración intracelular de PGD₂ inducida por LPS y permitió registrar una concentración incluso más reducida que la observada en células no tratadas (0,017 ng / mL). Además, 9-F₁₁-FitoP, *ent*-16-*epi*-F₁₁-FitoP, 16-B₁-FitoP y *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-

FitoF impulsaron el efecto proinflamatorio del LPS con respecto a PGD₂, dando lugar a concentraciones significativamente superiores a las registradas en las células expuestas a LPS (0,064, 0,079, 0,051 y 0,103 ng / mL, respectivamente) (**Figura 11**). La tendencia registrada estaba relacionada con 11β-PGF_{2α}, el principal metabolito de PGD₂, que aumentó significativamente en las células THP-1 expuestas a LPS hasta 0.335 ng / mL (concentración 3,3 veces mayor que las células de control no tratadas). De nuevo, el efecto proinflamatorio de este activador policlonal sobre la 11β-PGF_{2α} no fue evitado por ninguno de los FitoP y FitoF individuales bajo evaluación. En contraste, 9-F_{1t}-FitoP, 16-B₁-FitoP y *ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF* reforzaron la capacidad de LPS para aumentar la concentración intracelular de 11β-PGF_{2α} (0,593 ng / mL, en promedio, 5,9 veces más alto que las células de control), en relación con las células tratadas con LPS (**Figura 11**).

Además, se encontró PGDM, uno de los metabolitos principales de PGD₂ y un biomarcador utilizado para evaluar la producción endógena de PGD₂, en monocitos THP-1 no tratados, donde su concentración aumentó en células tratadas con LPS (0,008 y 0,017 ng / mL, respectivamente). Una vez más, la mayoría de FitoP y FitoF parecían ser irrelevantes en términos de modular la concentración de PGDM. Aún así, algunos de ellos (9-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP, *ent-16-epi-16-F_{1t}-FitoP* y *ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF*), junto con LPS, contribuyeron al logro de concentraciones significativamente más altas (0,026, 0,025, 0,026 y 0,040 ng / mL, respectivamente).

5.1.1.3. Modulación de la respuesta inflamatoria mediada por prostaglandinas excretadas en el sobrenadante de las células por las oxilipinas vegetales después de la inflamación inducida por lipopolisacáridos

El perfil cuantitativo (ng/mL) de PG en el medio de cultivo de monocitos THP-1 se muestra en la **Figura 12**. Las siete PG encontradas en los lisados celulares también estaban presentes en los sobrenadantes. Dos de las siete PG detectadas no se encontraron en células control no tratadas (PGF_{2α} y su metabolito 15-keto-PGF_{2α}). Por un lado, la PGF_{2α} liberada al medio se redujo significativamente en presencia de 9-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP y 16-B₁-FitoP y *ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF*, que una vez agregados al medio de cultivo como compuestos coadyuvantes contra el efecto proinflamatorio del LPS, mitigó la concentración de PGF_{2α} en 1,60 veces, en promedio, en comparación con las células tratadas con LPS (10,26 ng / mL) (**Figura**

12). Por otro lado, la generación de 15-keto-PGF_{2α} en células tratadas con todas las oxilipinas vegetales fue mayor que en las células expuestas solo al estímulo proinflamatorio, con la excepción de *ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF*, que no mostró diferencias significativas con respecto a las células tratadas con LPS. A este respecto, todas las condiciones experimentales permitieron detectar concentraciones de este metabolito, en el medio de crecimiento (0,021-0,056 ng / mL), más altas que las encontradas en las muestras correspondientes a las células control, no tratadas, en las que no se detectó (**Figura 12**).

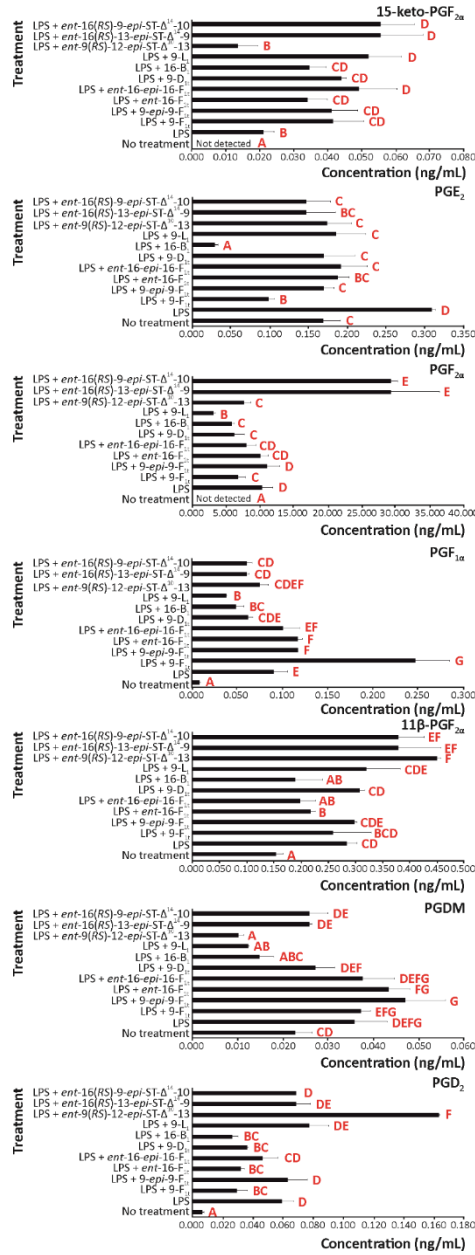


Figura 12. Efecto del tratamiento con fitoprostanos y fitofuranos individuales de las células monocíticas THP-1 estimuladas por LPS en la liberación de prostaglandinas en el medio de crecimiento (ng / mL). Las prostaglandinas se determinaron en los extractos de células enteras de las células THP-1 preexpuestas a los 50 μ M de las oxilipinas individuales de la planta durante 24h, seguidas de una coexposición de 24h con 100 ng/mL de LPS. Los valores muestran la media \pm SD (n=3). Las barras fueron significativamente diferentes a $p < 0,05$, según el ANOVA y la prueba de rango multiple de Tukey.

Con respecto a la PGE₂ liberada al medio, su concentración aumentó 1.8 veces (0,309 ng / mL) como resultado de la exposición a LPS, en comparación con las concentraciones detectadas en las células control (0,169 ng / mL) (**Figura 12**). Todas las oxilipinas vegetales ensayadas disminuyeron la concentración de PGE₂ en el medio de crecimiento, siendo 9-F_{1t}-FitoP y 9-L₁-FitoP los compuestos más eficientes, en concentraciones que fueron incluso más bajas que las descritas en las células control (**Figura 12**).

En cuanto a PGF_{1α}, la liberación en el medio de crecimiento también se incrementó 10 veces en los monocitos THP-1 expuestos a LPS (0,091 ng / mL) en relación con las células no tratadas (0,009 ng / mL) (**Figura 12**). Sin embargo, curiosamente, algunos FitoP y FitoF (9-D_{1t}-FitoP, 16-B₁-FitoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-FitoF y *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-FitoF) o pudieron prevenir el aumento de los niveles de esta PG inducidos por LPS, dando lugar a concentraciones de PGF_{1α} que fueron significativamente más bajas que las registradas en monocitos expuestos al estímulo proinflamatorio (0,057 ng / mL, en promedio). Además, tres FitoP, 9-*epi*-9-F_{1t}-FitoP (0,117 ng / mL), *ent*-16-F_{1t}-FitoP (0,117 ng / mL), y especialmente 9-F_{1t}-FitoP (0,247 ng / mL) mejoraron el efecto del LPS con respecto a la síntesis de PGF_{1α} (**Figura 12**).

Por otro lado, la concentración de PGD₂ liberada en el medio de crecimiento aumentó significativamente (9,8 veces) por la exposición a LPS (**Figura 12**). En este contexto, cuatro FitoP (9-F_{1t}-FitoP, *ent*-16-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP y 16-B₁-FitoP) mitigaron el aumento de PGD₂ provocado por LPS. Sin embargo, para *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-FitoF, tuvo un efecto inflamatorio, liberando mayor cantidad de PGD₂ al medio (0,163 ng / mL) que la detectada en las células expuestas solamente a LPS bacteriano. Por el contrario, *ent*-16-F_{1t}-FitoP y *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-FitoP redujeron significativamente la concentración del metabolito de PGD₂ (11β-PGF_{2α}) en el medio de crecimiento (0,284 ng / mL) y 16-B₁-FitoP (0,202 ng / mL, en promedio). Paralelamente, los tres FitoF (*ent*-9(RS) -12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-FitoF, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-FitoF, y *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-FitoF) proporcionaron un estímulo colaborativo al efecto provocado por el LPS, aumentando la concentración de 11β-PGF_{2α} significativamente (0,403 ng / mL, en promedio) (**Figura 12**). Al evaluar la modulación de la concentración de otro metabolito de PGD₂ (PGDM) debido a los tratamientos aplicados a las células THP-1, se observó que su concentración en el medio de crecimiento se incrementó 1,6 veces después de la

exposición a LPS (**Figura 12**), aunque el incremento observado no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$). No obstante, dos FitoP (9-L₁-FitoP y 16-B₁-FitoP) y un FitoF (*ent-9(RS)-12-epi-ST- Δ ¹⁰-13-FitoF*) disminuyeron la cantidad de PGDM liberado al medio, detectando concentraciones finales de 0,015, 0,012 y 0,010 ng / mL, respectivamente (**Figura 12**).

5.1.2. Desentrañar el papel de los fitoprostanos y fitofuranos como moduladores del perfil de prostaglandinas de monocitos THP-1 estimulados con lipopolisacáridos

Aunque los cambios en las concentraciones intra y extracelulares de PG como resultado de la aplicación de FitoP y FitoF individuales como agentes preventivos de la inflamación, podrían indicar actividades biológicas controvertidas de los compuestos diana, debe tenerse en cuenta que ambos son el resultado del metabolismo de las células THP-1. En consecuencia, esto implicaría que las diversas oxilipinas humanas monitorizadas en el presente trabajo podrían caracterizarse por cinéticas distintas, no solo en lo que respecta a su síntesis sino también a su secreción extracelular. En este sentido, considerar el nivel de estas oxilipinas en su conjunto (concentraciones acumulativas intra y extracelulares) ayudaría a comprender la capacidad real de FitoP y FitoF individuales para modular la respuesta inflamatoria.

Así, en este contexto, aplicando un enfoque analítico lipidómico, como el descrito en la presente Tesis Doctoral, se observó que la concentración de las PG, PGE₂ y PGDM, no se modificó significativamente ni por la exposición al estímulo proinflamatorio aplicado, ni por el tratamiento con oxilipinas vegetales (**Figura 13**). Además, con respecto a la capacidad de estos compuestos para prevenir la modulación de la síntesis de PG inducida por LPS, el aumento detectado para las PG, 15-keto-PGF_{2 α} , PGF_{1 α} y 11- β -PGF_{2 α} no fue revertido por ni por FitoP ni FitoF individuales. De hecho, con respecto a determinados FitoP y FitoF, se observó una actividad biológica que refuerza el efecto proinflamatorio del LPS bacteriano. Esto se observó para la 15-keto-PGF_{2 α} donde casi todos los FitoP y FitoF, aunque de manera no significativa, exhibieron la capacidad de aumentar la concentración registrada al tratar células THP-1 con LPS en 1,7 veces, en promedio. Una tendencia similar también fue detectada para PGF_{1 α} y 11- β -PGF_{2 α} , para las cuales las

oxilipinas vegetales aumentaron su concentración hasta 2,3 y 1,7 veces, en promedio, en relación con las células tratadas solamente con el estímulo inflamatorio (0,077 y 0,310 ng / mL, respectivamente). Además, para estas dos PG, el aumento fue estadísticamente significativo ($p < 0,01$) para 9-F_{1t}-FitoP (0,179 ng / mL) y *ent-16(RS)-9-epi-ST- Δ^{14} -10-FitoF* (0,527 ng / mL) (**Figura 13**).

Por el contrario, las oxilipinas vegetales también presentaron actividad biológica para mitigar el aumento de PG específicas inducidas por LPS. En este sentido, el aumento inducido en la concentración de PGF_{2 α} fue evitado significativamente por *ent-16-epi-16-F_{1t}-FitoP*, 9-D_{1t}-FitoP, 16-B₁-FitoP, *ent-16(RS)-9-epi-ST- Δ^{14} -10-FitoF* y *ent-16(RS)-13-epi-ST- Δ^{14} -9-FitoF*, que restauraron los valores a niveles de los controles no tratados (**Figura 13**). De manera similar, con respecto específicamente a PGD₂, aunque la mayoría de los FitoP y FitoF evaluados no proporcionaron una mitigación significativa de los cambios proinflamatorios inducidos por LPS, 9-D_{1t}-FitoP redujo su nivel a los valores encontrados muestras control. Aunque, es importante mencionar que nuevamente *ent-16(RS)-9-epi-ST- Δ^{14} -10-FitoF* reforzó el aumento de PGD₂ inducido por LPS, dando lugar a concentraciones aún significativamente mayores (0,133 ng / mL) (**Figura 13**).

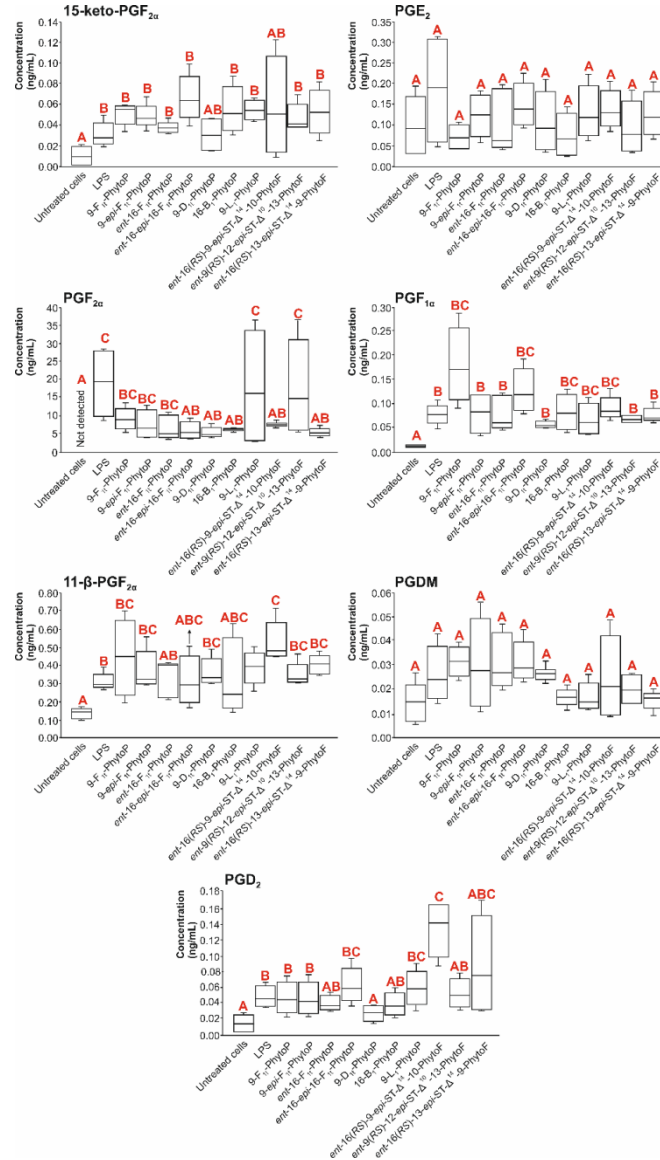


Figura 13. Diagrama de Caja-Bigotes (BoxPlot) con cuartiles (valores superiores al 75%, mediana del 50% y valores inferiores del 25%) del efecto *in vitro* de los FitoP y FitoF sobre las prostaglandinas totales (intracelulares y extracelulares) de las células THP-1 preexpuestas a 50µM de oxilipinas vegetales individuales durante 24 horas, seguidas de un tratamiento de 24 horas con 100 ng/mL de LPS. Letra mayúscula diferente en cada diagrama indicadiferencias estadísticas ($p < 0,05$), según el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey.

Las actividades biológicas de FitoP y FitoF se han investigado en base a su similitud estructural con oxilipinas de mamíferos derivadas del ácido araquidónico (C20: 4, n-6, AA) (isoprostanos y prostaglandinas) que presentan importantes funciones biológicas, ya que son considerados marcadores de la peroxidación lipídica (Galano *et al.*, 2017). En este sentido, hasta la fecha, la bioactividad de FitoP y, en menor grado, de FitoF, se ha descrito principalmente por su poder inmunomodulador (González *et al.*, 2019; Gilles *et al.*, 2009; Gilles *et al.*, 2010; Mariani *et al.*, 2007; Oeder *et al.*, 2015; Soh *et al.*, 2019; Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005), actividad anticancerígena (Gutiérrez-Pajares *et al.*, 2019), y potencial antiinflamatorio (González *et al.*, 2019; Marnett *et al.*, 2000; Martínez-Sánchez, *et al.*, 2020; Minghetti *et al.*, 2014; Roberts & Morrow, 2002; Straus & Glass, 2001). Sin embargo, a pesar de dichas evidencias científicas, el conocimiento actual sobre las funciones biológicas de estos compuestos aún es escaso, y se limita a evaluar extractos de plantas enteras y, en casos excepcionales, algunos FitoP individuales (por ejemplo, 16-E₁-FitoP). Al mismo tiempo, sigue existiendo una brecha de información sobre el interés biológico de la mayoría de FitoP y FitoF descritos hasta la fecha.

En este contexto, la disponibilidad actual de una amplia gama de estándares de FitoP y FitoF sintetizados (Cuyamendous *et al.*, 2016; Cuyamendous *et al.*, 2017; El Fangour *et al.*, 2004; El Fangour *et al.*, 2005; Guy *et al.*, 2004; Pinot *et al.*, 2008) han permitido diseñar ensayos experimentales que contribuirán a aclarar las funciones biológicas de estas oxilipinas vegetales, proporcionando información valiosa que puede completar el conocimiento actual. En cuanto a los diversos aspectos planteados, uno que debe abordarse es la capacidad de FitoP y FitoF para modular la concentración de isoprostanoides de mamíferos. Esto es de particular relevancia debido al papel de los isoprostanoides en una amplia gama de eventos fisiopatológicos, como la inmunomodulación, vasoconstricción, activación plaquetaria y antiagregación, contracción del músculo liso de los bronquios y propiedades antiinflamatorias e inductoras de apoptosis (Medina *et al.*, 2014). Por lo tanto, describir la capacidad de FitoP y FitoF para modular el nivel de PG durante la inflamación permitiría comprender mejor el interés biológico y funcional de las oxilipinas vegetales.

En cuanto a la capacidad inmunomoduladora ya demostrada de los FitoP, ha sido atribuida debido a la analogía estructural con PG humanas (por ejemplo, 16-

E₁-FitoP *vs.* PGE₂) (Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005). Esta similitud estructural permite que 16-E₁-FitoP imite la funcionalidad de PGE₂, inhibiendo así la producción de interleucina (IL)-12 por las células dendríticas y la activación de los mecanismos dependientes del receptor gamma activado para proliferación de peroxisoma (PPAR- γ), que a su vez provocan la inhibición del factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF- κ B) (Gilles *et al.*, 2009; Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005). Curiosamente, estas vías también están involucradas en la inflamación y podrían indicar que la modulación del nivel de PG que se logra cuando se expone a un estímulo proinflamatorio, podrían estar relacionada con un efecto antiinflamatorio de FitoP y FitoF (**Figuras 11 y 12**).

De hecho, además de las competencias inmunomoduladoras, los isoprostanoïdes humanos también se han asociado explícitamente a la actividad antiinflamatoria debido a la presencia de un sistema de anillo A, J o desoxi-J en su estructura (Straus & Glass, 2001). Por lo tanto, la presencia de estos grupos reactivos (grupos hidroxilo y keto) en el anillo de ciclopentenona, y propiedades electrofílicas adicionales presentes en la estructura química de FitoP y FitoF, han llevado a la evaluación de bioactividades coincidentes sobre la modulación de la inflamación por estas oxilipinas vegetales. En este sentido, la evaluación de diversas FitoP sobre funciones antiinflamatorias ha permitido señalar las series 9 y 16 de FitoP A1, B1 y desoxi-J1, como aquellas con mayor potencial antiinflamatorio (Marnett *et al.*, 2009), atribuido a su analogía estructural con la PGA₁ y la desoxi-PGJ₂ identificadas en mamíferos (Roberts & Morrow, 2002).

Por otro lado, y teniendo en cuenta la vida media tan corta de las PG primarias, en el presente estudio, las PG también se monitorizaron después de una hidrólisis enzimática que rompe los restos glucurónidos unidos a las PG (Moita *et al.*, 2013), determinando así todos los isoprostanoïdes presentes en los lisados y sobrenadantes de las células y evitando subestimaciones en su concentración (Medina *et al.*, 2012a).

Evidencias previas han descrito que la infección de células por microorganismos activa la respuesta inflamatoria debido al reconocimiento del LPS presente en la pared microbiana por receptores de células inmunes (Takeuchi & Akira, 2010), lo que resulta en una sobreproducción de mediadores inflamatorios, sintetizados a partir de PGH₂ (generada por la lipooxidación enzimática (COX-2) del AA), con la participación también de varias PG sintasas (Harada *et al.*, 1996)

(Figura 14). En este contexto existen PG, como PGE₂ con propiedades biológicas versátiles en relación con el proceso de inflamación, ya que pueden actuar como moléculas proinflamatorias o antiinflamatorias, dependiendo de la unión a diferentes E-receptores de prostanoïdes (EP) (EP1, EP2, EP3 y EP4) (Ricciotti & FitzGerald, 2011, Kashmiry *et al.*, 2018). Se ha descrito que la participación de PGE₂ en la inflamación tiene un papel multifacético. Esto implica efectos biológicos proinflamatorios durante las fases iniciales del proceso inflamatorio, incluido el reclutamiento, la activación, la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis, así como el aumento de los nervios sensoriales para amplificar la respuesta al dolor (Nakanishi & Rosenberg, 2013). Sin embargo, la PGE₂ también controla los mecanismos relacionados con la resolución de la inflamación en fases posteriores actuando como agente inmunosupresor con respecto a los perfiles de citocinas y quimiocinas expresados por las células inmunes (IL-12, IL-12p40, IFN- γ y TNF- α , entre otros), así como el nivel de expresión de sus receptores afines (Kalinski, 2012). Dicho efecto antiinflamatorio es de especial relevancia en monocitos, en los cuales, la PGE₂ desencadena la inhibición de las quimiocinas responsables de la quimioatracción de las células T vírgenes (CCL19), lo que interfiere con la activación de las células T efectoras (Muthuswamy *et al.*, 2010).

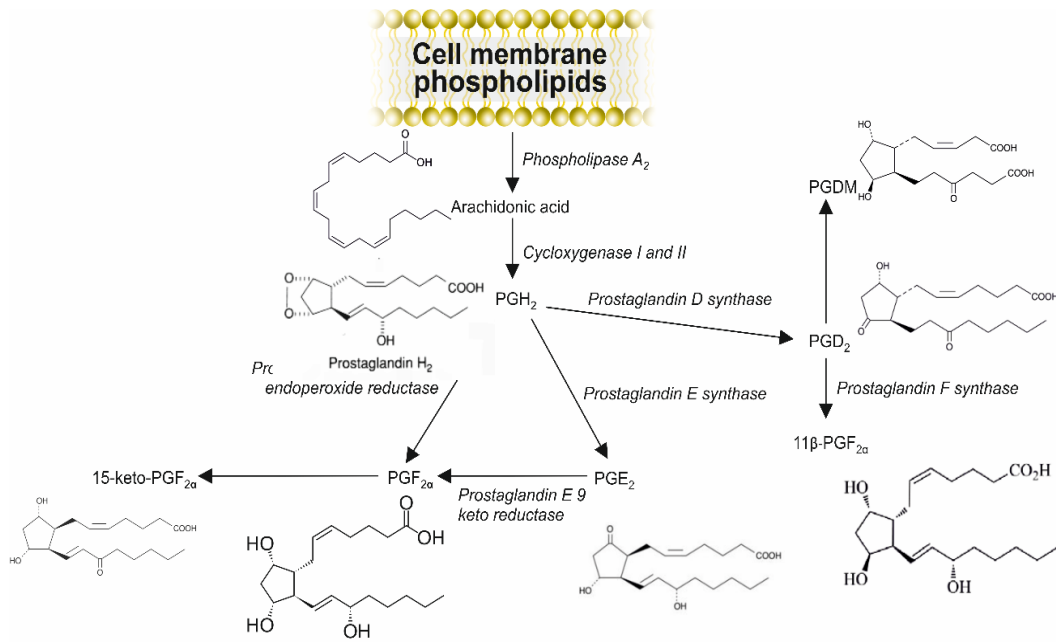


Figura 14. Vías metabólicas que afectan al perfil de prostaglandinas evaluado en monocitos (línea celular THP-1) estimulados por LPS preexpuestos a FitoP (9-F1t-FitoP, 9-epi-9-F1t-FitoP, ent-16-F1t-FitoP, ent-16-epi-16-F1t-FitoP, 9-D1t-FitoP, 16-B1-FitoP, y 9-L1-FitoP) y FitoF (ent-16(RS)-9-epi-ST-Δ14-10-FitoF, ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ10-13-FitoF, y ent-16(RS)-13-epi-ST-Δ14-9-FitoF).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidenciaron una modulación de la PGE₂ intracelular y su liberación al medio de crecimiento. Por lo tanto, en presencia de FitoP y FitoF específicos (9-F1t-FitoP, 9-D1t-FitoP, ent-16(RS)-9-epi-ST-Δ¹⁴-10-FitoF y ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-FitoF) en el medio, provocó una disminución, aunque no significativa ($p > 0,05$), de esta PG (**Figura 11**). A este respecto, diversos estudios *in vivo* han demostrado que este efecto podría deberse a una inhibición de la enzima COX-2, lo que conlleva la posterior disminución de la concentración de PGE₂ (Harada *et al.*, 1996), evitando la cascada de señalización proinflamatoria desencadenada por esta PG (Gilles *et al.*, 2009; Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005). Alternativamente, algunos FitoP (ent-16-F1t-FitoP y 16-B1-FitoP) indujeron un aumento significativo de PGE₂ en células THP-1, lo que sugiere actividades específicas, o incluso contrapuestas de las diversas oxilipinas vegetales en el metabolismo de PGE₂, afectando posiblemente la actividad de la PGE₂ sintasa y

COX-2 (Murakami *et al.*, 2000). Además, esta actividad moduladora no fue exactamente igual al considerar los niveles intracelulares y extracelulares, lo que podría deberse a una ventana de tiempo requerida para que la actividad biológica de las diversas FitoP y FitoF sea efectiva, dependiendo de diferentes rutas de señalización (Du *et al.*, 2016). Este resultado permite sugerir que FitoP y FitoF, a través de su ambigüedad funcional para modular de PGE₂, podrían estar involucrados en las diferentes fases del proceso inflamatorio de una determinada enfermedad (Andreasen *et al.*, 2008). Curiosamente el análisis total (concentraciones intra y extracelulares de PGE₂) no reprodujo las diferencias significativas observadas al analizar ambas fracciones por separado, lo que refuerza la idea sobre la relevancia de la cinética de síntesis de esta PG y el efecto separación FitoP y FitoF en fases específicas del proceso inflamatorio.

Por otro lado, la PGE₂, a través de la acción de la PGE₂ 9-keto-reductasa, se reduce para obtener PGF_{2 α} , que a su vez, también puede sintetizarse a partir de PGH₂ como resultado de una reducción catalizada por la endoperóxido-reductasa de PGH₂ (Burgess *et al.*, 1987) (**Figura 14**). Por lo tanto, PGF_{2 α} participa en la creación del entorno inflamatorio al influir en la síntesis y secreción de IL1 β , IL6, IL8 y TNF α (Xu *et al.*, 2015). PGF_{2 α} no se detectó en células THP-1 ni se liberó al medio de crecimiento en muestras control sin el estímulo proinflamatorio, mientras que después de la exposición a LPS, se encontraron concentraciones tanto intra- como extracelulares (**Figura 11 y 12**). La concentración disminuida de PGF_{2 α} inducida por FitoP y FitoF específicos (9-F_{1t}-FitoP, 9-D_{1t}-FitoP, 16-B₁-FitoP, 9-L₁-FitoP y *ent*-9(*RS*)-12-*epi*-ST- Δ ¹⁰-13-FitoF) podría atribuirse a una disminución de la síntesis de PGE₂ de acuerdo con los posibles mecanismos de acción mencionados anteriormente (Murakami *et al.*, 2000) o incluso a la inhibición de las rutas enzimáticas responsables de su formación a partir de PGE₂ o PGH₂ o enzimas caracterizadas por una alta homología de secuencia como las PGF sintasas AKR1C2 y AKR1C3, entre otras (Duffy *et al.*, 2015). Esta tendencia fue aún más fuerte al considerar el PGF_{2 α} liberado en el medio de crecimiento, donde casi todos los FitoP y FitoF mitigaron la concentración de este PG. Esto es de particular relevancia con respecto a 9-L₁-FitoP, que sorprendentemente exhibió la capacidad más potente para aumentar el nivel intracelular de PGF_{2 α} , mientras que con respecto a la cantidad de esta PG liberada al medio de crecimiento, apareció como el compuesto más potente para disminuir la concentración de PGF_{2 α} en el medio de cultivo de

THP-1. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que existen ventanas de tiempo específicas para la acción biológica separada de las oxilipinas vegetales.

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ es, a su vez, rápidamente metabolizada a 15-*keto*- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (**Figura 14**), la cual se caracteriza por una actividad antiinflamatoria (Nylund *et al.*, 2011). La regulación al alza de la concentración intracelular de 15-*keto*- $\text{PGF}_{2\alpha}$ inducida por FitoP y FitoF específicos (*ent*-16-*epi*-16- F_{1t} -FitoP, 16- B_1 -FitoP y *ent*-9(*RS*)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-FitoF), o regulación a la baja (9- D_{1t} -FitoP). Por lo tanto, dicho resultado sugiere fuertemente el potencial antiinflamatorio de 9- D_{1t} -FitoP, de acuerdo con las funciones biológicas descritas para el 15-*keto*- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Nylund *et al.*, 2011).

De igual manera, se encontró $\text{PGF}_{1\alpha}$, una PG derivada del ácido dihomo- γ -linolénico, en el lisado de células THP-1 y en el medio de crecimiento de los monocitos estimulados con LPS. Aunque ningún FitoP ni FitoF exhibió la capacidad de mitigar el aumento en la concentración intracelular de $\text{PGF}_{1\alpha}$, su liberación en el medio de crecimiento fue significativamente disminuida por 9- L_1 -FitoP, 16- B_1 -FitoP, *ent*-16(*RS*)-13-*epi*-ST- Δ^{14} -9-FitoF y *ent*-16(*RS*)-9-*epi*-ST- Δ^{14} -10-FitoF (**Figuras 11 y 12**). Sin embargo, el análisis conjunto de los niveles intra y extracelulares realizado para proporcionar información sobre la síntesis total de este PG como resultado de los tratamientos monitorizados, no confirmó la capacidad de FitoP y FitoF para modular su síntesis, que nuevamente, podría estar relacionado con la capacidad de estos compuestos para participar en fases específicas del proceso inflamatorio, aunque futuras investigaciones en esta línea son necesarias para obtener evidencias científicas consistentes sobre dicho fenómeno.

Por otra parte, la PGD₂, que también se detectó en los monocitos THP-1, está estrechamente involucrada en el curso y la resolución de la inflamación. En este sentido, la PGD₂ es sintetizada a partir de PGH₂ por la prostaglandina D-sintasa y metabolizada a varias moléculas, entre ellas 11 β - $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGDM, que mantienen las características pro- y antiinflamatorias descritas anteriormente para la PGE₂ en las diversas fases del proceso inflamatorio. El interés biológico de PGD₂ y sus metabolitos con respecto a la inflamación se encuentra en su capacidad para activar el receptor PPAR- γ , contribuyendo así a la resolución de la inflamación (Song *et al.*, 2008). Además, se observó una respuesta similar de PGD₂ y 11 β - $\text{PGF}_{2\alpha}$ tanto en células THP-1 como en medio de crecimiento, tratado con FitoP y FitoF

individuales como agentes moduladores de la inflamación inducida por LPS (**Figuras 11 y 12**).

5.2 UN FITOPROSTANO DE GRACILARIA LONGISSIMA AUMENTA LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA, LA ADHESIÓN DE LAS PLAQUETAS A LOS LEUCOCITOS Y LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES MEDIANTE SU POSIBLE UNIÓN AL RECEPTOR DE PROSTAGLANDINAS EP3

Los prostanoides tienen la capacidad de unirse a numerosos receptores de la membrana celular modulando la homeostasis y ejerciendo un papel determinante en procesos patogénicos tales como la respuesta inflamatoria, la agregación plaquetaria o la regulación del tono vascular. Su funcionamiento se produce a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) afines.

De todos los prostanoides, la prostaglandina E₂ resulta ser la biomolécula más sintetizada en el cuerpo humano. En los últimos años se ha descubierto que esta presenta cuatro subtipos de receptores EP (EP1, EP2, EP3 y EP4) (Markovic *et al.*, 2017), permitiendo así activar las vías de señalización pertinentes para mantener la homeostasis. Entre ellos, los receptores EP3 y EP4 se presentan en mayores concentraciones en las plaquetas y endotelio humanos. De acuerdo con estos hallazgos, un estudio reciente mostró que la PGE₂ puede unirse a un receptor protrombótico (EP3) o antitrombótico (EP4) en la superficie de las plaquetas (Iyu *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha demostrado que el FitoP *ent-9-D₁₁* de la macroalga roja *Gracillaria longissima* estimula las respuestas proinflamatorias asociadas a la disfunción endotelial (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). Por tanto, desde el punto de vista biológico, estas oxilipinas vegetales podrían ejercer su efecto a través de la activación de los receptores prostanoides. Sin embargo, falta evidencia que respalde el papel de FitoP en la regulación de plaquetas y células sensibles a los prostanoides.

Para identificar el mecanismo subyacente regulado por FitoP de interés, se debe dilucidar su receptor correspondiente. Para ello, los métodos computacionales complementarios, como la dinámica molecular, han sido empleados con el fin de comprender la interacción del compuesto, en este caso 9-D₁₁-FitoP, con la célula e informar sobre su bioactividad. De esta forma se podría demostrar la actividad funcional de los FitoP como antiagregantes plaquetarios y moduladores de la vasodilatación en células humanas. Es comprensible que la caracterización *in vitro* e *in silico* de estos compuestos purificados individualmente

puedan mejorar nuestra comprensión sobre sus implicaciones biológicas en la salud y la enfermedad.

En el presente capítulo se comprobarán los efectos de 9-D_{1t}-FitoP en marcadores de activación plaquetaria y células vasculares humanas, así como aclarar, a través de simulaciones de acoplamiento, posibles interacciones con el receptor EP3.

5.2.1 Composición individual de FitoP y FitoF en el extracto de *Gracillaria longissima*

El análisis de las oxilipinas individuales y totales se realizó mediante UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS. La especie de oxilipina más abundante en el extracto fue el compuesto 9-D_{1t}-FitoP (FP-2), siendo al menos 29 veces mayor que los segundos FitoP y FitoF más abundantes (**Tabla 2**).

Tabla 2. Niveles de oxilipinas (FitoP y FitoF, ng/muestra) en la materia prima, después de la extracción con metanol

Muestra	FitoP ^z								FitoF ^y		
	FP-1	FP-2	FP-3	FP-4	FP-5	FP-6	FP-7	Total	FF-2	FF-3	Total
1	38,5	1591	55,1	0,2	3,1	9,0	13,6	1717,9	23,1	13,6	208,7
2	25,2	752	26,7	<0,1	1,1	3,6	7,0	717,2	31,7	6,7	1036,7
3	52,8	1967	44,8	0,2	3,4	10,0	12,1	2100,6	7,7	12,1	827,4

5.2.2 El extracto de FitoP estimula la activación y agregación plaquetaria

Dado que la oxilipina más abundante encontrada en el extracto era la 9-D_{1t}-FitoP, el presente estudio pretendía evaluar su particular bioactividad sobre los elementos vasculares, así como descifrar los potenciales receptores en humanos. Para ello, nuestro trabajo anterior estudió el efecto del extracto de *Gracillaria longissima* rico en 9-D_{1t}-FitoP en las células endoteliales, pero aún no se ha probado en las plaquetas humanas.

Por lo tanto, primero probamos la hipótesis de que el extracto rico en 9-D₁₁-FitoP estimula la expresión de marcadores de activación plaquetaria en sangre fresca. La preincubación con el extracto solo fue capaz de sobre expresar la glicoproteína IV (CD36), un marcador de estrés aterosclerótico ($p=0,0009$) (**Figura 15B**). Sin embargo, se encontró un efecto sinérgico en la expresión de CD62P y CD36 cuando se añadieron ADP o AA junto con el extracto (todos $p<0,01$) (**Figura 15A-B**). Se observó una buena correlación entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD62P y CD36 para todas las condiciones. Por último, la agregación plaquetaria (marcador dependiente de CD61) se inició en respuesta al ADP, pero también en la combinación con extracto/ADP y extracto/AA, mostrando de nuevo un efecto sinérgico con el AA (**Figura 15C**). El AA por sí solo no fue capaz de estimular la agregación plaquetaria (disminución de CD61) de manera significativa (**Figura 15C**). Estos resultados indican que el extracto de *Gracilaria longissima* por sí solo induce la activación plaquetaria, pero no fue suficiente para una respuesta de agregación.

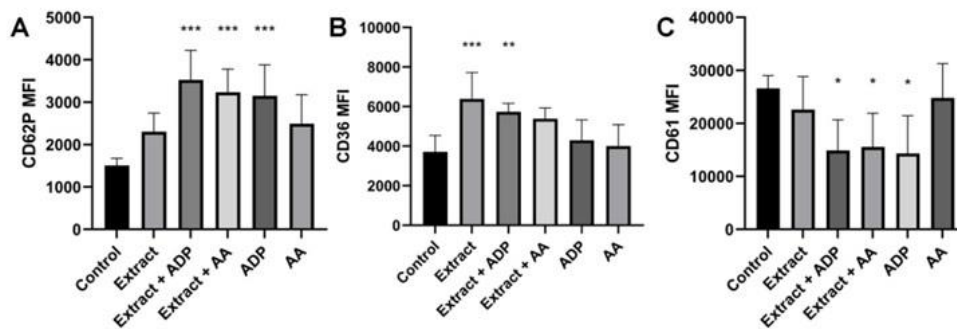


Figura 15. Efectos del extracto de *Gracilaria longissima* rico en 9-D₁₁-FitoP sobre los marcadores de activación plaquetaria. A) Expresión de CD62P (P-selectina). B) Expresión de CD36 (glicoproteína IV). C) Expresión de CD61 (glicoproteína IIIa). Las concentraciones finales en sangre citada fueron: 129 nM de extracto, 2 $\mu\text{mol/L}$ de ADP y 3 $\mu\text{g/mL}$ de AA. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Las barras muestran la media y la desviación estándar ($n=9$ donantes de sangre diferentes). Las estrellas denotan diferencias significativas en comparación con las muestras sin activación (PBS, control) */**/** = $p < 0,05/0,01/0,001$.

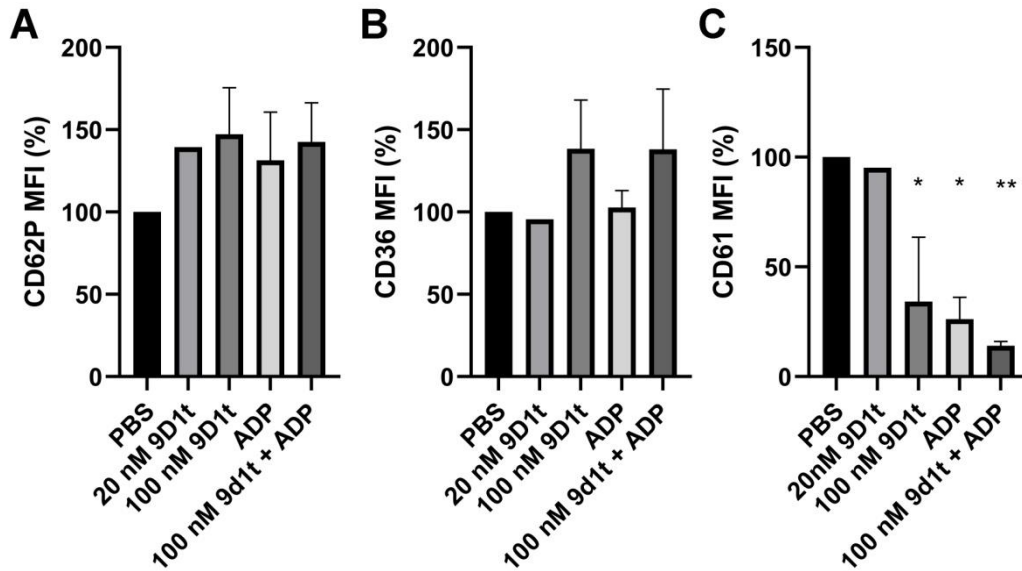


Figura 16. Efectos de la 9-D_{1t}-FitoP sobre los marcadores de activación plaquetaria. A) Expresión de CD62P (P-selectina). B) Expresión de CD36 (glicoproteína IV). C) Expresión de CD61 (glicoproteína IIIa). Las concentraciones finales en sangre citada fueron 20-100 nM de 9-D_{1t}-FitoP y 2 μmol/L de ADP. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Las barras muestran la media y la desviación estándar (n=3 donantes de sangre diferentes). Las estrellas denotan diferencias significativas en comparación con las muestras sin activación (PBS, control) **/** = p < 0,01/0,001.

5.2.3 9-D_{1t}-FitoP afecta a la agregación plaquetaria a través de los receptores EP

A continuación, comprobamos la hipótesis de que el tratamiento con 9-D_{1t}-FitoP modula la activación plaquetaria inducida por ADP. Se trató sangre total citrada (n = 5 donantes de sangre) con 20 y 100 nM de 9-D_{1t}-FitoP purificada durante 10 min antes de la estimulación con ADP. En la **Figura 16 A-B**, la capacidad de 100 nM de 9-D_{1t}-FitoP para aumentar la expresión de P-selectina y CD36 en plaquetas individuales fue significativa (ambas p < 0,001). El tratamiento con 20 nM de 9-D_{1t}-FitoP sola no desencadenó la agregación plaquetaria (p = 0,723), pero sí lo hizo una concentración mayor (100 nM) (p < 0,001, **Figura 16C**). 9-D_{1t}-FitoP también

fue capaz de aumentar el grado de agregación plaquetaria inducida por ADP ($p < 0,001$), lo que concuerda con datos anteriores con extracto de *Gracilaria longissima* rico en 9-D₁₁-FitoP.

Dado que las plaquetas expresan principalmente dos receptores para prostanoides (receptores EP3 y EP4), se determinaron los efectos de 100 nM de 9-D₁₁-FitoP sobre la activación plaquetaria en sangre total, inducida por ADP como agonista, en presencia de ligandos selectivos de los receptores EP3 y EP4 (**Figura 17**). A esta elevada concentración de ADP (20 μ M), no observamos ningún efecto de la preincubación con 40 nM de PGE2 sobre la agregación plaquetaria (CD61) o la expresión de CD62P (**Figura 17 A-C**), incluso en presencia de 100 nM de 9-D₁₁-FitoP, aunque la expresión de CD36 tendió a aumentar ($p = 0,056$, **Figura 17**). La combinación de ligandos y 100 nM 9-D₁₁-FitoP mostró ligeramente un efecto sinérgico en presencia de 200 nM Sulprostona para CD36 ($p = 0,051$). No obstante, la estimulación con ADP no pareció adecuada para la caracterización de la 9-D₁₁-FitoP. Por lo tanto, se realizó el mismo experimento sin ADP como agonista.

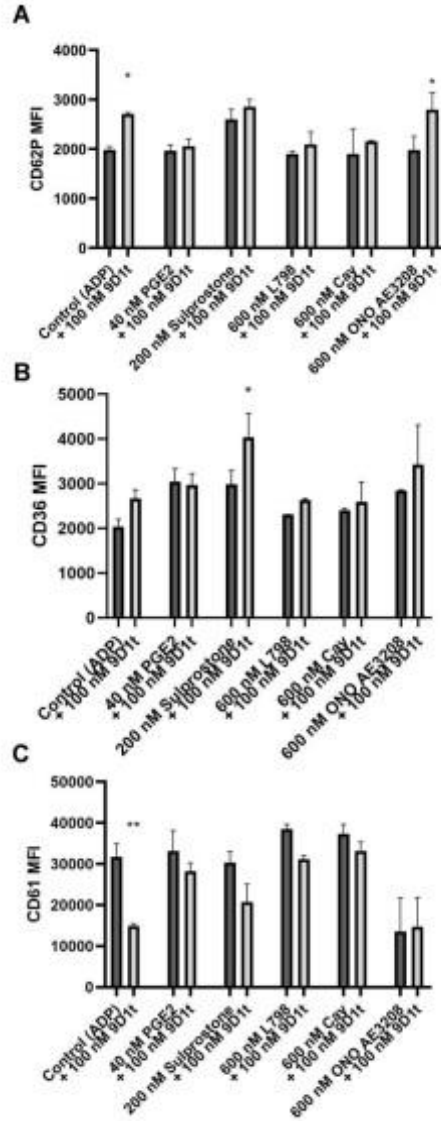


Figura 17. Efectos de la 9-D₁₁-FitoP y de los ligandos del receptor EP sobre los marcadores de activación plaquetaria, bajo estimulación con ADP. (A) Expresión de CD62P (P-selectina). (B) Expresión de CD36 (glicoproteína IV). (C) Expresión de CD61 (glicoproteína IIIa). La concentración final de ADP en sangre total citrada fue de 20 $\mu\text{mol/L}$, durante 2 min. IMF: intensidad media de fluorescencia. Las barras muestran la media y la desviación estándar ($n = 3$ donantes de sangre diferentes). Las estrellas denotan diferencias significativas en comparación con las muestras sin activación (control, ADP) */** = $p < 0,05/0,01$

En ausencia de un agonista del ADP (**Figura 18**), los distintos moduladores por sí solos no presentaron la capacidad de estimular significativamente la activación y agregación plaquetaria (todos $p > 0,05$). Sólo ONO AE3-208 (antagonista EP4) mostró un perfil protrombótico (**Figura 18 A-B**) ($p = 0,0007$ para CD62P), en un patrón similar al de 9-D₁₁-FitoP ($p = 0,018$). Además, la agregación plaquetaria (disminución de CD61) inducida por 9-D₁₁-FitoP (CD61, $p = 0,0146$), fue bloqueada por los ligandos EP3, PGE2 (agonista, $p = 0,048$) y L798-106 (antagonista, $p = 0,015$), denotando así una posible competencia por el mismo receptor, pero no por Sulprostone ($p = 0,83$). No aparecieron cambios en estos marcadores plaquetarios cuando 9-D₁₁-FitoP y los moduladores EP4 se incubaron juntos, en comparación con 9-D₁₁-FitoP sola (todos $p > 0,05$).

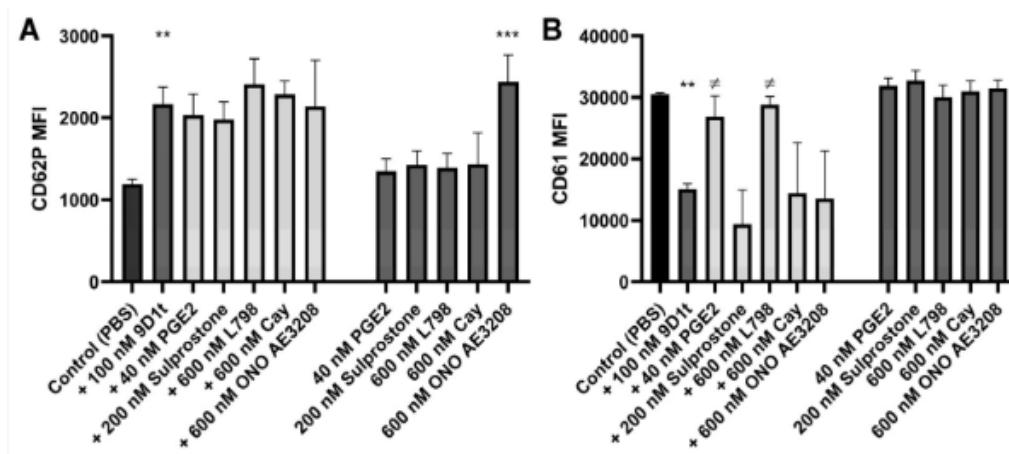


Figura 18. Efectos de 100 nM 9-D₁₁-FitoP aislado o en combinación con distintos ligandos del receptor EP sobre la expresión de marcadores de activación plaquetaria. (A) Expresión de CD62P (P-selectina). (B) Expresión de CD61 (glicoproteína IIIa). Se estimularon muestras de sangre total durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. IMF: Intensidad media de fluorescencia. Las barras muestran la media y la desviación estándar ($n = 5$ donantes de sangre diferentes). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a la condición de control (PBS); y # $p < 0,05$ frente a 9-D₁₁-FitoP.

A continuación, examinamos los efectos de 9-D₁₁-FitoP sobre los marcadores de activación plaquetaria bloqueando primero los receptores EP3/EP4. En consecuencia, encontramos una reducción de la activación/agregación en presencia de ligandos EP3, denotando así la contribución de la 9-D₁₁-FitoP a la agregación a través del receptor EP3 (**Figura 19**, todas las $p > 0,05$), mientras que en presencia de Cay10598, el tratamiento con 100 nM de 9-D₁₁-FitoP estimuló la activación y la agregación (CD62P $p < 0,001$ y CD61 $p = 0,358$, respectivamente).

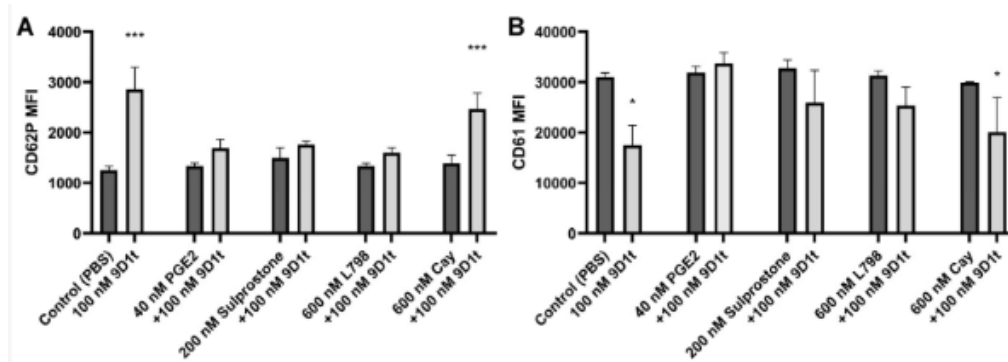


Figura 19. El agonista EP4 Cay10598 inhibe el efecto de 9-D₁₁-FitoP. (A) Expresión de CD62P (P-selectina). (B) Expresión de CD61 (glicoproteína IIIa). Se preincubaron muestras de sangre total con ligandos EP3/EP4 (negro) durante 10 min más 100 nM de 9-D₁₁-FitoP (gris) durante 10 min adicionales a 37 °C y se analizaron por citometría de flujo ($n = 5$). IMF: intensidad media de fluorescencia. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ frente a la condición de control (PBS).

5.2.4 9-D₁₁-FitoP solo no aumenta la adhesión plaquetaria a los leucocitos

Existen pruebas de que los efectos globales de los prostanoides sobre la función plaquetaria humana son consecuencia de un equilibrio entre los efectos estimuladores ejercidos en el receptor EP3 y los efectos inhibidores que actúan en el receptor EP4. Para ello, probamos los efectos de ligandos de estos dos receptores en combinación con 9-D₁₁-FitoP purificado y examinamos la adhesión plaquetaria a leucocitos mediante FCM (**Figura 20**, Q2: CD14+CD42b+).

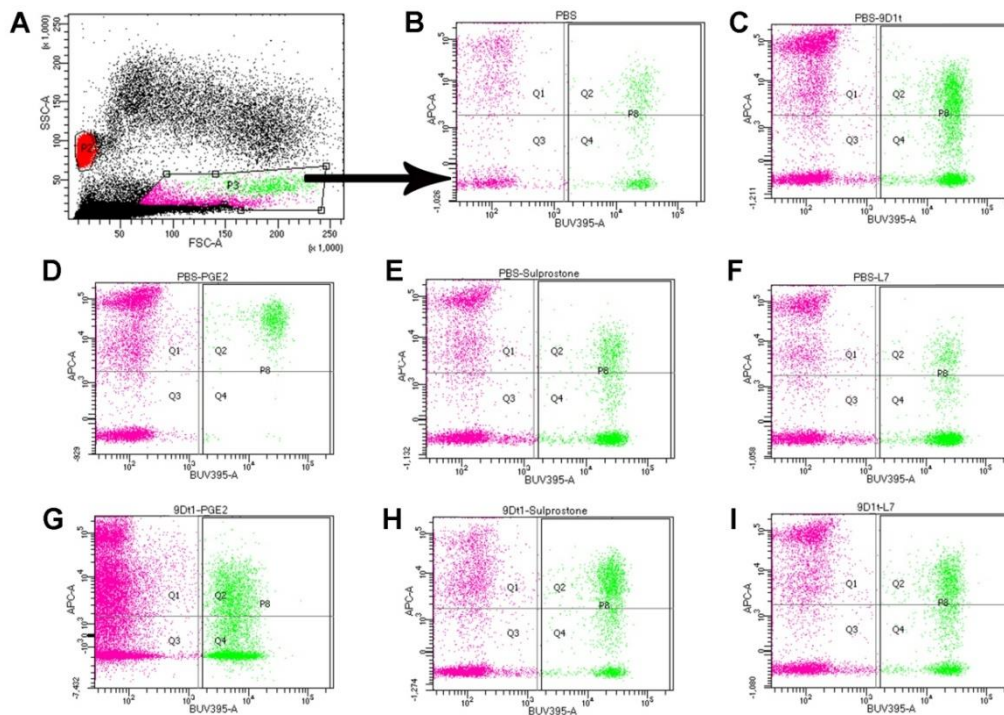


Figura 20. Efectos de los ligandos 9-D1t-FitoP y EP3 en el recuento de agregados de PMNs y plaquetas.

A) Estrategia de selección de monocitos y otras células PMN (basada en FSC y SSC). La selección P3 se analizó además basándose en las uniones CD14-BUV395 (selección P8) y CD42b-APC (selección Q2) en B) condiciones de control (PBS) y después de 30 min en presencia de: C) 100 nM 9-D_{1t}-FitoP. D) 20 nM PGE2. E) 200 nM de sulprostona. F) 300 nM L798,106. G) 20 nM de PGE2 y 100 nM de 9-D_{1t}-FitoP. H) 200 nM de sulprostona y 100 nM de 9-D_{1t}-FitoP. I) 300 nM de L798,106 y 100 nM de 9-

Asimismo, tal y como se muestra en la **Figura 21**, el tratamiento con los agonistas EP3 (PGE2 y Sulprostona) aumentó la adhesión plaquetaria, de forma similar al antagonista EP4 (ONO AE3-208) (todos $p < 0,05$). El tratamiento con 9-D_{1t}-FitoP solo, o en combinación con 20 nM de PGE2, no desencadenó la adhesión de las plaquetas a los leucocitos (123,98% y 135,34%, respectivamente, $p > 0,05$), aunque se encontró un efecto sinérgico cuando se trató la sangre fresca con Sulprostona además de 9-D_{1t}-FitoP (204,18%, $p < 0,01$). Curiosamente, el efecto del antagonista de EP3, L798,106 se vio ligeramente contrarrestado por la adición de 9-

D_{1t}-FitoP (93,19% frente a 121,30%), lo que denota una posible competencia por el mismo receptor EP ($p > 0,05$).

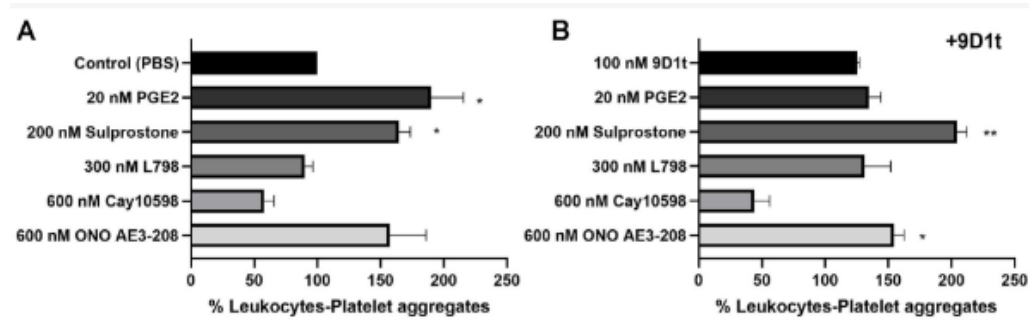


Figura 21. Efecto de 9-D_{1t}-FitoP sobre la formación de plaquetas-leucocitos en sangre fresca EDTA. (A) Recuentos relativos en presencia de ligandos EP3/EP4. (B) Recuentos relativos en presencia de ligandos EP3/EP4 más 100 nM 9D_{1t}. Los valores se normalizan con respecto al control (PBS). Los valores son la media \pm DE ($n = 3$ con diferentes donantes de sangre). Las estrellas indican diferencias significativas en comparación con las muestras sin activación (PBS, control) **/ $p < 0,05/0,01$, * valor p derivado de la prueba t pareada de 2 colas.

Para confirmar que el efecto de 9-D_{1t}-FitoP se producía a través de la activación del receptor EP3, también se trató la sangre fresca con los ligandos EP4 (ONO AE3-208 y Cay10598) junto con 100 nM de 9-D_{1t}-FitoP. La presencia de 9-D_{1t}-FitoP no influyó en el efecto inhibitor del agonista EP4 Cay10598. Por el contrario, la 9-D_{1t}-FitoP no tuvo ningún efecto sobre la adhesión plaquetaria a leucocitos inducida por el ONO AE3-208 (Figura 21B), sugiriendo así que el efecto modulador de la 9-D_{1t}-FitoP estaba mediado predominantemente por el receptor EP3.

5.2.5 9-D₁₁-FitoP no compromete la viabilidad de las células endoteliales

Antes de comprobar la capacidad de la 9-D₁₁-FitoP purificada para modular la expresión génica y la migración en células endoteliales, se evaluó el efecto citotóxico en la línea Ea.hy926, un modelo bien establecido de estudios basados en células endoteliales. Se observó que el tratamiento con 9-D₁₁-FitoP no afectaba a la viabilidad ni a la proliferación hasta 1 µg/mL durante las primeras 48 h. Sin embargo, a concentraciones superiores (1 µg/mL) durante 6 días, la viabilidad se redujo significativamente ($p < 0,05$) (**Figura 22**).

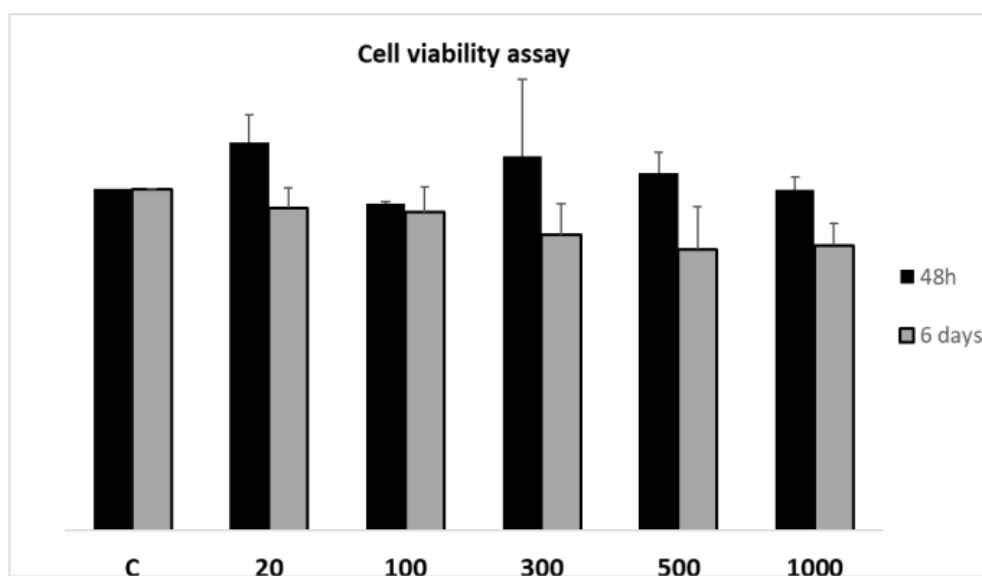


Figura 22. Ensayo de viabilidad celular realizado con el reactivo AlamarBLue. Se ensayaron concentraciones crecientes de 9-D₁₁-FitoP hasta 1 µg/mL durante 6 días.

5.2.6. Bioactividad de 9-D_{1t}-FitoP sobre el endotelio

5.2.6.1. 9-D_{1t}-FitoP contribuye a la migración *in vitro*

Se sabe que la PGE₂ estimula la migración y la angiogénesis en las células endoteliales. Como se muestra en la **Figura 23**, 300 nM de 9-D_{1t}-FitoP aumentaron significativamente la migración de forma similar a la PGE₂ ($p = 0,004$, respectivamente).

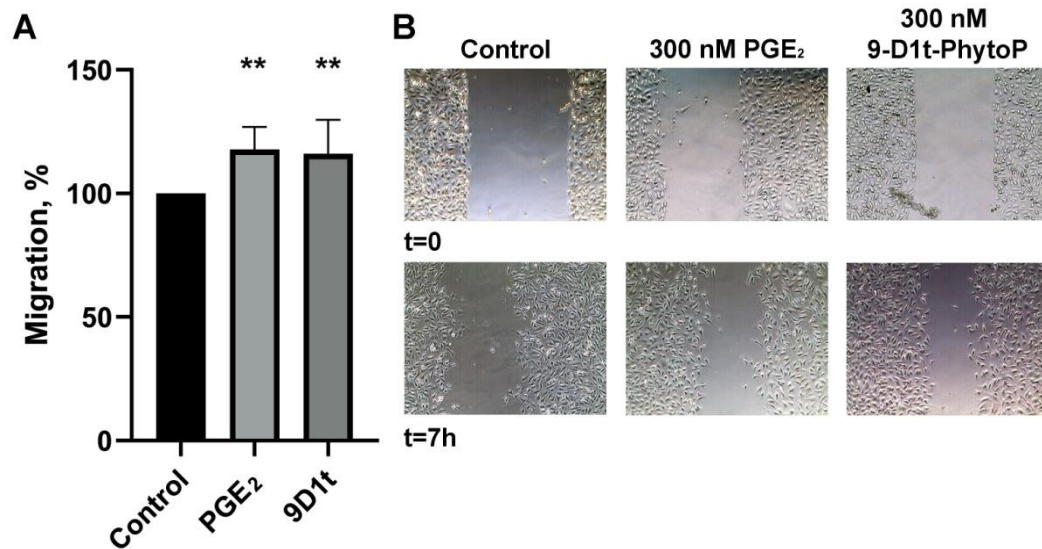


Figura 23. Valores de cuantificación de la migración (cierre de la herida) en células endoteliales humanas Ea.hy926 en presencia de 300 nM de PGE₂ y 9-D_{1t}-FitoP, respectivamente. A) Porcentaje de área migrada tras el ensayo de cicatrización de heridas (n=4). B) Imágenes representativas del ensayo de cicatrización de heridas en t=0 y t=7 h. Diferencias estadísticas en comparación con el control ** $p < 0,01$.

5.2.6.2. 9-D_{1t}-FitoP induce un estado de disfunción endotelial

Se midió la expresión génica de NOS3, COX-2 (PGST), ICAM-1 e IL-6 tras los tratamientos con 9-D_{1t}-FitoP y TNF- α (**Figura 24**). La 9-D_{1t}-FitoP sola no produjo cambios significativos en la expresión de NOS3, ICAM-1 ni PGST en las células endoteliales. Sin embargo, el tratamiento con TNF- α fue capaz de disminuir la expresión de NOS3 ($p = 0,012$) y aumentar la expresión de ICAM-1 ($p = 0,0001$), PGST ($p = 0,0002$) e IL-6 ($p = 0,0262$). El pretratamiento con 300 nM de 9-D_{1t}-FitoP y TNF- α mostró un efecto sinérgico sobre la expresión de NOS3 e ICAM-1 ($p = 0,0087$).

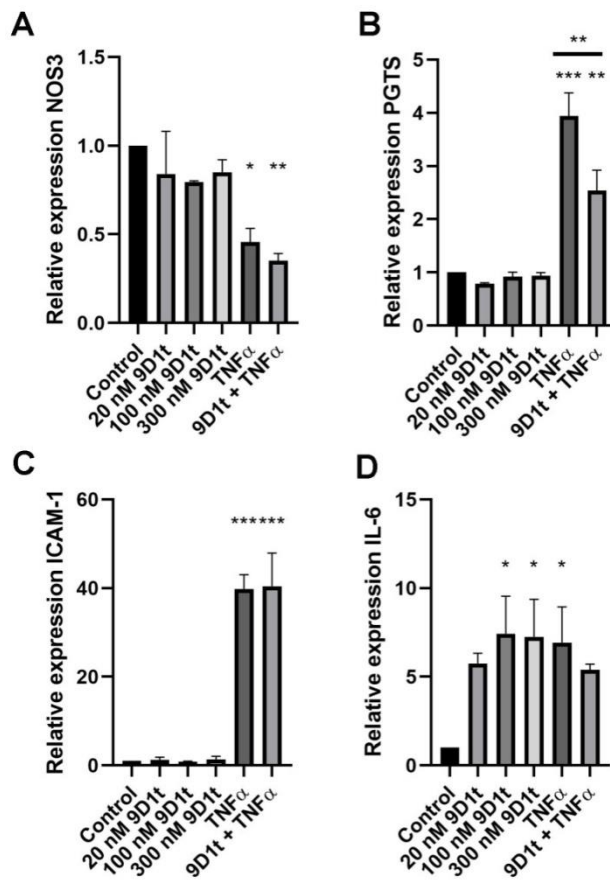


Figura 24. Expresión relativa de ARNm en células Ea.hy926. A) NOS-3; B) PGST (COX-2); C) ICAM-1; D) IL-6, tras el tratamiento con 300 nM de 9-D_{1t}-FitoP. Los datos mostrados representan los valores medios de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticas en comparación con las condiciones de control */**/** = $p < 0,05/0,01/0,001$, respectivamente.

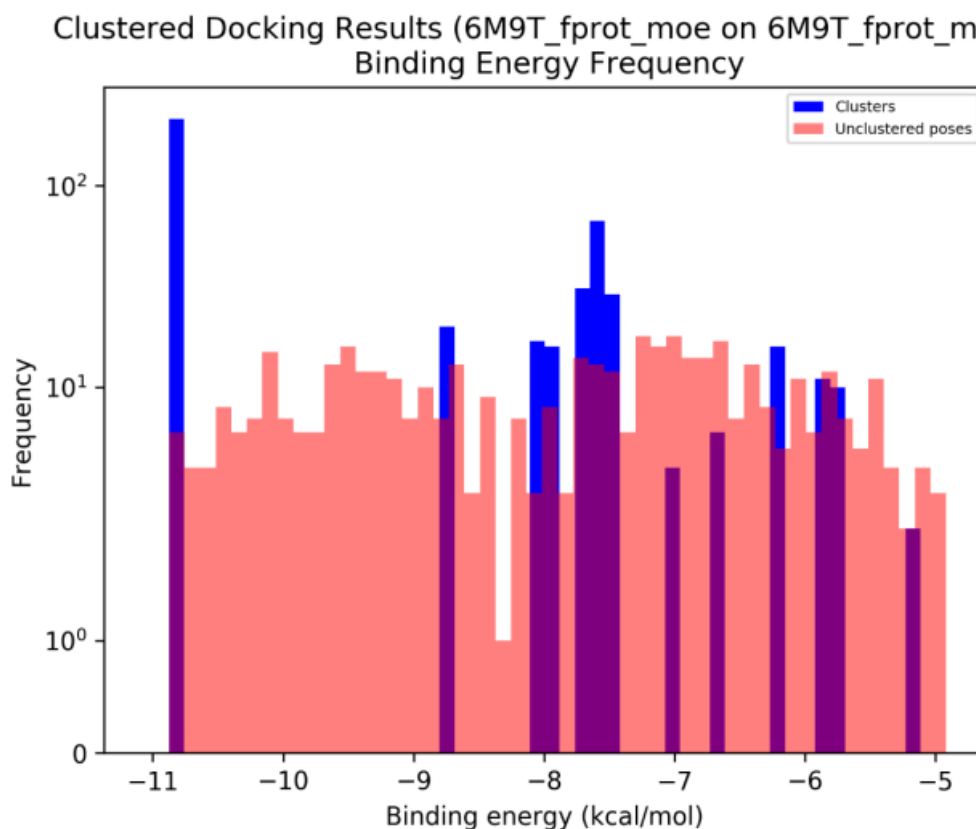


Figura 26. Energía de interacción entre 9D₁₁ y los diferentes clusters del receptor EP3.

5.2.7.2. 9-D₁₁-FitoP comparte interacciones hidrofóbicas con los agonistas EP3

Para obtener más información sobre el reconocimiento molecular del 9-D₁₁-FitoP al receptor EP3, se realizaron simulaciones MD de 100 ns. Se observó que la unión del FitoP a la cavidad hidrofóbica permanece estable con las interacciones de promedio superior que se muestran en la **Figura 27**. PGE₂, Misoprostol y 9-D₁₁-FitoP comparten interacciones hidrofóbicas con Arg333, Tyr114 y Thr206, mientras que el antagonista de EP3, L-798,106, no (**Figura 27** y **Figura 28**). Por el contrario, L-

798,106 no llega muy abajo en el bolsillo de unión, lo que podría dar lugar a una conformación no activadora, es decir antagonista.

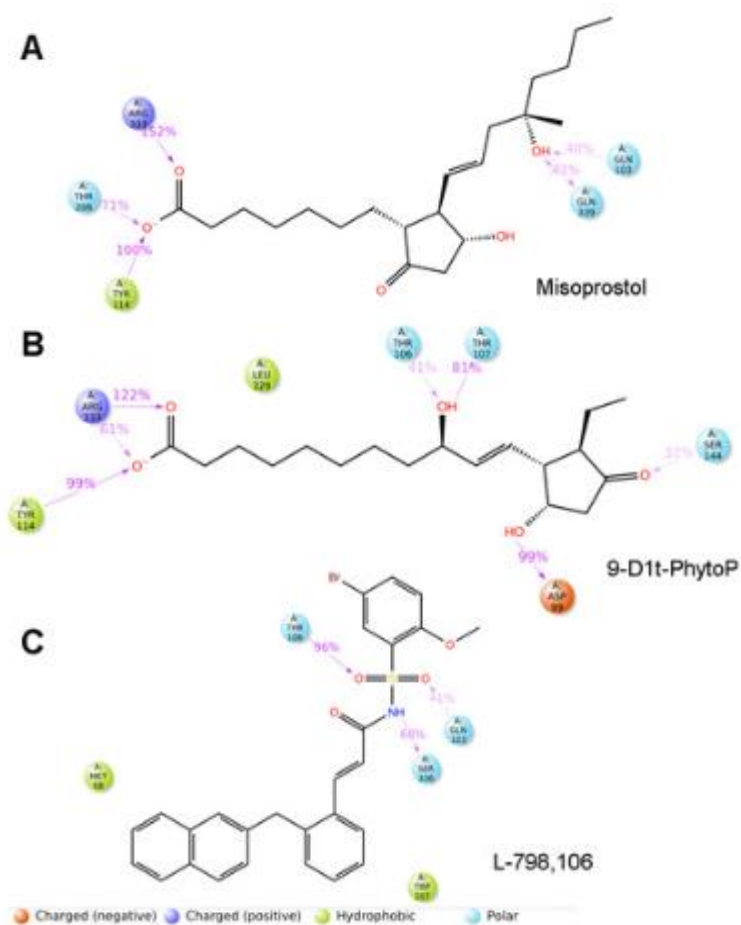


Figura 27. Interacciones bidimensionales proteína-ligando de los diagramas de dinámica molecular generados entre el receptor EP3 (PDB: 6M9T) y (A) Misoprostol (agonista EP3), (B) 9-D1t-PhytoP, y (C) L-798,106 (antagonista EP3) utilizando el script SimulationInteractionsDiagram en Maestro (Schrödinger Inc., www.schrodinger.com).

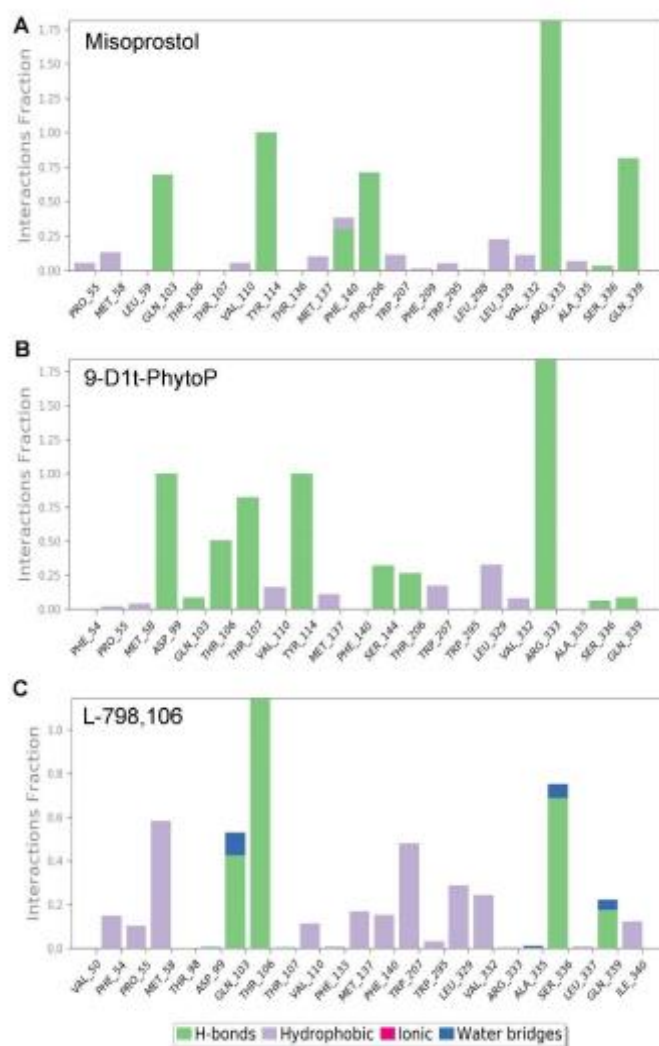


Figura 28. Simulación MD, interacciones receptor-ligando en el interior del bolsillo de unión de 100 nanosegundos. Comparación de la energía de unión por residuo de (A) misoprostol; (B) 9-D11-FitoP y (C) L798,106

Los resultados de estos estudios sugieren que el 9-D₁₁-FitoP actúa como modulador de la función plaquetaria, principalmente a través de su potencial interacción con el receptor EP3, permitiendo futuras estrategias farmacológicas útiles en el tratamiento y la prevención cardiovascular.

La gran homología estructural de los FitoP con los prostanoides humanos como la PGE₂ ha suscitado un enorme interés en los últimos años, sobre todo al esclarecer las posibles actividades biológicas que podrían ejercer en las células vasculares y las plaquetas humanas. La PGE₂ puede unirse al menos a cuatro subtipos de receptores estructuralmente diferentes (EP1-4), lo que da lugar a respuestas biológicas finales diversas y a menudo opuestas (Philipose *et al.*, 2010). Además, en los primeros estudios se observó repetidamente un efecto "dual" de la PGE₂ sobre la respuesta plaquetaria (es decir, activador a concentraciones nanomolares e inhibidor a concentraciones micromolares) (Matthews *et al.*, 1993; Petrucci *et al.*, 2011). Se han realizado muchas investigaciones sobre el uso de prostanoides como la PGE₂ y sus análogos sintéticos (sulprostona, misoprostol) sobre su subtipo de receptor EP3 selectivo (Heptinstall *et al.*, 2008; Kuriyama *et al.*, 2010). No obstante, como se ha informado anteriormente, tales agonistas imitan los efectos de concentraciones bajas de PGE₂ sobre las plaquetas inducidos por ADP, pero no potencian la agregación plaquetaria sin estimulación agonista (Schober *et al.*, 2010; Schober *et al.*, 2011). Además, se sintetizan múltiples prostanoides de mamífero (es decir, mayor producción de tromboxano) en respuesta a distintos agonistas, lo que hace difícil atribuir la respuesta celular final a un compuesto concreto (FitoP, AA, trombina, etc.). Dado que la activación plaquetaria mediada por ADP es independiente de los metabolitos del ácido araquidónico dependientes de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa, y con el fin de evitar confusiones, seleccionamos ADP como agonista (Rinder *et al.*, 1993).

Dado que la oxilipina más abundante encontrada en el extracto de *Gracilaria longissima* era el 9-D₁₁-FitoP, el estudio pretendía evaluar su bioactividad particular sobre los elementos vasculares, así como descifrar los receptores potenciales en humanos. Para ello, nuestro trabajo anterior estudió el efecto del extracto de *Gracilaria longissima* rico en 9-D₁₁-FitoP en células endoteliales y descubrió que no proporcionaba una mitigación significativa de los cambios proinflamatorios inducidos por el TNF- α , pero aún no se había probado en plaquetas humanas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). Por el contrario, en el anterior capítulo de esta Tesis,

observamos que el *ent-9-D_{1t}-FitoP* redujo los marcadores proinflamatorios en monocitos a los valores encontrados en el control no tratado (Campillo *et al.*, 2021). Sólo se han caracterizado unas pocas oxilipinas en plaquetas, y las que se han detectado continúan siendo controvertidas (Lagarde *et al.*, 2010). En este caso, nos centramos ahora en el potencial que la *9-D_{1t}-FitoP-EP3* podría mostrar en la formación de trombos, mediante la regulación de la activación y agregación plaquetaria. En los experimentos actuales, abordamos la posibilidad de que el efecto del *9-D_{1t}-FitoP* estuviera mediado por receptores PG, principalmente a través del receptor EP3. Además, medimos el efecto del *9-D_{1t}-FitoP* en plaquetas pretratadas con un antagonista EP3 (L798,106) y un agonista EP4 (Cay10598) sobre la expresión de P-selectina (secretada por los α -gránulos) y CD36 con y sin estimulación ADP. Los resultados de estos estudios señalan que la *9-D_{1t}-FitoP* tiene un efecto estimulante sobre la función plaquetaria a través del receptor EP3, en condiciones de no agregación. Es importante señalar que no se ha comprobado la acción antiagregante opuesta de la PGE₂ para la *9-D_{1t}-FitoP* a través del receptor IP. Además, la elevada potencia de *9-D_{1t}-FitoP* como potenciador implica que es improbable que esté implicado un receptor EP2 (Paul *et al.*, 1998). Los receptores EP2 están asociados a las acciones relajantes de la PGE₂ sobre la musculatura lisa vascular y respiratoria, y la sulprostona es prácticamente inactiva en estos sistemas (Jadhav *et al.*, 2004). Además, es probable que sea el subtipo EP3 y no la epinefrina el que medie el efecto potenciador, ya que la *9-D_{1t}-FitoP* es más potente que la PGE₂ y la Sulprostona en las condiciones actuales.

Los amplios enfoques de FCM han ampliado considerablemente nuestros conocimientos sobre las interacciones plaqueta-leucocito y sus implicaciones en la salud y la enfermedad (Montoro-García *et al.*, 2014; Shantsila *et al.*, 2014). Ahora probamos el efecto de la *9-D_{1t}-FitoP* sobre la capacidad de las plaquetas para formar agregados plaqueta-leucocito. La unión de las plaquetas a otras células vasculares en presencia de *9-D_{1t}-FitoP* proporcionó una amplificación del estado trombótico, que podría convertirse en una diana terapéutica en diversas enfermedades. Además, el reclutamiento de leucocitos desempeña un papel importante en la fase inicial de la inflamación y la disfunción endotelial. Está bien establecido que la PGE₂ induce la migración del endotelio (Rao *et al.*, 2007), pero nosotros también confirmamos que la dosis elevada de *9-D_{1t}-FitoP* también contribuye a la migración *in vitro*. Finalmente, la activación del endotelio promovió la sobreexpresión de IL-

6 (**Figura 24D**), confirmando los datos de que altas dosis del ligando EP son capaces de inducir un estado disfuncional. Además, hay que tener en cuenta que en la literatura se han utilizado líneas celulares endoteliales arteriales y venosas con diferencias controvertidas en la liberación de sustancias vasoactivas como PG o TxA2 (Geenen *et al.*, 2015; Lau *et al.*, 2021). Evaluamos los efectos de 9-D₁₁-FitoP en células endoteliales arteriales (línea celular Ea.hy926) para dar continuidad a nuestros estudios anteriores (Martínez-Sánchez *et al.*, 2019, 2020).

Para comprender el modo de unión preciso de la 9-D₁₁-FitoP y su posible receptor EP3, se realizó una combinación de docking y MD. El receptor EP3 presenta una señalización dual que requiere amplios estudios estructurales (Hollenstein, 2019; Morimoto *et al.*, 2019). Los residuos que realizaron contribuciones de alta energía a las poses finales de EP3-misoprostol, EP3-9-D₁₁-FitoP y EP3-PGE2 fueron R333, T206 e Y114, proporcionando un modelo de unión dispar al EP3-L-798,106. De hecho, estudios cristalográficos recientes han informado de detalles moleculares de tales interacciones; los agonistas ensayados tienden a adoptar una conformación en forma de L en el sitio de unión a EP3, que es importante para la activación del receptor, y 9-D₁₁-FitoP se solapa perfectamente con ella (Hollenstein, 2019; Morimoto *et al.*, 2019).

Estos resultados sugieren que los FitoP pueden tener efectos protrombóticos y proinvasivos, además de sus conocidas capacidades inmunomoduladoras (Campillo *et al.*, 2021), de forma similar a la PGE₂ de mamíferos. La originalidad del presente trabajo radica en la combinación de la activación plaquetaria *ex vivo* junto con los enfoques endoteliales clásicos *in vitro*. Aunque los resultados actuales son muy prometedores, se necesitan más estudios para establecer la afinidad de los receptores EP de esta y otros FitoP y quizás un papel dual con receptores prostanoides distintos. También es importante realizar estudios *in vivo* de los extractos con el fin de confirmar un efecto clínico.

VI – CONCLUSIONES

VI- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de la presente Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes conclusiones generales:

1. Las oxilipinas vegetales presentan un gran potencial antiinflamatorio y están presentes en una amplia variedad de alimentos, lo cual permite que se puedan seleccionar los compuestos más beneficiosos de acuerdo a su perfil cuantitativo de FitoP y FitoF.

2. Los metabolitos secundarios de FitoP y FitoF (*ent-16-epi-16-F_{1t}-FitoP*, *9-D_{1t}-FitoP*, *16-B₁-FitoP*, *ent-16 (RS) -9-epi-ST-Δ14-10-FitoF*, y *ent-16 (RS) -13-epi-ST-Δ14-9-FitoF*) mostraron un valioso potencial antiinflamatorio al modular el nivel intracelular de PGs clave (*15-keto-PGF_{2α}*, *PGF_{2α}*, *PGE₂*, *PGF_{1α}*, *PGD₂* y *PGDM*) en células THP-1, mediadores del proceso inflamatorio, así como su liberación en el medio de crecimiento.

3. La oxilipina más abundante en el extracto *Gracillaria longissima* es el compuesto *9-D_{1t}-FitoP* (FP-2), el cual estimula la activación y la agregación plaquetaria presentando un efecto sinérgico cuando se le añade ADP o AA.

4. El fitoprostano *9-D_{1t}* estimula la expresión de marcadores de activación plaquetaria en sangre fresca cuando es inducida por ADP, más aún cuando existe un tratamiento previo con los agonistas EP3, *PGE₂* y sulprostona.

5. El efecto de la oxilipina *9-D_{1t}-FitoP* está mediado por la activación del receptor EP3 y se produce a través de la unión de esta al bolsillo hidrofóbico del receptor, de forma similar a como lo hace el misoprostol (prostanoide sintético, agonista de la EP3).

VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afshin A., Hay I., Khalil I.A., Mokdad A.H., Naghavi M., Vollset E., Vos T., Murray C. J. L., Sur P.J, Fay K.A., Cornaby L., Ferrara G., Salama J.S., Mullany E.C., Biryukov S.H., Cercy K.M., Dandona L., Dandona R, Feigin L,...Yu, C. (2019). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 393, 1958-1972. <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2819%2930041-8>
- Ahmed, O. S., Galano, J.-M., Pavlickova, T., Revol-Cavalier, J., Vigor, C., Lee, J. C.-Y., Oger, C., & Durand, T. (2020). Moving forward with isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: where are we now? *Essays in Biochemistry*, 64(3), 463-484. <https://doi.org/10.1042/EBC20190096>
- Albuquerque-González, B., Bernabé-García, M., Montoro-García, S., Bernabé-García, Á., Rodrigues, P. C., Ruiz Sanz, J., López-Calderón, F. F., Luque, I., Nicolas, F. J., Cayuela, M. L., Salo, T., Pérez-Sánchez, H., & Conesa-Zamora, P. (2020). New role of the antidepressant imipramine as a Fascin1 inhibitor in colorectal cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 281-292. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0389-x>
- Albuquerque-González, B., Bernabé-García, Á., Bernabé-García, M., Ruiz-Sanz, J., López-Calderón, F. F., Gonnelli, L., Banci, L., Peña-García, J., Luque, I., Nicolás, F. J., Cayuela-Fuentes, M. L., Luchinat, E., Pérez-Sánchez, H., Montoro-García, S., & Conesa-Zamora, P. (2021). The FDA-approved antiviral raltegravir inhibits Fascin1-dependent invasion of colorectal tumor cells in vitro and in vivo. *Cancers*, 13(4), 861. <https://doi.org/10.3390/cancers13040861>
- Aleksandrova, K., Koelman, L., & Rodrigues, C. E. (2021). Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies. *Redox Biology*, 42(101869), 101869. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101869>

- Alemán-Jiménez, C., Domínguez-Perles, R., Fanti, F., Gallego-Gómez, J. I., Simonelli-Muñoz, A., Moine, E., Durand, T., Crauste, C., Gil-Izquierdo, Á., & Medina, S. (2021). Unravelling the capacity of hydroxytyrosol and its lipophenolic derivatives to modulate the H₂O₂-induced isoprostanoid profile of THP-1 monocytes by UHPLC-QqQ-MS/MS lipidomic workflow. *Microchemical Journal, Devoted to the Application of Microtechniques in All Branches of Science*, 170(106703), 106703. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106703>
- Ali, M. S., & Baek, K.-H. (2020). Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 621. <https://doi.org/10.3390/ijms21020621>
- Al-Juhaimi, F., Ghafoor, K., Özcan, M. M., Jahurul, M. H. A., Babiker, E. E., Jinap, S., Sahena, F., Sharifudin, M. S., & Zaidul, I. S. M. (2018). Effect of various food processing and handling methods on preservation of natural antioxidants in fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 3872-3880. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3370-0>
- Amgen. (2017). *La enfermedad cardiovascular en España*. Amgen.es. <https://www.amgen.es/enfermedades-tratadas/hipercolesterolemia/enfermedad-cardiovascular-esp>
- Andreasen, A., Krabbe, K., Krogh-Madsen, R., Taudorf, S., Pedersen, B., & Møller, K. (2008). Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Current medicinal chemistry*, 15(17), 1697-1705. <https://doi.org/10.2174/092986708784872393>
- Arcusa, R., Carrillo, J. Á., Cerdá, B., Durand, T., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., Galano, J.-M., Villaño Valencia, D., Marhuenda, J., & Zafrilla, P. (2022). Anti-inflammatory and antioxidant capacity of a fruit and vegetable-based nutraceutical measured by urinary oxylipin concentration in a healthy population: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(7), 1342. <https://doi.org/10.3390/antiox11071342>
- Ashok, A., Andrabi, S. S., Mansoor, S., Kuang, Y., Kwon, B. K., & Labhsetwar, V. (2022). Antioxidant therapy in oxidative stress-induced neurodegenerative diseases: Role of nanoparticle-based drug delivery systems in clinical

- translation. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(2), 408. <https://doi.org/10.3390/antiox11020408>
- Asseng, S., Martre, P., Maiorano, A., Rötter, R. P., O'Leary, G. J., Fitzgerald, G. J., Grousse, C., Motzo, R., Giunta, F., Babar, M. A., Reynolds, M. P., Kheir, A. M. S., Thorburn, P. J., Waha, K., Ruane, A. C., Aggarwal, P. K., Ahmed, M., Balkovič, J., Basso, B., ... Ewert, F. (2019). Climate change impact and adaptation for wheat protein. *Global Change Biology*, 25(1), 155-173. <https://doi.org/10.1111/gcb.14481>
- Aviello, G., & Knaus, U. G. (2017). ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage?: ROS and GI inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1704-1718. <https://doi.org/10.1111/bph.13428>
- Ávila, F. A. (2014). *Estudios de actividad anticancer y anti-inflamatoria de compuestos bioactivos aislados de medios acuosos terrestres y marinos*. [Tesis] Universidad de Sevilla.
- Barbosa, M., Collado-González, J., Andrade, P. B., Ferreres, F., Valentão, P., Galano, J.-M., Durand, T., & Gil-Izquierdo, Á. (2015). Nonenzymatic α -linolenic acid derivatives from the sea: Macroalgae as novel sources of phytoprostanes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(28), 6466-6474. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01904>
- Barden, A. E., Croft, K. D., Durand, T., Guy, A., Mueller, M. J., & Mori, T. A. (2009). Flaxseed oil supplementation increases plasma F1-phytoprostanes in healthy men. *The Journal of Nutrition*, 139(10), 1890-1895. <https://doi.org/10.3945/jn.109.108316>
- Barnig, C., Bezema, T., Calder, P. C., Charloux, A., Frossard, N., Garssen, J., Haworth, O., Dilevskaya, K., Levi-Schaffer, F., Lonsdorfer, E., Wauben, M., Kraneveld, A. D., & Te Velde, A. A. (2019). Activation of resolution pathways to prevent and fight chronic inflammation: Lessons from asthma and inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 1699. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01699>
- Barreiro, B. (2018). Buceando en las tendencias alimentarias de los españoles. En P. y. A. Ministerio de Agricultura (Ed.), *Gob.es*. https://www.mapa.gob.es/es/prensa/presentacionmapamafinal1_tcm30-507246.pdf

- Bartels, E. C. M., den Braver, N. R., Borgonjen-van den Berg, K. J., Rutters, F., van der Heijden, A., & Beulens, J. W. J. (2022). Adherence to the Dutch healthy diet index and change in glycemic control and cardiometabolic markers in people with type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, 61(5), 2761-2773. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02847-6>
- Basulto, J., Manera, M., Baladia, E., Miserachs, M., Pérez, R., Ferrando, C., Amigó, P., Rodríguez, V. M., Babio, N., Mielgo-Ayuso, J., Roca, A., Mauro, I. S., Martínez, R., Sotos, M., Blanquer, M., & Revenga, J. (2013). *Definición y características de una alimentación saludable*. Fundación Española de Dietistas Nutricionistas. http://fedn.es/docs/grep/docs/alimentacion_saludable.pdf
- Benndorf, R. A., Schwedhelm, E., Gnann, A., Taheri, R., Kom, G., Didié, M., Steenpass, A., Ergün, S., & Böger, R. H. (2008). Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis: A potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circulation Research*, 103(9), 1037-1046. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184036>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Berry, S. E. E., Tydeman, E. A., Lewis, H. B., Phalora, R., Rosborough, J., Picout, D. R., & Ellis, P. R. (2008). Manipulation of lipid bioaccessibility of almond seeds influences postprandial lipemia in healthy human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(4), 922-929. <https://doi.org/10.1093/ajcn/88.4.922>
- Biswas, S. K. (2016). Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5698931. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>
- Blackwell, K. A., Raisz, L. G., & Pilbeam, C. C. (2010). Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 21(5), 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.004>

- Blair, P. J., Hwang, S. J., Shonnard, M. C., Peri, L. E., Bayguinov, Y., Sanders, K. M., & Ward, S. M. (2019). The role of prostaglandins in disrupted gastric motor activity associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 68(3), 637-647. <https://doi.org/10.2337/db18-1064>
- Boland, M. L., Chourasia, A. H., & Macleod, K. F. (2013). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 292. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00292>
- Borrego, E. J., & Kolomiets, M. V. (2016). Synthesis and functions of jasmonates in maize. *Plants*, 5(4), 41. <https://doi.org/10.3390/plants5040041>
- Bos, J. L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(9), 733-738. <https://doi.org/10.1038/nrm1197>
- Brown, D. I., & Griendling, K. K. (2015). Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 116(3), 531-549. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303584>
- Bruno, J. J., Taylor, L. A., & Droller, M. J. (1974). Effects of prostaglandin E2 on human platelet adenyl cyclase and aggregation. *Nature*, 251(5477), 721-723. <https://doi.org/10.1038/251721a0>
- Burgess, J. R., Yang, H., Chang, M., Rao, M. K., Tu, C. P.-D., & Reddy, C. C. (1987). Enzymatic transformation of PGH₂ to PGF₂α catalyzed by glutathione S-transferases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 142(2), 441-447. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(87\)90294-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(87)90294-4)
- Burke, J. E., & Dennis, E. A. (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *The Journal of Lipid Research*, 50 Suppl(Supplement), S237-42. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>
- Cadenas, S. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radical Biology & Medicine*, 117, 76-89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024>
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review: Bioavailability of bioactive compounds.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>

- Carrasco-Del Amor, A. M., Collado-González, J., Aguayo, E., Guy, A., Galano, J. M., Durand, T., & Gil-Izquierdo, A. (2015). Phytoprostanes in almonds: identification, quantification, and impact of cultivar and type of cultivation. *RSC Advances*, 5(63), 51233-51241. <https://doi.org/10.1039/c5ra07803b>
- Carrasco-Del Amor, A. M., Aguayo, E., Collado-González, J., Guy, A., Galano, J.-M., Durand, T., & Gil-Izquierdo, Á. (2016). Impact of packaging atmosphere, storage and processing conditions on the generation of phytoprostanes as quality processing compounds in almond kernels. *Food Chemistry*, 211, 869-875. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.132>
- Cena, H., & Calder, P. C. (2020). Defining a healthy diet: Evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. *Nutrients*, 12(2), 334. <https://doi.org/10.3390/nu12020334>
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014, 608979. <https://doi.org/10.1155/2014/608979>
- Charo, I. F., Shak, S., Karasek, M. A., Davison, P. M., & Goldstein, I. M. (1984). Prostaglandin I₂ is not a major metabolite of arachidonic acid in cultured endothelial cells from human foreskin microvessels. *The Journal of Clinical Investigation*, 74(3), 914-919. <https://doi.org/10.1172/JCI111509>
- Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2013). Design of foods with bioactive lipids for improved health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 35-56. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032112-135808>
- Claar, D., Hartert, T. V., & Peebles, R. S., Jr. (2015). The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 9(1), 55-72. <https://doi.org/10.1586/17476348.2015.992783>
- Coleman, R. A., Grix, S. P., Head, S. A., Louttit, J. B., Mallett, A., & Sheldrick, R. L. (1994). A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins*, 47(2), 151-168. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(94\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0090-6980(94)90084-1)
- Collado-González, J. (2019). *Effect of regulated deficit irrigation and Spanish-style processing on the generation of phytoprostanes in extra virgin olive oil and green table olives* [Universidad Miguel Hernández.]. <http://dspace.umh.es/handle/11000/5319>

- Collado-González, J., Durand, T., Ferreres, F., Medina, S., Torrecillas, A., & Gil-Izquierdo, Á. (2015a). Phytoprostanes. *Lipid Technology*, 27(6), 127-130. <https://doi.org/10.1002/lite.201500020>
- Collado-González, J., Moriana, A., Girón, I. F., Corell, M., Medina, S., Durand, T., Guy, A., Galano, J.-M., Valero, E., Garrigues, T., Ferreres, F., Moreno, F., Torrecillas, A., & Gil-Izquierdo, A. (2015c). The phytoprostane content in green table olives is influenced by Spanish-style processing and regulated deficit irrigation. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 64(2), 997-1003. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.005>
- Collado-González, J., Pérez-López, D., Memmi, H., Gijón, M. C., Medina, S., Durand, T., Guy, A., Galano, J.-M., Fernández, D. J., Carro, F., Ferreres, F., Torrecillas, A., & Gil-Izquierdo, A. (2016). Effect of the season on the free phytoprostane content in Cornicabra extra virgin olive oil from deficit-irrigated olive trees: Deficit irrigation enhances phytoprostane content in EVOO. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1585-1592. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7259>
- Collado-González, J., Pérez-López, D., Memmi, H., Gijón, M. C., Medina, S., Durand, T., Guy, A., Galano, J.-M., Ferreres, F., Torrecillas, A., & Gil-Izquierdo, A. (2015b). Water deficit during pit hardening enhances phytoprostanes content, a plant biomarker of oxidative stress, in extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3784-3792. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00805>
- Colson, C., Ghandour, R. A., Dufies, O., Rekima, S., Loubat, A., Munro, P., Boyer, L., & Pisani, D. F. (2019). Diet supplementation in ω 3 polyunsaturated fatty acid favors an anti-inflammatory basal environment in mouse adipose tissue. *Nutrients*, 11(2), 438. <https://doi.org/10.3390/nu11020438>
- Cuyamendous, C., Leung, K. S., Durand, T., Lee, J. C.-Y., Oger, C., & Galano, J.-M. (2015). Synthesis and discovery of phytofurans: metabolites of α -linolenic acid peroxidation. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 51(86), 15696-15699. <https://doi.org/10.1039/c5cc05736a>
- Cuyamendous, Claire, Leung, K. S., Bultel-Poncé, V., Guy, A., Durand, T., Galano, J.-M., Lee, J. C.-Y., & Oger, C. (2017). Total synthesis and in vivo quantitation of phytofurans derived from α -linolenic acid: Total synthesis and in vivo

- quantitation of phytofurans derived from α -linolenic acid. *European Journal of Organic Chemistry*, 2017(17), 2486-2490. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700270>
- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V. V., Muzykantov, V. R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., & Münzel, T. (2017). Targeting vascular (endothelial) dysfunction: Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1591-1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
- de Assis, I. V., Bastos, L. F. S., Limborço-Filho, M., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. C. P. (2012). Role of prostaglandins in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *Mediators of Inflammation*, 2012, 946813. <https://doi.org/10.1155/2012/946813>
- Dix, T. A., & Aikens, J. (1993). Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical Research in Toxicology*, 6(1), 2-18. <https://doi.org/10.1021/tx00031a001>
- Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients*, 13(7), 2421. <https://doi.org/10.3390/nu13072421>
- Dominguez, L. J., Di Bella, G., Veronese, N., & Barbagallo, M. (2021). Impact of Mediterranean diet on chronic non-communicable diseases and longevity. *Nutrients*, 13(6), 2028. <https://doi.org/10.3390/nu13062028>
- Domínguez-Perles, R., Abellán, Á., León, D., Ferreres, F., Guy, A., Oger, C., Galano, J. M., Durand, T., & Gil-Izquierdo, Á. (2018). Sorting out the phytoprostane and phytofuran profile in vegetable oils. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 107, 619-628. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.013>
- Doustmohammadian, A., & Bazhan, M. (2021). Social marketing-based interventions to promote healthy nutrition behaviors: a systematic review protocol. *Systematic Reviews*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01625-5>
- Du, Y., Kemper, T., Qiu, J., & Jiang, J. (2016). Defining the therapeutic time window for suppressing the inflammatory prostaglandin E2 signaling after status epilepticus. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 16(2), 123-130. <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1134322>

- Duffy, D. M. (2015). Novel contraceptive targets to inhibit ovulation: the prostaglandin E2 pathway. *Human Reproduction Update*, 21(5), 652-670. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv026>
- Dupuy, A., Le Faouder, P., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.-M., Dray, C., Lee, J. C.-Y., Valet, P., Gladine, C., Durand, T., & Bertrand-Michel, J. (2016). Simultaneous quantitative profiling of 20 isoprostanooids from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids by LC-MS/MS in various biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 921, 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.024>
- Durand, T., Bultel-Poncé, V., Guy, A., El Fangour, S., Rossi, J.-C., & Galano, J.-M. (2011). Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids. *Biochimie*, 93(1), 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.014>
- Dyba, T., Randi, G., Bray, F., Martos, C., Giusti, F., Nicholson, N., Gavin, A., Flego, M., Neamtiu, L., Dimitrova, N., Negrão Carvalho, R., Ferlay, J., & Bettio, M. (2021). The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 157, 308-347. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.07.039>
- D’Oria, R., Schipani, R., Leonardini, A., Natalicchio, A., Perrini, S., Cignarelli, A., Laviola, L., & Giorgino, F. (2020). The role of oxidative stress in cardiac disease: From physiological response to injury factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 5732956. <https://doi.org/10.1155/2020/5732956>
- Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y. M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U. G., Lopez, M. G., Olaso-Gonzalez, G., Petry, A., Schulz, R., Vina, J., Winyard, P., Abbas, K., Ademowo, O. S., Afonso, C. B., Andreadou, I., Antelmann, H., ... Daiber, A. (2017). European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biology*, 13, 94-162. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.007>
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.-C., Pieters, R., & Kleiner, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(2-3), 193-236. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(01\)00118-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(01)00118-1)

- El Assar, M., Angulo, J., & Rodríguez-Mañas, L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 380-401. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003>
- EpData. (2021). *Evolución de los casos de cáncer detectados al año en España* [Data set]. EpData - La actualidad informativa en datos estadísticos de Europa Press.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.014>
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., & Martínez-González, M. A. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England journal of medicine*, 368(14), 1279-1290. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200303>
- Esaki, Y., Li, Y., Sakata, D., Yao, C., Segi-Nishida, E., Matsuoka, T., Fukuda, K., & Narumiya, S. (2010). Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12233-12238. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915112107>
- Fernández, I. (2020). *Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/65983/>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 29(11), 751-760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 275-297. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>
- Fiore, M., Rana, R. L., Spada, A., & Drejerska, N. (2021). Socioeconomic assessment of diet on health and quality of life. *British Food Journal (Croydon, England)*, 123(8), 2617-2621. <https://doi.org/10.1108/bfj-08-2021-998>

- Fischer, R., & Maier, O. (2015). Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 610813. <https://doi.org/10.1155/2015/610813>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). The state of food and agriculture. En *Climate change, agriculture and food security*. <https://www.fao.org/3/i6030e/i6030e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2022*. FAO; IFAD; WHO; WFP; UNICEF.
- Friedman, E. A., Ogletree, M. L., Haddad, E. V., & Boutaud, O. (2015). Understanding the role of prostaglandin E2 in regulating human platelet activity in health and disease. *Thrombosis Research*, 136(3), 493-503. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.05.027>
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A. R., Taylor, E. L., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A. C., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H. E., Grune, T., Schmidt, H. H. H. W., & Ghezzi, P. (2015). Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144-1170. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
- Galano, J.-M., Lee, Y. Y., Oger, C., Vigor, C., Vercauteren, J., Durand, T., Giera, M., & Lee, J. C.-Y. (2017). Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25 years of research in chemistry and biology. *Progress in Lipid Research*, 68, 83-108. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.09.004>
- García-Flores, L. A., Medina, S., Gómez, C., Wheelock, C. E., Cejuela, R., Martínez-Sanz, J. M., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., Hernández-Sáez, Á., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, Á. (2018). Aronia-citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: a lipidomic approach using representative oxylipins in urine. *Food & Function*, 9(1), 463-475. <https://doi.org/10.1039/c7fo01409k>
- García-García, M. C., del Río Celestino, M., Gil-Izquierdo, Á., Egea-Gilabert, C., Galano, J. M., Durand, T., Oger, C., Fernández, J. A., Ferreres, F., & Domínguez-Perles, R. (2019). The value of legume foods as a dietary source of phytoprostanes and phytofurans is dependent on species, variety, and

- growing conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology: EJLST*, 121(8), 1800484. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800484>
- Gasteiger, J., & Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22), 3219-3228. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2)
- Gilles, Stefanie, Mariani, V., Bryce, M., Mueller, M. J., Ring, J., Jakob, T., Pastore, S., Behrendt, H., & Traidl-Hoffmann, C. (2009). Pollen-derived E1-phytosteranes signal via PPAR-gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6653-6658. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802613>
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration. (2019). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 5 (12). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2996>
- Global Nutrition Report. (2021). *A world free from malnutrition: An assessment of progress towards the global nutrition targets*. [Globalnutritionreport.org. https://globalnutritionreport.org/reports/2021-global-nutrition-report/assessing-progress-towards-the-global-nutrition-targets/](https://globalnutritionreport.org/reports/2021-global-nutrition-report/assessing-progress-towards-the-global-nutrition-targets/)
- González Roldán, N., Engel, R., Düpow, S., Jakob, K., Koops, F., Orinska, Z., Vigor, C., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., Jappe, U., & Duda, K. A. (2019). Lipid mediators from Timothy grass pollen contribute to the effector phase of allergy and prime dendritic cells for glycolipid presentation. *Frontiers in Immunology*, 10, 974. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00974>
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and cancer: Triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity*, 51(1), 27-41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Gross, S., Tilly, P., Hentsch, D., Vonesch, J.-L., & Fabre, J.-E. (2007). Vascular wall-produced prostaglandin E2 exacerbates arterial thrombosis and atherothrombosis through platelet EP3 receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 311-320. <https://doi.org/10.1084/jem.20061617>
- Guaiquil, V. H., Vera, J. C., & Golde, D. W. (2001). Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted

- HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40955-40961. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106878200>
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591-600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- 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. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(2), 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.03.017>
- Gutierrez-Pajares, J. L., Ben Hassen, C., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., & Frank, P. G. (2019). Oxidized products of α -linolenic acid negatively regulate cellular survival and motility of breast cancer cells. *Biomolecules*, 10(1), 50. <https://doi.org/10.3390/biom10010050>
- Guzik, T. J., & Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, 70(4), 660-667. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Hamberg, M., Sanz, A., & Castresana, C. (1999). α -oxidation of fatty acids in higher plants: Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an α -dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24503-24513. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24503>
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodriguez, M. J., Calvo, A. P., & Castresana, C. (2003). Activation of the fatty acid α -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves: Formation of oxylipins protecting against cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51796-51805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310514200>
- Han, H., Yan, P., Chen, L., Luo, C., Gao, H., Deng, Q., Zheng, M., Shi, Y., & Liu, L. (2015). Flaxseed oil containing α -linolenic acid ester of plant sterol improved

- atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 958217. <https://doi.org/10.1155/2015/958217>
- Harada, Y., Hatanaka, K., Kawamura, M., Saito, M., Ogino, M., Majima, M., Ohno, T., Ogino, K., Yamamoto, K., Taketani, Y., Yamamoto, S., & Katori, M. (1996). Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E2 formation in rat carrageenin-induced pleurisy. *Prostaglandins*, 51(1), 19-33. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/0090-6980(95)00168-9)
- Haslam, R. J., Dickinson, N. T., & Jang, E. K. (1999). Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2), 412-423. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10605732/>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167-197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
- Hechler, B., Cattaneo, M., & Gachet, C. (2005). The P2 receptors in platelet function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 31(2), 150-161. <https://doi.org/10.1055/s-2005-869520>
- Heiss, E. H., Tran, T. V. A., Zimmermann, K., Schwaiger, S., Vouk, C., Mayerhofer, B., Malainer, C., Atanasov, A. G., Stuppner, H., & Dirsch, V. M. (2014). Identification of chromomoric acid C-I as an Nrf2 activator in *Chromolaena odorata*. *Journal of Natural Products*, 77(3), 503-508. <https://doi.org/10.1021/np400778m>
- Hendrix, J., Nijs, J., Ickmans, K., Godderis, L., Ghosh, M., & Polli, A. (2020). The interplay between oxidative stress, exercise, and pain in health and disease: Potential role of autonomic regulation and epigenetic mechanisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1166. <https://doi.org/10.3390/antiox9111166>
- Heptinstall, S., Espinosa, D. I., Manolopoulos, P., Glenn, J. R., White, A. E., Johnson, A., Dovlatova, N., Fox, S. C., May, J. A., Hermann, D., Magnusson, O., Stefansson, K., Hartman, D., & Gurney, M. (2008). DG-041 inhibits the EP3 prostanoid receptor--a new target for inhibition of platelet function in atherothrombotic disease. *Platelets*, 19(8), 605-613. <https://doi.org/10.1080/09537100802351073>

- Hirvonen, K., Bai, Y., Headey, D., & Masters, W. A. (2020). Affordability of the EAT-Lancet reference diet: a global analysis. *The Lancet. Global Health*, 8(1), e59-e66. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30447-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30447-4)
- Hollenstein, K. (2019). Structures shed light on prostanoid signaling. *Nature Chemical Biology*, 15(1), 3-5. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0178-1>
- Holmes, D. R., Wester, W., Thompson, R. W., & Reilly, J. M. (1997). Prostaglandin E2 synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 25(5), 810-815. [https://doi.org/10.1016/s0741-5214\(97\)70210-6](https://doi.org/10.1016/s0741-5214(97)70210-6)
- Hristovska, A.-M., Rasmussen, L. E., Hansen, P. B. L., Nielsen, S. S., Nüsing, R. M., Narumiya, S., Vanhoutte, P., Skøtt, O., & Jensen, B. L. (2007). Prostaglandin E2 induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*, 50(3), 525-530. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.088948>
- Hsieh, H.-L., & Yang, C.-M. (2013). Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *BioMed Research International*, 2013, 484613. <https://doi.org/10.1155/2013/484613>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Imbusch, R., & Mueller, M. J. (2000a). Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(5), 720-726. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00154-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00154-4)
- Imbusch, Ruth, & Mueller, M. J. (2000b). Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F1 (phytoprostanes F1) in plants. *Plant Physiology*, 124(3), 1293-1304. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1293>
- Instituto Nacional de Estadística. (2017). *Defunciones por causas (lista reducida), sexo, tamaño de municipio y capital de residencia y edad*. INE. <https://ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t15/p417/a2017/10/&file=01002a.px&L=0>

- Iyú, D., Jüttner, M., Glenn, J. R., White, A. E., Johnson, A. J., Fox, S. C., & Heptinstall, S. (2011). PGE1 and PGE2 modify platelet function through different prostanoid receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 94(1-2), 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2010.11.001>
- Jadhav, V., Jabre, A., Lin, S.-Z., & Lee, T. J.-F. (2004). EP1- and EP3-receptors mediate prostaglandin E2-induced constriction of porcine large cerebral arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(12), 1305-1316. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000139446.61789.14>
- Janssen-Heininger, Y. M. W., Mossman, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J. S., Rhee, S. G., & van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(1), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011>
- Jayanama, K., Theou, O., Godin, J., Cahill, L., Shivappa, N., Hébert, J. R., Wirth, M. D., Park, Y.-M., Fung, T. T., & Rockwood, K. (2021). Relationship between diet quality scores and the risk of frailty and mortality in adults across a wide age spectrum. *BMC Medicine*, 19(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-01918-5>
- Jiang, S., Liu, H., & Li, C. (2021). Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1854. <https://doi.org/10.3390/foods10081854>
- Jones, R. L., Giembycz, M. A., & Woodward, D. F. (2009). Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. *British Journal of Pharmacology*, 158(1), 104-145. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00317.x>
- Julià, A., Martínez-Mateu, S. H., Domènech, E., Cañete, J. D., Ferrándiz, C., Tornero, J., Gisbert, J. P., Fernández-Nebro, A., Daudén, E., Barreiro-de Acosta, M., Pérez, C., Queiró, R., López-Longo, F. J., Carazo, J. L. S., Mendoza, J. L., Alpéri, M., Montilla, C., Venegas, J. J. P., Muñoz, F., ... IMID Consortium. (2021). Food groups associated with immune-mediated inflammatory diseases: a Mendelian randomization and disease severity study. *European*

- Journal of Clinical Nutrition*, 75(9), 1368-1382. <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00913-6>
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., & Reppas, C. (2006). Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*, 23(1), 165-176. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-8476-1>
- Kamiguti, A. S., Serrander, L., Lin, K., Harris, R. J., Cawley, J. C., Allsup, D. J., Slupsky, J. R., Krause, K.-H., & Zuzel, M. (2005). Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia. *The Journal of Immunology*, 175(12), 8424-8430. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8424>
- Kang, X., Qiu, J., Li, Q., Bell, K. A., Du, Y., Jung, D. W., Lee, J. Y., Hao, J., & Jiang, J. (2017). Cyclooxygenase-2 contributes to oxidopamine-mediated neuronal inflammation and injury via the prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09528-z>
- Karg, K., Dirsch, V. M., 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 Radical Research*, 41(1), 25-37. <https://doi.org/10.1080/10715760600939734>
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative stress in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(11), 42. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>
- Khan, M. K., Ahmad, K., Hassan, S., Imran, M., Ahmad, N., & Xu, C. (2018). Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innovative food science & emerging technologies: IFSET: the official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology*, 45, 361-381. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.006>
- Khor, A., Grant, R., Tung, C., Guest, J., Pope, B., Morris, M., & Bilgin, A. (2014). Postprandial oxidative stress is increased after a phytonutrient-poor food but not after a kilojoule-matched phytonutrient-rich food. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 34(5), 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.04.005>

- Kietzmann, T., Petry, A., Shvetsova, A., Gerhold, J. M., & Görlach, A. (2017). The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system: ROS and epigenetic modifications. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1533-1554. <https://doi.org/10.1111/bph.13792>
- Kim, J. H., Lee, J., Choi, I. J., Kim, Y.-I., & Kim, J. (2021). Dietary patterns and gastric cancer risk in a Korean population: a case-control study. *European Journal of Nutrition*, 60(1), 389-397. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02253w>
- Konya, V., Marsche, G., Schuligoi, R., & Heinemann, A. (2013). E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(3), 485-502. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.03.006>
- Koynova, R., & Caffrey, M. (1995). Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1255(3), 213-236. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00202-a](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00202-a)
- Kuriyama, S., Kashiwagi, H., Yuhki, K.-I., Kojima, F., Yamada, T., Fujino, T., Hara, A., Takayama, K., Maruyama, T., Yoshida, A., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2010). Selective activation of the prostaglandin E2 receptor subtype EP2 or EP4 leads to inhibition of platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis*, 104(4), 796-803. <https://doi.org/10.1160/TH10-01-0043>
- Kurz, M., Krett, A.-L., & Bünemann, M. (2020). Voltage dependence of prostanoid receptors. *Molecular Pharmacology*, 97(4), 267-277. <https://doi.org/10.1124/mol.119.118372>
- Labuschagne, C. F., van den Broek, N. J. F., Postma, P., Berger, R., & Brenkman, A. B. (2013). A protocol for quantifying lipid peroxidation in cellular systems by F2-isoprostane analysis. *PloS One*, 8(11), e80935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080935>
- Lagarde, M., Chen, P., Véricel, E., & Guichardant, M. (2010). Fatty acid-derived lipid mediators and blood platelet aggregation. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 82(4-6), 227-230. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.02.017>
- Lagunas, B. (2013). *Caracterización molecular y celular de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en plantas y su relación con la producción de oxilipinas*

- [Universidad de Zaragoza].
<https://zaguan.unizar.es/record/12553/files/TESIS-2013-105.pdf>
- Lara-Guzmán, O. J., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., Osorio, E., Álvarez-Quintero, R., Zuluaga, N., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., & Muñoz-Durango, K. (2018). Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biology*, *15*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.017>
- Lau, S., Gossen, M., Lendlein, A., & Jung, F. (2021). Venous and arterial endothelial cells from human umbilical cords: Potential cell sources for cardiovascular research. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 978. <https://doi.org/10.3390/ijms22020978>
- Lee, K., Lee, S. H., & Kim, T. H. (2020). The biology of prostaglandins and their role as a target for allergic airway disease therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1851. <https://doi.org/10.3390/ijms21051851>
- León-Perez, D., Medina, S., Londoño-Londoño, J., Cano-Lamadrid, M., Carbonell-Barrachina, Á., Durand, T., Guy, A., Oger, C., Galano, J.-M., Ferreres, F., Jiménez-Cartagena, C., Restrepo-Osorno, J., & Gil-Izquierdo, Á. (2019). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phytoprostanes and phytofurans contents. *Food Chemistry*, *280*, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.072>
- Leung, K. S., Galano, J.-M., Yau, Y. F., Oger, C., Durand, T., & Lee, J. C.-Y. (2021). Walnut-enriched diet elevated α -Linolenic acid, phytoprostanes, and phytofurans in rat liver and heart tissues and modulated anti-inflammatory lipid mediators in the liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(32), 9094-9101. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06690>
- Leung, K. S., Oger, C., Guy, A., Bultel-Poncé, V., Vigor, C., Durand, T., Gil-Izquierdo, A., Medina, S., Galano, J.-M., & Lee, J. C.-Y. (2022). Alpha-linolenic acid, phytoprostanes and phytofurans in plant, algae and food. En F. Rébeillé & E. Maréchal (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 101, pp. 437-468). Elsevier.
- Li, Y., Xia, W., Zhao, F., Wen, Z., Zhang, A., Huang, S., Jia, Z., & Zhang, Y. (2018). Prostaglandins in the pathogenesis of kidney diseases. *Oncotarget*, *9*(41), 26586-26602. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25005>

- Lin, X., Zheng, W., Liu, J., Zhang, Y., Qin, H., Wu, H., Xue, B., Lu, Y., & Shen, P. (2013). Oxidative stress in malignant melanoma enhances tumor necrosis factor- α secretion of tumor-associated macrophages that promote cancer cell invasion. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(12), 1337-1355. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4617>
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479-496. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Lipan, L., Collado-González, J., Domínguez-Perles, R., Corell, M., Bultel-Poncé, V., Galano, J.-M., Durand, T., Medina, S., Gil-Izquierdo, Á., & Carbonell-Barrachina, Á. (2020). Phytoprostanes and phytofurans-oxidative stress and bioactive compounds-in almonds are affected by deficit irrigation in almond trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(27), 7214-7225. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02268>
- 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* (San Diego, Calif.), 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., von Rad, U., Durner, J., & Mueller, M. J. (2005). B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiology*, 137(1), 328-340. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051714>
- Lopategi, A., López-Vicario, C., Alcaraz-Quiles, J., García-Alonso, V., Rius, B., Titos, E., & Clària, J. (2016). Role of bioactive lipid mediators in obese adipose tissue inflammation and endocrine dysfunction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 419, 44-59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.033>
- Maan, M., Peters, J. M., Dutta, M., & Patterson, A. D. (2018). Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504(3), 582-589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.097>
- MacDonald, R., & Reitmeier, C. (2017). Food Processing. En *Understanding food systems: Agriculture, Food Science, and nutrition in the United States* (1.^a ed.). Academic Press.
- Mansoor, S., Ali Wani, O., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive oxygen species in plants: From source to sink.

- Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(2), 225.
<https://doi.org/10.3390/antiox11020225>
- Marhuenda, J. (2016). *Compuestos bioactivos en vino tinto y su efecto sobre el estrés oxidativo y marcadores vasculares, de inflamación, mutagénesis y degeneración del sistema nervioso central tras su ingestión dietética por voluntarios sanos* [Universidad Católica San Antonio de Murcia].
<http://repositorio.ucam.edu/handle/10952/2056>
- Mariani, V., Gilles, S., Jakob, T., Thiel, M., Mueller, M. J., Ring, J., Behrendt, H., & Traidl-Hoffmann, C. (2007). Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction. *The Journal of Immunology*, 178(12), 7623-7631.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7623>
- Markovič, T., Jakopin, Ž., Dolenc, M. S., & Mlinarič-Raščan, I. (2017). Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discovery Today*, 22(1), 57-71. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.08.003>
- Marnett, L. J., Wright, T. L., Crews, B. C., Tannenbaum, S. R., & Morrow, J. D. (2000). Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13427-13430. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13427>
- Martínez-Sánchez, S., Domínguez-Perles, R., Montoro-García, S., Gabaldón, J. A., Guy, A., Durand, T., Oger, C., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, A. (2020). Bioavailable phytoprostanes and phytofurans from *Gracilaria longissima* have anti-inflammatory effects in endothelial cells. *Food & Function*, 11(6), 5166-5178. <https://doi.org/10.1039/d0fo00976h>
- Martyna, G.J. (1994) Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.* 101, 4177
- Mastrogoivanni, M. *Detección, cuantificación y análisis de oxilipinas en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica*. [2022]. Universidad de la República.
- Matsumoto, H., Naraba, H., Murakami, M., Kudo, I., Yamaki, K., Ueno, A., & Ohishi, S. (1997). Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat

- peritoneal macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(1), 110-114. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5894>
- Matsuoka, T., & Narumiya, S. (2007). Prostaglandin receptor signaling in disease. *TheScientificWorldJournal*, 7, 1329-1347. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.182>
- Matthews, J. S., & Jones, R. L. (1993). Potentiation of aggregation and inhibition of adenylate cyclase in human platelets by prostaglandin E analogues. *British Journal of Pharmacology*, 108(2), 363-369. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb12810.x>
- McAdam, B. F., Mardini, I. A., Habib, A., Burke, A., Lawson, J. A., Kapoor, S., & FitzGerald, G. A. (2000). Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoicosanoid production in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(10), 1473-1482. <https://doi.org/10.1172/JCI9523>
- Meagher, E. A., Barry, O. P., Burke, A., Lucey, M. R., Lawson, J. A., Rokach, J., & FitzGerald, G. A. (1999). Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(6), 805-813. <https://doi.org/10.1172/JCI5584>
- Medina, S., Collado-González, J., Ferreres, F., Londoño-Londoño, J., Jiménez-Cartagena, C., Guy, A., Durand, T., Galano, J.-M., & Gil-Izquierdo, A. (2017). Valorization strategy of banana passion fruit shell wastes: An innovative source of phytoprostanes and phenolic compounds and their potential use in pharmaceutical and cosmetic industries. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(11), 801-808. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-11-2>
- Medina, S., Collado-González, J., Ferreres, F., Londoño-Londoño, J., Jiménez-Cartagena, C., Guy, A., Durand, T., Galano, J.-M., & Gil-Izquierdo, Á. (2019). Potential of *Physalis peruviana* calyces as a low-cost valuable resource of phytoprostanes and phenolic compounds: Phytoprostanes and phenolic compounds in *Physalis peruviana* residues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2194-2204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9413>
- Medina, S., Gil-Izquierdo, Á., Abu-Reidah, I. M., Durand, T., Bultel-Poncé, V., Galano, J.-M., & Domínguez-Perles, R. (2020). Evaluation of *Phoenix dactylifera* edible parts and byproducts as sources of phytoprostanes and

- phytofurans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(33), 8942-8950. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03364>
- Medina, S., Gil-Izquierdo, Á., Durand, T., Ferreres, F., & Domínguez-Perles, R. (2018). Structural/functional matches and divergences of phytoprostanes and phytofurans with bioactive human oxylipins. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(11), 165. <https://doi.org/10.3390/antiox7110165>
- Megha, K. B., Joseph, X., Akhil, V., & Mohanan, P. V. (2021). Cascade of immune mechanism and consequences of inflammatory disorders. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 91(153712), 153712. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153712>
- Mellado, P. (2016). *Evaluación toxicológica in vitro e in vivo de compuestos organosulfurados con potencial uso en envasado activo en contacto con alimentos*. [Tesis]. Universidad de Sevilla.
- 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 α -linolenic acid B1- and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR- γ activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 73, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.025>
- Monteiro, C. A., Moubarac, J.-C., Cannon, G., Ng, S. W., & Popkin, B. (2013). Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system: Ultra-processed products: global dominance. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 14 Suppl 2, 21-28. <https://doi.org/10.1111/obr.12107>
- Montoro-García, S., Shantsila, E., Hernández-Romero, D., Jover, E., Valdés, M., Marín, F., & Lip, G. Y. H. (2014). Small-size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P-selectin. *British Journal of Haematology*, 166(4), 571-580. <https://doi.org/10.1111/bjh.12913>
- Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J., 2nd. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB Journal: Official Publication of the*

- Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(15), 1791-1800.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2330rev>
- Montuschi, P., Barnes, P., & Jackson Roberts, L. (2007). Insights into oxidative stress: The isoprostanes. *Current medicinal chemistry*, 14(6), 703-717.
<https://doi.org/10.2174/092986707780059607>
- Moreno, J. (2010). *Estudio del efecto de la inhibición de la PGE2 sobre la inflamación y la síntesis de mediadores del metabolismo óseo en el cartílago articular de pacientes con artrosis*. [Tesis]. Universidad Autónoma de Madrid.
- Morimoto, K., Suno, R., Hotta, Y., Yamashita, K., Hirata, K., Yamamoto, M., Narumiya, S., Iwata, S., & Kobayashi, T. (2019). Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3. *Nature Chemical Biology*, 15(1), 8-10. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0171-8>
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., & Roberts, L. J., 2nd. (1990a). A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(23), 9383-9387. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.23.9383>
- Mueller, M. J. (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 441-448.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.001>
- Mueller, M. J., & Berger, S. (2009). Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1511-1521. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.018>
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh, S., & Kudo, I. (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32783-32792.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M003505200>
- Musiek, E. S., Gao, L., Milne, G. L., Han, W., Everhart, M. B., Wang, D., Backlund, M. G., DuBois, R. N., Zanoni, G., Vidari, G., Blackwell, T. S., & Morrow, J. D. (2005). Cyclopentenone isoprostanes inhibit the inflammatory response in

- macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35562-35570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504785200>
- Muthuswamy, R., Mueller-Berghaus, J., Haberkorn, U., Reinhart, T. A., Schadendorf, D., & Kalinski, P. (2010). PGE(2) transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*, 116(9), 1454-1459. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258038>
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., & Narumiya, S. (1993). Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature*, 365(6442), 166-170. <https://doi.org/10.1038/365166a0>
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., & Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiological Reviews*, 79(4), 1193-1226. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1193>
- Neurology Collaborators. (2019). Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*; 18: 459–80. [https://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X)
- Nylund, G. M., Weinberger, F., Rempt, M., & Pohnert, G. (2011). Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PloS One*, 6(12), e29359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029359>
- Oeder, S., Alessandrini, F., Wirz, O. F., Braun, A., Wimmer, M., Frank, U., Hauser, M., Durner, J., Ferreira, F., Ernst, D., Mempel, M., Gilles, S., Buters, J. T. M., Behrendt, H., Traidl-Hoffmann, C., Schmidt-Weber, C., Akdis, M., & Gutermuth, J. (2015). Pollen-derived nonallergenic substances enhance Th2-induced IgE production in B cells. *Allergy*, 70(11), 1450-1460. <https://doi.org/10.1111/all.12707>
- Oger, C., Cuyamendous, C., de la Torre, A., Candy, M., Guy, A., Bultel-Poncé, V., Durand, T., & Galano, J.-M. (2018). History of chemical routes towards cyclic non-enzymatic oxygenated metabolites of polyunsaturated fatty acids. *Synthesis*, 50(17), 3257-3280. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1589540>

- OMS. (2018). *Alimentacion Sana: Todo lo Que hay Que saber sobre Una dieta saludable*. WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- O'Brien, N. M., Woods, J. A., Aherne, S. A., & O'Callaghan, Y. C. (2000). Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochemical Society Transactions*, 28(2), 22-26. <https://doi.org/10.1042/bst0280022>
- Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Chrysohou, C., Vlismas, K., Skoumas, Y., Palliou, K., & Stefanadis, C. (2008). The effect of clinical characteristics and dietary habits on the relationship between education status and 5-year incidence of cardiovascular disease: the ATTICA study. *European Journal of Nutrition*, 47(5), 258-265. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0720-0>
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21-32. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- Parchmann, S., & Mueller, M. J. (1998). Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from α -linolenic acid in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32650-32655. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32650>
- Parihar, A., Eubank, T. D., & Doseff, A. I. (2010). Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 204-215. <https://doi.org/10.1159/000296507>
- Pascoal, L. B., Palma, B. B., Chaim, F. H. M., de Castro, M. M., Damázio, T. A., Franceschini, A. P. M. de F., Milanski, M., Velloso, L. A., & Leal, R. F. (2022). New translational and experimental insights into the role of pro-resolving lipid mediators in inflammatory bowel disease. *World Journal of Experimental Medicine*, 12(1), 1-15. <https://doi.org/10.5493/wjem.v12.i1.1>
- Pasterk, L., Philipose, S., Eller, K., Marsche, G., Heinemann, A., & Schuligoi, R. (2015). The EP3 agonist sulprostone enhances platelet adhesion but not thrombus formation under flow conditions. *Pharmacology*, 96(3-4), 137-143. <https://doi.org/10.1159/000437143>
- Paul, B. Z., Ashby, B., & Sheth, S. B. (1998). Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells: Prostaglandin Receptors in Platelets. *British Journal of*

- Haematology, 102(5), 1204-1211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00910.x>
- Paz, C. (2019). *Influencia de factores inherentes al alimento y al individuo sobre la digestibilidad de lípidos de origen vegetal*. [Tesis] [Universidad Politécnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/125474/Paz%20-%20INFLUENCIA%20DE%20FACTORES%20INHERENTES%20AL%20ALIMENTO%20Y%20AL%20INDIVIDUO%20SOBRE%20LA%20DIGESTIBILIDAD%20DE%20L%20c3%8dP....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Peebles, R. S., Jr. (2019). Prostaglandins in asthma and allergic diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 193, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.001>
- Peoples, J. N., Saraf, A., Ghazal, N., Pham, T. T., & Kwong, J. Q. (2019). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(12), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>
- Pesta, D., & Roden, M. (2017). The Janus head of oxidative stress in metabolic diseases and during physical exercise. *Current Diabetes Reports*, 17(6), 41. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0867-2>
- Petrucci, G., De Cristofaro, R., Rutella, S., Ranelletti, F. O., Pocaterra, D., Lancellotti, S., Habib, A., Patrono, C., & Rocca, B. (2011). Prostaglandin E2 differentially modulates human platelet function through the prostanoid EP2 and EP3 receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(2), 391-402. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.174821>
- Philipose, S., Konya, V., Lazarevic, M., Pasterk, L. M., Marsche, G., Frank, S., Peskar, B. A., Heinemann, A., & Schuligoi, R. (2010). Laropiprant attenuates EP3 and TP prostanoid receptor-mediated thrombus formation. *PloS One*, 7(8), e40222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040222>
- Pinciroli, M., Domínguez-Perles, R., Abellán, A., Guy, A., Durand, T., Oger, C., Galano, J. M., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, A. (2017). Comparative Study of the Phytoprostane and Phytofuran Content of indica and japonica Rice (*Oryza sativa* L.) Flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(40), 8938-8947. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03482>
- Pinciroli, M., Domínguez-Perles, R., Garbi, M., Abellán, A., Oger, C., Durand, T., Galano, J. M., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, A. (2018). Impact of salicylic acid

- content and growing environment on phytoprostane and phytofuran (stress biomarkers) in *Oryza sativa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(47), 12561-12570. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04975>
- Pincirolì, M. (2018). *Role of Phytoprostanes and Phytofurans in the Protection and Defense Mechanisms of Rice (Oryza sativa L.) Against Oxidative Stress Caused by Abiotic Agents and Different Technological Practices* [Universidad de Murcia]. <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/60439/1/PINCIROLI%20MARIA%20Tesis%202018.pdf>
- Pino, L. L., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Burgos-Edwards, A., Domínguez-Perles, R., Oger, C., Durand, T., Gil-Izquierdo, Á., Bustamante, L., Mardones, C., Márquez, K., Contreras, D., & Schmeda-Hirschmann, G. (2019). Phenolic, oxylipin and fatty acid profiles of the Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*): Antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes. *Food Chemistry*, 298(125026), 125026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125026>
- Pino-Ramos, L. L., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Burgos-Edwards, A., Domínguez-Perles, R., Oger, C., Durand, T., Gil-Izquierdo, Á., Bustamante, L., Mardones, C., Márquez, K., Contreras, D., & Schmeda-Hirschmann, G. (2019). Phenolic, oxylipin and fatty acid profiles of the Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*): Antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes. *Food Chemistry*, 298(125026), 125026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125026>
- Porrini, M., & Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 18(10), 647-650. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.08.004>
- Przybylska-Balcerek, A., Frankowski, J., & Stuper-Szablewska, K. (2020). The influence of weather conditions on bioactive compound content in sorghum grain. *European Food Research and Technology*, 246(1), 13-22. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03391-0>
- Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. B., & Uddin, M. S. (2021). Role of phenolic compounds in human disease: Current knowledge and future prospects.

- Molecules* (Basel, Switzerland), 27(1), 233.
<https://doi.org/10.3390/molecules27010233>
- Ramezani-Jolfaie, N., Mohammadi, M., & Salehi-Abargouei, A. (2019). The effect of healthy Nordic diet on cardio-metabolic markers: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *European Journal of Nutrition*, 58(6), 2159-2174. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1804-0>
- Rangel-Huerta, O. D., Pastor-Villaescusa, B., Aguilera, C. M., & Gil, A. (2015). A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: Phenolic compounds. *Nutrients*, 7(7), 5177-5216. <https://doi.org/10.3390/nu7075177>
- Rao, R., Redha, R., Macias-Perez, I., Su, Y., Hao, C., Zent, R., Breyer, M. D., & Pozzi, A. (2007). Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 16959-16968. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701214200>
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy: Bioavailability of bioactive food compounds. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x>
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 986-1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
- Rinder, C. S., Student, L. A., Bonan, J. L., Rinder, H. M., & Smith, B. R. (1993). Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release. *Blood*, 82(2), 505-512. <https://doi.org/10.1182/blood.v82.2.505.505>
- Rodriguez, J. M. (Ed.). (1986). *Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Biosíntesis, metabolismo y mecanismos de acción*. *Revista Química Clínica*, 5 (2), 139-144. [https://www.seqc.es/download/revista/680/1683/981760410/1024/cms/Quimica%20Clínica%201986;5%20\(2\)%20139-144.pdf](https://www.seqc.es/download/revista/680/1683/981760410/1024/cms/Quimica%20Clínica%201986;5%20(2)%20139-144.pdf)

- Roos, K., Wu, C. J., Damm, W. et al. (2019) OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation* 15, 1863-1874.
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., ... GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. (2020). Global Burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982-3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Roy, K., Wu, Y., Meitzler, J. L., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Antony, S., & Doroshov, J. H. (2015). NADPH oxidases and cancer. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 128(12), 863-875. <https://doi.org/10.1042/CS20140542>
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E., Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Rocher, A., Reversat, G., Vercauteren, J., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., & Vigor, C. (2019). Identification and quantification of phytoprostanes and phytofurans of coffee and cocoa by- and co-products. *Food & Function*, 10(10), 6882-6891. <https://doi.org/10.1039/c9fo01528k>
- Rumiá, J. (2018). *Eicosanoides y estrés oxidativo en el neocórtex de pacientes con epilepsia resistente a fármacos tratados mediante cirugía de la epilepsia. [Tesis]*. Universidad de Barcelona.
- Sales, K. J., & Jabbour, H. N. (2003). Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*, 126(5), 559-567. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260559>
- Samuchiwal, S. K., & Boyce, J. A. (2018). Role of lipid mediators and control of lymphocyte responses in type 2 immunopathology. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1182-1190. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.006>
- Schober, L. J., Khandoga, A. L., Penz, S. M., & Siess, W. (2010). The EP3-agonist sulprostone, but not prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation in human blood. *Thrombosis and Haemostasis*, 103(6), 1268-1269. <https://doi.org/10.1160/TH09-12-0815>

- Schober, L. J., Khandoga, A. L., Dwivedi, S., Penz, S. M., Maruyama, T., Brandl, R., & Siess, W. (2011). The role of PGE(2) in human atherosclerotic plaque on platelet EP(3) and EP(4) receptor activation and platelet function in whole blood. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 32(2), 158-166. <https://doi.org/10.1007/s11239-011-0577-6>
- Schaller, A., & Stintzi, A. (2009). Enzymes in jasmonate biosynthesis - structure, function, regulation. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1532-1538. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.032>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology: CB*, 24(10), R453-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sellem, L., Antoni, R., Koutsos, A., Ozen, E., Wong, G., Ayyad, H., Weech, M., Schulze, M. B., Wernitz, A., Fielding, B. A., Robertson, M. D., Jackson, K. G., Griffin, B. A., & Lovegrove, J. A. (2022). Impact of a food-based dietary fat exchange model for replacing dietary saturated with unsaturated fatty acids in healthy men on plasma phospholipids fatty acid profiles and dietary patterns. *European Journal of Nutrition*, 61(7), 3669-3684. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02910-2>
- Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510, 92-101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>
- Seyedsadjadi, N., & Grant, R. (2020). The potential benefit of monitoring oxidative stress and inflammation in the prevention of non-communicable diseases (NCDs). *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 15. <https://doi.org/10.3390/antiox10010015>
- Shantsila, E., Montoro-Garcia, S., & Lip, G. Y. H. (2014). Monocytes circulate in constant reversible interaction with platelets in a [Ca²⁺]-dependent manner. *Platelets*, 25(3), 197-201. <https://doi.org/10.3109/09537104.2013.784248>
- Sharif, O., Bolshakov, V. N., Raines, S., Newham, P., & Perkins, N. D. (2007). Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunology*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>

- Shearer, G. C., & Newman, J. W. (2009). Impact of circulating esterified eicosanoids and other oxylipins on endothelial function. *Current Atherosclerosis Reports*, 11(6), 403-410. <https://doi.org/10.1007/s11883-009-0061-3>
- Shim, J., Park, C., Lee, H. S., Park, M. S., Lim, H. T., Chauhan, S., Dana, R., Lee, H., & Lee, H. K. (2012). Change in prostaglandin expression levels and synthesizing activities in dry eye disease. *Ophthalmology*, 119(11), 2211-2219. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.05.038>
- Shio, H., & Ramwell, P. (1972). Effect of prostaglandin E 2 and aspirin on the secondary aggregation of human platelets. *Nature: New Biology*, 236(63), 45-46. <https://doi.org/10.1038/newbio236045a0>
- Smith, J. B., & Willis, A. L. (1970). Formation and release of prostaglandins by platelets in response to thrombin. *British Journal of Pharmacology*, 40(3), 545P-546P.
- Soh, W. T., Aglas, L., Mueller, G. A., Gilles, S., Weiss, R., Scheibelhofer, S., Huber, S., Scheidt, T., Thompson, P. M., Briza, P., London, R. E., Traidl-Hoffmann, C., Cabrele, C., Brandstetter, H., & Ferreira, F. (2019). Multiple roles of Bet v 1 ligands in allergen stabilization and modulation of endosomal protease activity. *Allergy*, 74(12), 2382-2393. <https://doi.org/10.1111/all.13948>
- Soto, A. M. (2016). *Viabilidad tecnológica y biodisponibilidad de diferentes sales de calcio como ingredientes funcionales en productos cárnicos* [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38819/>
- Steven, S., Frenis, K., Oelze, M., Kalinovic, S., Kuntic, M., Bayo Jimenez, M. T., Vujacic-Mirski, K., Helmstädter, J., Kröller-Schön, S., Münzel, T., & Daiber, A. (2019). Vascular inflammation and oxidative stress: Major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 7092151. <https://doi.org/10.1155/2019/7092151>
- Straus, D. S., & Glass, C. K. (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Medicinal Research Reviews*, 21(3), 185-210. <https://doi.org/10.1002/med.1006>
- Stroganov, O. V., Novikov, F. N., Stroylov, V. S., Kulkov, V., & Chilov, G. G. (2008). Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening. *Journal of chemical*

- information and modeling, 48(12), 2371–2385.
<https://doi.org/10.1021/ci800166p>
- Šimurina, M., de Haan, N., Vučković, F., Kennedy, N. A., Štambuk, J., Falck, D., Trbojević-Akmačić, I., Clerc, F., Razdorov, G., Khon, A., Latiano, A., D'Incà, R., Danese, S., Targan, S., Landers, C., Dubinsky, M., McGovern, D. P. B., Annese, V., Wuhrer, M., ... Pierik, M. (2018). Glycosylation of immunoglobulin G associates with clinical features of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 154(5), 1320-1333.e10.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.01.002>
- Sugimoto, Y., & Narumiya, S. (2007). Prostaglandin E receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 11613-11617.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R600038200>
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A., & Motilva, V. (2015). Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine Drugs*, 13 (10), 6152–6209.
<https://doi.org/10.3390/md13106152>
- Tapia-Abellán, A., Angosto-Bazarrá, D., Martínez-Banaclocha, H., de Torre-Minguela, C., Cerón-Carrasco, J. P., Pérez-Sánchez, H., Arostegui, J. I., & Pelegrin, P. (2019). MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nature chemical biology*, 15(6), 560–564.
<https://doi.org/10.1038/s41589-019-0278-6>
- Tapias, D., Sanders, D. P., & Bravetti, A. (2016). Geometric integrator for simulations in the canonical ensemble. *The Journal of Chemical Physics*, 145(8), 084113. <https://doi.org/10.1063/1.4961506>
- Testerink, C., & Munnik, T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(7), 2349-2361. <https://doi.org/10.1093/jxb/err079>
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A. K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., & Mueller, M. J. (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 34(3), 363-375.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01730.x>

- Tkacz, K., Gil-Izquierdo, Á., Medina, S., Turkiewicz, I. P., Domínguez-Perles, R., Nowicka, P., & Wojdyło, A. (2022). Phytoprostanes, phytofurans, tocopherols, tocotrienols, carotenoids and free amino acids and biological potential of sea buckthorn juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(1), 185-197. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11345>
- Tourdot, B. E., Ahmed, I., & Holinstat, M. (2014). The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 176. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00176>
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(7), 579-591. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>
- Trachootham, D., Zhou, Y., Zhang, H., Demizu, Y., Chen, Z., Pelicano, H., Chiao, P. J., Achanta, G., Arlinghaus, R. B., Liu, J., & Huang, P. (2006). Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell*, 10(3), 241-252. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.009>
- 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(4), 627-636. <https://doi.org/10.1084/jem.20041065>
- van Velzen, J. F., Laros-van Gorkom, B. A. P., Pop, G. A. M., & van Heerde, W. L. (2012). Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thrombosis Research*, 130(1), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2012.02.041>
- Veciana, C., Cortés, E., Torro, L., Sirvent, E., Rizo, M. M., & Gil, V. (2014). Assessment of cytotoxicity and biosafety of polyphenolic extracts from olive pits. *Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 29(6), 1388-1393. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.6.7141>
- Veza, R., Roberti, R., Nenci, G. G., & Gresele, P. (1993). Prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation by priming protein kinase C. *Blood*, 82(9), 2704-2713. <https://doi.org/10.1182/blood.v82.9.2704.bloodjournal8292704>

- Vicente, J., Cascón, T., Vicedo, B., García-Agustín, P., Hamberg, M., & Castresana, C. (2012). Role of 9-lipoxygenase and α -dioxygenase oxylipin pathways as modulators of local and systemic defense. *Molecular Plant*, 5(4), 914-928. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr105>
- Vigor, C., Reversat, G., Rocher, A., Oger, C., Galano, J.-M., Vercauteren, J., Durand, T., Tonon, T., Leblanc, C., & Potin, P. (2018). Isoprostanooids quantitative profiling of marine red and brown macroalgae. *Food Chemistry*, 268, 452-462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.111>
- Waltenberger, B., Mocan, A., Šmejkal, K., Heiss, E. H., & Atanasov, A. G. (2016). Natural products to counteract the epidemic of cardiovascular and metabolic disorders. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(6), 807. <https://doi.org/10.3390/molecules21060807>.
- Walton, K. D., Mishkind, D., Riddle, M. R., Tabin, C. J., & Gumucio, D. L. (2018). Blueprint for an intestinal villus: Species-specific assembly required. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 7(4), e317. <https://doi.org/10.1002/wdev.317>
- Wang, W., & Kang, P. M. (2020). Oxidative stress and antioxidant treatments in cardiovascular diseases. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(12), 1292. <https://doi.org/10.3390/antiox9121292>
- Wang, X., Zhou, Y., Gao, Q., Ping, D., Wang, Y., Wu, W., Lin, X., Fang, Y., Zhang, J., & Shao, A. (2020). The role of exosomal microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 3232869. <https://doi.org/10.1155/2020/3232869>
- Wang, Y., Yin, L., Hu, B., Tse, L. A., Liu, Y., Ma, H., & Li, W. (2021). Association of heart rate with cardiovascular events and mortality in hypertensive and normotensive population: a nationwide prospective cohort study. *Annals of Translational Medicine*, 9(11), 917. <https://doi.org/10.21037/atm-21-706>
- Wenzel, S. E. (2016). Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes. Type-2 immunity and beyond. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 55(1), 1-4. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0141PS>
- Woodward, D. F., Jones, R. L., & Narumiya, S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors,

- updating 15 years of progress. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 471-538. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003517>
- World Health Organization. (2014). *GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases 2014*. Who.int. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/148114/9789241564854_eng.pdf
- Wójcik, P., Gęgotek, A., Žarković, N., & Skrzydlewska, E. (2021). Oxidative stress and lipid mediators modulate immune cell functions in autoimmune diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020723>
- Xiao, C.-Y., Yuhki, K.-I., Hara, A., Fujino, T., Kuriyama, S., Yamada, T., Takayama, K., Takahata, O., Karibe, H., Taniguchi, T., Narumiya, S., & Ushikubi, F. (2004). Prostaglandin E 2 protects the heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP 4. *Circulation*, 109(20), 2462-2468. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000128046.54681.97>
- Yin, H., Gao, L., Tai, H.-H., Murphey, L. J., Porter, N. A., & Morrow, J. D. (2007). Urinary prostaglandin F2alpha is generated from the isoprostane pathway and not the cyclooxygenase in humans. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 329-336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608975200>
- Yonny, M. E., Rodríguez Torresi, A., Cuyamendous, C., Réversat, G., Oger, C., Galano, J.-M., Durand, T., Vigor, C., & Nazareno, M. A. (2016). Thermal stress in melon plants: Phytoprostanes and phytofurans as oxidative stress biomarkers and the effect of antioxidant supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(44), 8296-8304. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03011>
- Young, O., Crotty, T., O'Connell, R., O'Sullivan, J., & Curran, A. J. (2010). Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head & Neck*, 32(6), 750-756. <https://doi.org/10.1002/hed.21247>
- Yui, K., Imataka, G., Nakamura, H., Ohara, N., & Naito, Y. (2015). Eicosanoids derived from arachidonic acid and their family prostaglandins and cyclooxygenase in psychiatric disorders. *Current Neuropharmacology*, 13(6), 776-785. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666151102103305>

- Zhang, Y., & Daaka, Y. (2011). PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA C γ pathway. *Blood*, 118(19), 5355-5364. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-350587>
- Zhang, M., & Shah, A. M. (2014). ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells. *Cardiovascular Research*, 102(2), 249-257. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu050>
- Zitvogel, L., Pietrocola, F., & Kroemer, G. (2017). Nutrition, inflammation and cancer. *Nature Immunology*, 18(8), 843-850. <https://doi.org/10.1038/ni.3754>

VIII – ANEXOS

VIII- ANEXOS

ANEXO 1. PHYTOPROSTANES AND PHYTOFURANS MODULATE COX-2-LINKED INFLAMMATION MARKERS IN LPS-STIMULATED THP-1 MONOCYTES BY LIPIDOMICS WORKFLOW

Free Radical Biology and Medicine 167 (2021) 335–347



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original article

Phytosterols and phytofurans modulate COX-2-linked inflammation markers in LPS-stimulated THP-1 monocytes by lipidomics workflow

María Campillo^{a,1}, Sonia Medina^{b,1,*}, Federico Fanti^{b,c}, Juana I. Gallego-Gómez^a, Agustín Simonelli-Muñoz^a, Valérie Bultel-Poncé^d, Thierry Durand^d, Jean Marie Galano^d, Francisco A. Tomás-Barberán^{b,e}, Ángel Gil-Izquierdo^{b,*}, Raúl Domínguez-Perles^b^a Departamento de Enfermería, Universidad Católica de Murcia, UCAM, 3010, Murcia, Spain^b 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^c University of Teramo, Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, 64100, TE, Italy^d Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR, 5247, CNRS, University of Montpellier, ENSCM, Faculty of Pharmacy, Montpellier, France^e Department of Biotechnology, College of Science, Taif University, Saudi Arabia

ARTICLE INFO

Keywords:
 Monocytes
 Phytosterols
 Phytofurans
 Inflammation
 Prostaglandins
 UHPLC-QQ-ESI-MS/MS

ABSTRACT

Inflammation is a fundamental pathophysiological process which occurs in the course of several diseases. The present work describes the capacity of phytosterols (PhytoPs) and phytofurans (PhytoFs) (plant oxylipins), present in plant-based foods, to modulate inflammatory processes mediated by prostaglandins (PGs, human oxylipins) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated THP-1 monocytic cells, through a panel of 21 PGs and PG's metabolites, analyzed by UHPLC-QQ-ESI-MS/MS. Also, the assessment of the cytotoxicity of PhytoPs and PhytoFs on THP-1 cells evidenced percentages of cell viability higher than 90% when treated with up to 100 μM. Accordingly, 50 μM of the individual PhytoPs and PhytoFs 9-F₁₁-PhytoP, 9-*epi*-9-F₁₁-PhytoP, *ent*-16-F₁₁-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁₁-PhytoP, *ent*-9-D₁₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, 9-L₁-PhytoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF were evaluated on their capacity to modulate the expression of inflammatory markers. The results obtained demonstrated the presence of 7 metabolites (15-keto-PGF_{2α}, PGF_{2α}, 11β-PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, PGDM, and PGF_{1α}) in THP-1 monocytic cells, which expression was significantly modulated when exposed to LPS. The evaluation of the capacity of the individual PhytoPs and PhytoFs to revert the modification of the quantitative profile of PGs induced by LPS revealed the anti-inflammatory ability of 9-F₁₁-PhytoP, *ent*-9-D₁₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, 9-L₁-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, as evidenced by their capacity to prevent the up-regulation of 15-keto-PGF_{2α}, PGF_{2α}, PGE₂, PGF_{1α}, PGDM, and PGD₂ induced by LPS. These results indicated that specific plant oxylipins can protect against inflammatory events, encouraging further investigations using plant-based foods rich in these oxylipins or enriched extracts, to identify specific bioactivities of the diverse individual molecules, which can be useful for nutrition and health in the frame of well-defined pathophysiological processes.

Abbreviations: BHA, butylated hydroxyanisole; COX, cyclooxygenase; ECACC, European Collection of Cell Culture; ESI, electrospray ionization; FBS, fetal bovine serum; IL-12, interleukine-12; LOX, lipooxygenase; LPS, lipopolysaccharide; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell; PLA2, phospholipase A₂; PG, prostaglandin; PhytoPs, phytosterols; PhytoFs, phytofurans; PMS, phenazine methosulphate; PPAR-γ, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma; SPE, solid-phase extraction; TH2, type 2 helper immune response; THP-1, human monocytic cell line; UHPLC, ultra-high pressure liquid chromatography; XTT, 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide salt.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: smescudero@cebas.csic.es (S. Medina), angelgil@cebas.csic.es (Á. Gil-Izquierdo).¹ These two authors contributed equally to the present work.<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.002>

Received 13 November 2020; Received in revised form 24 February 2021; Accepted 1 March 2021

Available online 17 March 2021

0891-5849/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Inflammation is the first biological response of the immune system to an array of factors that disturb the homeostasis of cells and tissues, and is triggered to restore the physiological conditions [1]. In this scenario, the innate immune system plays a pivotal role in the evolution of inflammation, with its functioning mainly based on receptors that recognize conserved molecular structures of pathogens, such lipopolysaccharide (LPS). When these are recognized, the immune system initiates a variety of host responses by activating different molecular pathways involved in systemic inflammation. During this process, cells secrete cyclooxygenase (COX) products, such as prostaglandins (PGs) E₂ and F_{2α} (PGE₂ and PGF_{2α}, respectively), and their metabolites, responsible for the activation of the inflammatory cascade [2–5].

In the search for new compounds with the capacity to prevent inflammation, various studies aimed at unraveling the mechanism/s of action of secondary metabolites of higher plants. These studies revealed the valuable capability to avoid PG secretion in response to the LPS challenge through the inhibition of the enzymes involved in the production of PGs, such as phospholipase A₂ (PA2), cyclooxygenase (COX), and lipoxygenase (LOX). Therefore, they modulate the inflammatory process [6–9] due to the inhibition of specific enzymes [10–12], which has been associated with various health benefits.

In this regard, the presence of a new type of secondary metabolite, belonging to the family of plant oxylipins, and represented by phyto-prostanoids (PhytoPs) and phytofurans (PhytoFs) has been reported in plant-based foods [13–15]. To the present date, these compounds have been characterized in a wide diversity of plant-based foods, namely nuts, hazelnuts, almonds, vegetable oils, cereals, olives, wine, peas, rice, several tropical fruits, cocoa, macroalgae, chocolate, pistachio, date, and especially in legumes, at different concentrations [16–40]. They have been suggested to be bioactive compounds, mainly based on their structural analogy with isoprostanooids [41]. However, their capacity to modulate inflammation with respect to their ability to influence the isoprostanooid profile in a pro-inflammatory environment, has not been addressed as of yet. Hence, the pro- and anti-inflammatory activity of individual PhytoPs and PhytoFs merits to be explored, as PGs play a central role in diseases coursing with inflammation [34].

In this scenario, the present article aims to uncover the capacity of individual PhytoPs and PhytoFs to modulate the inflammatory response triggered by LPS in the THP-1 human monocytic cell line, *in vitro*. The inflammatory modulation foreseen will be monitored by assessing the prostanoid profile through a panel of 21 human oxylipins analyzed in cells and growth media by UHPLC-QqQ-ESI-MS/MS.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

The PhytoPs, 9-F₁-PhytoP, 9-*epi*-9-F₁-PhytoP, *ent*-16-F₁-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁-PhytoP, *ent*-9-D₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and 9-L₁-PhytoP, and the PhytoFs *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF, were synthesized according to published procedures [42–47], and provided by the *Institut des Biomolécules Max Mousseron* (IBMM) (Montpellier, France). A total of 21 PGs were analyzed in the current study (Table 1). The authentic standards corresponding to this range of PGs were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA). Hexane was obtained from Panreac (Castellar del Valles, Barcelona, Spain), and 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 (deionized water, acetonitrile, methanol, and formic acid) 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 were Strata cartridges

Table 1

Retention time and MRM transitions of prostaglandins assessed in LPS-stimulated and non-stimulated THP-1 cells and growth media.

Prostaglandin	R _t (min.)	Parent ion (m/z [M – H])	Fragment (m/z MS2 [M – H])
<i>Prostaglandin generated from AA</i>			
<i>Prostaglandin D-pathway</i>			
Tetranor-PGDM	3.17	327.1	108.9
PGDM	3.20	327.1	309.1
Tetranor-PGDM lactone	3.50	309.1	142.9
Tetranor-PGJM	3.60	609.0	155.0
2,3-dinor-11β-PGF _{2α}	10.57	325.2	237.1
PGD ₂	13.22	350.9	315.0
11-β-PGF _{2α}	13.61	353.0	309.1
<i>Prostaglandin E-pathway</i>			
Tetranor-PGEM	3.17	327.0	308.8
Tetranor-PGAM	3.58	309.0	2900.9
20-OH-PGE ₂	4.66	367.1	349.2
PGE ₂	13.07	351.2	333.1
<i>Prostaglandin F-pathway</i>			
Tetranor-PGFM	3.14	329.4	311.1
<i>ent</i> -20-OH-PGF _{2α}	5.10	369.2	325.1
19(R)-OH-PGF _{2α}	5.15	369.2	325.1
15-keto-PGF _{2α}	12.90	351.1	314.9
PGF _{2α}	13.60	353.1	309.0
<i>Prostaglandin I-pathway</i>			
2,3-dinor-6-keto PGF _{1α}	10.80	341.0	134.9
6-keto-PGF _{1α}	12.69	369.0	245.1
<i>Prostaglandin generated from DGLA</i>			
PGE ₁	12.84	353.2	317.2
PGF _{1α}	13.67	355.2	311.0
<i>Prostaglandin generated from EPA</i>			
17- <i>trans</i> -PGF _{3α}	12.47	350.9	307.0

AA, arachidonic acid; DGLA, dihomo-γ-linolenic acid; EPA, eicosapentanoic acid.

(Strata X-AW, 100 mg/3 mL), and these were acquired from Phenomenex (Torrance, CA, USA).

2.2. Cell lines and culture conditions

The monocytic human (THP-1) cell line (ECACC® General Cell Collection-88081201) was obtained from the European Collection of Cell Culture (ECACC, Public Health England, Porton Down, Salisbury, UK). Cells were grown in RPMI 1640, supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS), in 75 cm² cell culture flasks to the logarithmic growth phase (0.6–1.4 × 10⁶ cells/mL), at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The passage number of the cells used in this study was between 17 and 20.

2.3. XTT reduction-based cell viability test

The toxicity of individual PhytoPs and PhytoFs was tested in THP-1 cells, resorting to the XTT methodology. For this, exponentially-growing cells were seeded into a 96-well plate at a density of 10⁴ cells/well. After incubation for 24 and 48-h with decreasing concentrations of the PhytoPs and PhytoFs (100,000, 50,000, 25,000, 5,000, 1,000, 0.200, 0.020, and 0.002 μM), the cells were incubated with the 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfonylphenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt (XTT) solution at a final concentration of 1 mg/mL (7.65 μg phenazine methosulphate (PMS)/mL) for 4-h, at 37 °C. The absorbance was measured at 450 nm, using 690 nm as a reference wavelength, using a microtiter plate reader (Victor 3, PerkinElmer Las, Jügesheim, Germany). Cell viability was calculated as average “(optical density (OD) of wells – OD blank)/average OD of control wells,” and expressed as a percentage (%).

2.4. LPS-induced inflammatory model

Cells were seeded into 24-well plates at 7×10^5 cells/well in RPMI 1640, supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS) to study the modulatory effects of PhytoPs and PhytoFs on the PG profile of the human monocytic cell line THP-1. Cells were treated with 50 μ M of the individual PhytoPs and PhytoFs in triplicate ($n = 3$) for 24-h. This concentration was selected based on previous studies that detected plant oxylipins at micromolar quantities in several food matrices, such as flax oil or pea [16,31]. In this regard, although this concentration could exceed the theoretical concentration achieved in target cells (which has not already been described), especially because of the ongoing breakdown of dietary PhytoPs and PhytoFs during gastrointestinal digestion, this experimental design set-up in the present work was utilized to understand the biological potential of the plant oxylipins under consideration. An inflammatory stimulus (100 ng/mL LPS) was then added, and cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ for another 24-h.

2.5. Extraction of prostaglandins from cells and culture medium

The PG profile was determined in the THP-1 cell lysates (5×10^5) and their growth medium. Once the cells and supernatants exposed to 100 ng/mL LPS from *Escherichia coli* 0127:B8 for 24 h were collected, 0.005% BHA (final concentration) was added, and the medium was conserved at –80 °C until the PGs were extracted. Methanol/HCl 200 mM (0.5 mL) was added to 0.5 mL THP-1 growth medium and centrifuged at 10000×g for 5 min to precipitate the serum proteins.

After removing the growth medium, the cells were lysed by incubation with lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, containing 0.005% BHA) for 1-h, on ice. Lysates were centrifuged at 8000×g for 5 min. The supernatants were collected and stored at –80 °C until the extraction of PGs.

Both pre-processed growth medium and cell lysate extracts were first enzymatically hydrolyzed (β -glucuronidase Type HP-2 from *Helix pomatia*), and PGs were extracted according to the procedure already described [48,49]. After hydrolysis, the samples were subjected to a clean-up procedure by solid-phase extraction (SPE) using Strata X-AW cartridges (100 mg/3 mL), following the method described in the literature [48]. Target compounds were eluted with 1 mL of methanol and dried using a SpeedVac concentrator. The concentration of PGs was determined in cell lysates and growth media, and described in both biological matrices and as an addition of both concentrations that constitutes the total PGs synthesized by THP-1 cells.

2.6. UHPLC-QqQ-MS/MS analyses of prostaglandins

The chromatographic resolution of PGs in cell lysates and growth medium was performed by UHPLC coupled to a 6460 QqQ-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), using the set up previously described [48,50], and an ACQUITY BEH C₁₈ column (2.1 × 150 mm, 1.7 μ m pore size) (Waters, MA, USA). The mobile phases used in the chromatographic separation were deionized water/formic acid (99.9:0.1, v/v) (solvent A) and methanol (solvent B) through the gradient scheme (t, %B): (0.00; 60), (7.00; 60), (7.01; 73), (10.00; 73), (10.01; 80), (18.00; 100), (19.00; 100), and (19.01; 60). The flow rate and injection volume were 0.150 mL/min and 20 μ L, respectively. The identification and quantification of PGs were achieved through the analysis of the parent masses and specific fragmentation patterns of 21 PGs (Table 1), which was performed through a mass spectrometry analysis by multiple reaction monitoring (MRM) mode, and the application of electrospray ionization (ESI) in the negative mode and the ion optics settings previously described for these compounds [48,50]. Also, the identification and quantification of the PGs monitored were performed using authentic standards of the PGs referred to in Table 1. The 8-iso prostaglandin F_{2a}-d₄ (contains 4 deuterium atoms at positions 3, 3',

4, and 4') was used as an internal standard because of its similar ionization pattern relative to the PGs. Data acquisition and processing were performed using the MassHunter software version B.08.00 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The concentration of the PGs were calculated according to standard curves that were freshly prepared each day of analysis. Additionally, the limit of quantification (LOQ), calculated as a signal/noise ratio of 10, was set up at 8 pM, which agrees with the LOQ previously reported by Labuschagne et al. for quantifying lipid peroxidation in cellular systems [51].

2.7. Statistical analysis

All treatments and extractions were performed in triplicate ($n = 3$), and the data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical tests were performed at a 5% significance level using the SPSS 24.0 software package (LEAD Technologies, Inc., Chicago, USA). Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA), confirming that the ANOVA requirements were met, especially regarding the normal distribution of the residuals and the homogeneity of variance, through the Kolmogorov–Smirnov (with Lilliefors correction) and Levene tests, respectively. When statistical differences were identified, the variables were compared using Tukey's multiple range test.

3. Results

As mentioned before, this present work aimed at evaluating individual PhytoPs and PhytoFs on their capacity to modulate the PGs response triggered during LPS-induced inflammation in THP-1 monocytic cells. On this aspect, the starting hypothesis was that plant oxylipins are capable of modulating the PGs profile in the course of an inflammatory process.

Presently, in association with this objective, it is well-known that monocytes and macrophages are key elements of the innate immune system and the inflammatory process [52]. Hence, the so-called "THP-1" is a human leukemia monocytic cell line, characterized by a strong correspondence with the monocytic fraction of peripheral blood mononuclear cells, which preserves a robust capacity to synthesize many molecules related to the inflammatory process [53]. Although THP-1 cells may not express matching features relative to primary monocytes and their regulatory mechanisms, they are characterized by their physiological properties, which are characteristic of primary monocytes *in vivo* [54]. Because of this, the THP-1 cell line has widely been used as a model to study the molecular pathways involved in the inflammatory response, and the capacity of food compounds to modulate such pathways, which are strongly linked with the course of many pathophysiological situations [7,55].

3.1. THP-1 human monocytic cell line viability

Before evaluating the capacity of PhytoPs and PhytoFs to modulate inflammation and avoid non-addressed harmful effects of these plant oxylipins on THP-1 cells during the inflammation assay, the cytotoxic effect of PhytoPs and PhytoFs against the human THP-1 cells was assessed. With this objective, an XTT assay was carried out after 24 and 48-h in the presence of decreasing concentrations of the individual PhytoPs, 9-F₁-PhytoP, 9-*epi*-9-F₁-PhytoP, *ent*-16-F₁-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁-PhytoP, *ent*-9-D₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and 9-L₁-PhytoP, and the individual PhytoFs *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST- Δ^{14} -10-PhytoF, *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST- Δ^{10} -13-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST- Δ^{14} -9-PhytoF (100.000, 50.000, 25.000, 5.000, 1.000, 0.200, 0.020, and 0.002 μ M) (Fig. 1).

The results obtained evidenced a minimal modification of the THP-1 cell viability when exposed to high concentrations of individual PhytoPs and PhytoFs. In this regard, the range of concentrations tested for the ten plant oxylipins evaluated did not decrease the viability of THP-1 cells significantly after 24-h, relative to the untreated control, except for *ent*-

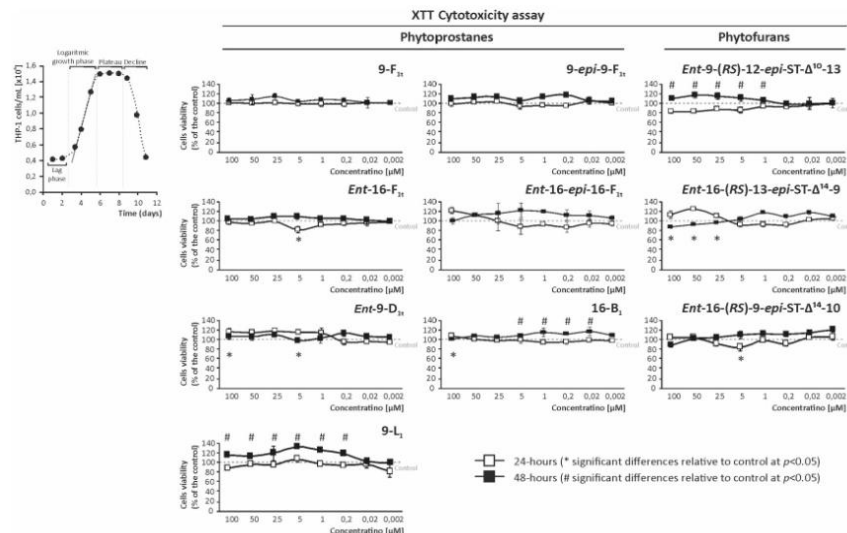


Fig. 1. Cytotoxic activity of phytoprostanes (9-F₁₁-PhytoP, 9-epi-9-F₁₁-PhytoP, ent-16-F₁₁-PhytoP, ent-16-epi-16-F₁₁-PhytoP, ent-9-D₁₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and 9-L₁-PhytoP) and phytofurans (ent-16(RS)-9-epi-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, and ent-16(RS)-13-epi-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF). Cytotoxicity on THP-1 cells (monocyte cell line) of decreasing concentrations of phytoprostanes and phytofurans (100.000, 50.000, 25.000, 5.000, 1.000, 0.200, 0.020, and 0.002 µM) were measured by an XTT assay during the logarithmic grow phase of THP-1 cells. Cytotoxicity is expressed as mean ± SD of the percentage of viability relative to the control at 24 and 48 h. Significant decreases in cell viability relative to control conditions after 24 h were set at $p < 0.05$ (*) and after 48 h at $p < 0.05$ (#).

16-F₁₁-PhytoPs and ent-16(RS)-9-epi-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, which induced a significant reduction in the viability at 5 µM (15.3% lower than the control, on average). When evaluating the cytotoxicity after 48-h, again, no cytotoxic effect was observed. On the contrary, the exposure to high concentrations of PhytoPs and PhytoFs, in general, caused a significant increase in the cells' viability, regarding 16-B₁-PhytoP (5.00–0.02 µM caused an increase of 13.5%, on average), 9-L₁-PhytoP (100.00–0.20 µM caused a rise of 20.5%, on average), and ent-9(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF (100.00–1.00 µM caused an increase of 14.2%, on average) (Fig. 1).

Accordingly, the limited cytotoxic effect attributable to PhytoPs and PhytoFs after 24 and 48-h could be dependent on the structural similarities with the mammal's oxylipins (isoprostanooids) already described at diverse concentrations in human cells, without a deleterious effect at homeostatic concentrations. On the other hand, the promotion of viability induced by a select group of PhytoPs and PhytoFs, mainly after a 48-h exposure for most concentrations, could be related to a diverse capacity of the diverse PhytoPs and PhytoFs to penetrate cells, according to their chemical structure [56]. Moreover, the increase in cell viability could also be influenced by the capacity of PhytoPs and PhytoFs to provide additional biochemical advantages to cells (i.e., contributing to the redox-balance in cells) [56]. In this aspect, regarding PhytoPs and PhytoFs, this hypothesis is in good agreement with previous descriptions on the cytotoxicity of PhytoPs and PhytoFs extracts obtained from *Gracilaria longissima* (edible red algae) by Martínez-Sánchez et al., who reported no cytotoxicity and no effect of cell proliferation nor induction of cell death of intestinal epithelial cells by PhytoPs and PhytoFs at concentrations of up to 50 ng/mL [34].

3.2. Modulation of the inflammatory response-mediated through intracellular prostaglandins by plant oxylipins after LPS-induced inflammation

Once the safe conditions of individual PhytoPs and PhytoFs regarding THP-1 cells were found, the study of their ability to modulate LPS-induced inflammation by monitoring changes in the quantitative PGs profile was initiated. Thus, the capacity to modulate the inflammatory response was monitored by assessing a panel of 21 PGs (Table 1), analyzed in cells and growth medium, and also measured as the sum of intra- and extra-cellular PGs, as both are secreted by cells and provide the complete picture of the PG response. This experimental design allowed providing further insights into the specific inflammatory modulation of individual PhytoPs and PhytoFs by evaluating changes in the intracellular and extracellular concentration of the 7 PGs found in quantifiable amounts in THP-1 cells (15-keto-PGF_{2α}, PGF_{2α}, 11β-PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, PGDM, and PGF_{1α}). Also, this work provides new complementary information with respect to previous descriptions of the biological functions of PhytoPs and PhytoFs, focused on the cytokines profile and/or the phenotype of immune-cells through earlier works which focused on a single plant oxylipin or complete plant extracts of PhytoPs and PhytoFs [30,34,57–61]. In this regard, the use of whole extracts constitutes an approach that allows retrieving valuable results, but is limited in scope. There is still a need for additional experimental inputs for a sound comparison of the anti-inflammatory contribution of the diverse individual plant oxylipins. Indeed, unraveling the biological relevance of the various individual PhytoPs and PhytoFs would allow selecting those plant-based foods that have the adequate quantitative profile for these compounds, according to the diverse pathophysiological conditions, in this case, inflammation. Because of this, it is not surprising that the resulting information on the biological functions, not just regarding plant oxylipins but other bioactive phytochemicals, remains confusing, while a sound scientific proof of the many different

M. Campillo et al.

Free Radical Biology and Medicine 167 (2021) 335–347

protective features attributed to plant-based foods is still mostly incomplete [25,62].

The concentration of the PGs was measured in cell lysates of THP-1 monocytes treated with individual PhytoPs and PhytoFs, as agents that could prevent the inflammation triggered by LPS. Six PGs (15-keto-PGF_{2α}, PGE₂, PGF_{1α}, PGD₂, 11β-PGF_{2α}, and PGDM) were quantified in control (untreated) cells, as well as in cells exposed to LPS, while in LPS-stimulated cells, the presence of PGF_{2α} was also detected at a concentration of 27.76 ng/mL (Fig. 2).

When assessing the effect of the diverse PhytoPs and PhytoFs on the modulation of the concentration of PGF_{2α} induced by LPS, it was observed that almost all compounds (9-F_{1t}-PhytoP, 9-*epi*-9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP, *ent*-9-D_{1t}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF) significantly mitigated the upregulation caused by LPS, providing values ranging between 3.50 and 11.56 ng/mL. On the contrary, 9-L₁-PhytoP caused a significant increase in the intracellular concentration of PGF_{2α}, up to 32.51 ng/mL (Fig. 2).

The THP-1 cells level of 15-keto-PGF_{2α} and PGE₂ (0.018 and 0.033 ng/mL, respectively) increased in LPS-stimulated cells 2.1-fold, on average, to reach 0.038 and 0.062 ng/mL, respectively. The increase of 15-keto-PGF_{2α} (a metabolite of PGF_{2α}) in LPS-stimulated cells was significantly prevented by *ent*-9-D_{1t}-PhytoP, as it diminished its concentration to levels that were not significantly different ($p > 0.05$) than untreated control cells (0.014 ng/mL). However, no PhytoPs or PhytoFs significantly reduced the LPS-induced concentration of PGE₂ (although lowering trends were identified in cells treated with *ent*-9-D_{1t}-PhytoP, 9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF) (Fig. 2). On the other hand, THP-1 cells treated with 9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP, or *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF before exposure to LPS exhibited a significantly higher concentration of 15-keto-PGF_{2α} (0.057, 0.082, and 0.101 ng/mL, respectively) relative to LPS-treated cells, while for PGE₂, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP, and 16-B₁-PhytoP increased its concentration in THP-1 cells by 45.4%, on average (Fig. 2).

In THP-1 cells, it was also observed that PGF_{1α} concentration increased from 0.013 ng/mL (control cells) to 0.063 ng/mL (LPS-exposed cells). With respect to the capacity of PhytoPs and PhytoFs to protect cells against the pro-inflammatory effect of LPS regarding PGF_{1α} concentration, it was found that none of the tested compounds reduced the effect of LPS significantly. However, the presence of 9-*epi*-9-F_{1t}-PhytoP gave rise to a (non-statistically significant) lower concentration (0.040 ng/mL) (Fig. 2). In contrast, some PhytoPs and PhytoFs boosted the LPS-induced increase in the PGF_{1α} concentration, allowing for the detection of significantly augmented amounts (0.112, 0.115, and 0.106 ng/mL for 9-F_{1t}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, respectively) (Fig. 2).

Regarding the presence of PGD₂, whose concentration in control cells (0.024 ng/mL) experienced a significant increase after LPS exposure (0.037 ng/mL), PhytoP 9-D_{1t}-PhytoP diminished the intracellular concentration of PGD₂ induced by LPS and allowed recording a concentration that was even lower than that observed in untreated cells (0.017 ng/mL). Also, 9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF boosted the LPS effect in regard to PGD₂, giving rise to concentrations that were significantly higher than that recorded in LPS exposed cells (0.064, 0.079, 0.051, and 0.103 ng/mL, respectively) (Fig. 2). The trend recorded was related to 11β-PGF_{2α}, the primary metabolite of PGD₂, which was significantly increased in THP-1 cells exposed to LPS up to 0.335 ng/mL (3.3-fold higher concentration than untreated control cells). Again, this polyclonal activator's pro-inflammatory effect on 11β-PGF_{2α} was not prevented by any of the individual PhytoPs and PhytoFs under evaluation. In contrast, 9-F_{1t}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF reinforced the capacity of LPS to increase the cellular concentration of 11β-PGF_{2α} (0.593 ng/mL, on average, 5.9-fold higher than control cells)

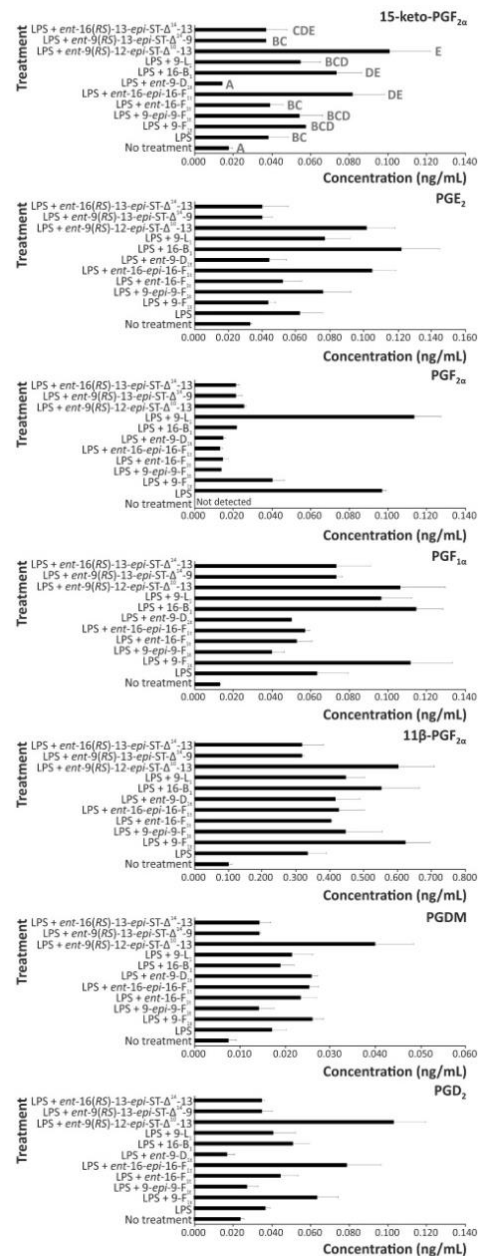


Fig. 2. Effect of individual phytoprostanes and phytofurans treatment of LPS-stimulated THP-1 monocytic cells in intracellular quantitative profile of prostaglandins. Prostaglandins were determined in the whole cell extracts of THP-1 cells pre-exposed to 50 μM of the individual plant oxylipins for 24 h followed by 24 h co-exposure with 100 ng/mL of LPS. Values show mean ± SD (n = 3). Bars with distinct capital letter in each bar-plot were significantly different at $p < 0.05$, according to one-way ANOVA and Tukey's multiple range test.

M. Campillo et al.

Free Radical Biology and Medicine 167 (2021) 335–347

relative to LPS treated cells (Fig. 2).

Moreover, PGDM, a major urinary metabolite of PGD₂ and a biomarker used to assess the endogenous production of PGD₂, was found in untreated THP-1 monocytes, and its concentration increased when treating cells with LPS (0.008 and 0.017 ng/mL, respectively). Once again, most PhytoPs and PhytoFs appeared to be irrelevant in terms of modifying the concentration of PGDM. Still, some of them (9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-9-D_{1t}-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF) worked alongside LPS, contributing to the achievement of significantly higher concentrations (0.026, 0.025, 0.026, and 0.040 ng/mL, respectively).

3.3. Modulation of the inflammatory response-mediated through prostaglandins excreted in the cells' supernatant by plant oxylipins after LPS-induced inflammation

The PG profile in the culture medium of THP-1 monocytes is shown in Fig. 3. The seven PGs found in the cell lysates were also present in the supernatants.

Two out of the seven PGs detected were not found in untreated control cells (PGF_{2α} and its metabolite 15-keto-PGF_{2α}). On the one hand, PGF_{2α} released to the medium was significantly decreased by 9-F_{1t}-PhytoP, 9-D_{1t}-PhytoP, and 16-B_{1t}-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, which once added to the growth medium as a preventive treatment against the pro-inflammatory effect of LPS, mitigated the PGF_{2α} concentration 1.6-fold, on average, in comparison with LPS treated cells (10.263 ng/mL) (Fig. 3); and, on the other, the release of 15-keto-PGF_{2α} in cells treated with almost all individual PhytoPs and PhytoFs was higher than in cells exposed only to LPS, with the exception of *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, which did not show significant differences regarding LPS-treated cells. Therefore, all experimental conditions (LPS plus individual PhytoPs or PhytoFs or LPS alone) allowed describing concentrations in the growth medium (0.021–0.056 ng/mL) that were higher than those found for untreated control cells, in which 15-keto-PGF_{2α} was not detected (Fig. 3).

With respect to the PGE₂ released to the medium, its concentration increase 1.8-fold as a result of LPS exposure (0.309 ng/mL), relative to untreated control cells (0.169 ng/mL) (Fig. 3). All individual PhytoPs and PhytoFs decreased the concentration of PGE₂ in the growth media, with 9-F_{1t}-PhytoP and 9-L_{1t}-PhytoP being the most efficient plant oxylipins regarding this effect, which resulted in concentrations that were even lower than the described in control cells (Fig. 3).

As for PGF_{1α}, the release into the growth media was also increased 10-fold in THP-1 monocytes exposed to LPS (0.091 ng/mL) relative to untreated cells (0.009 ng/mL) (Fig. 3). However, interestingly, some PhytoPs and PhytoFs (*ent*-9-D_{1t}-PhytoP, 16-B_{1t}-PhytoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF) were competent enough to prevent the increased levels induced by LPS, giving rise to concentrations of PGF_{1α} that were significantly lower than those recorded in monocytes exposed to LPS (0.057 ng/mL, on average). Moreover, three PhytoPs enhanced the increasing effect of LPS regarding PGF_{1α}: 9-*epi*-9-F_{1t}-PhytoP (0.117 ng/mL), *ent*-16-F_{1t}-PhytoP (0.117 ng/mL), and especially 9-F_{1t}-PhytoP (0.247 ng/mL) (Fig. 3).

Additionally, the concentration of PGD₂ released into the growth medium strongly increased by LPS exposure (Fig. 3), resulting in a 9.8-fold increase. Four PhytoPs (9-F_{1t}-PhytoP, *ent*-16-F_{1t}-PhytoP, *ent*-9-D_{1t}-PhytoP, and 16-B_{1t}-PhytoP) mitigated the PGD₂ raising-effect of LPS, which increased the amount of PGD₂ released into the medium, giving rise to the average concentration of 0.031 ng/mL. However, for *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, a higher amount of PGD₂ was released into the growth medium (0.163 ng/mL) than the one found in LPS-only exposed cells. *Ent*-16-F_{1t}-PhytoP and *ent*-16-*epi*-16-F_{1t}-PhytoP significantly reduced the concentration of the metabolite of PGD₂ (11β-PGF_{2α}) in THP-1 monocytes growth medium induced by LPS (0.284 ng/mL) and 16-B_{1t}-PhytoP (0.202 ng/mL, on average). At the same time, all three PhytoFs (*ent*-9(RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-

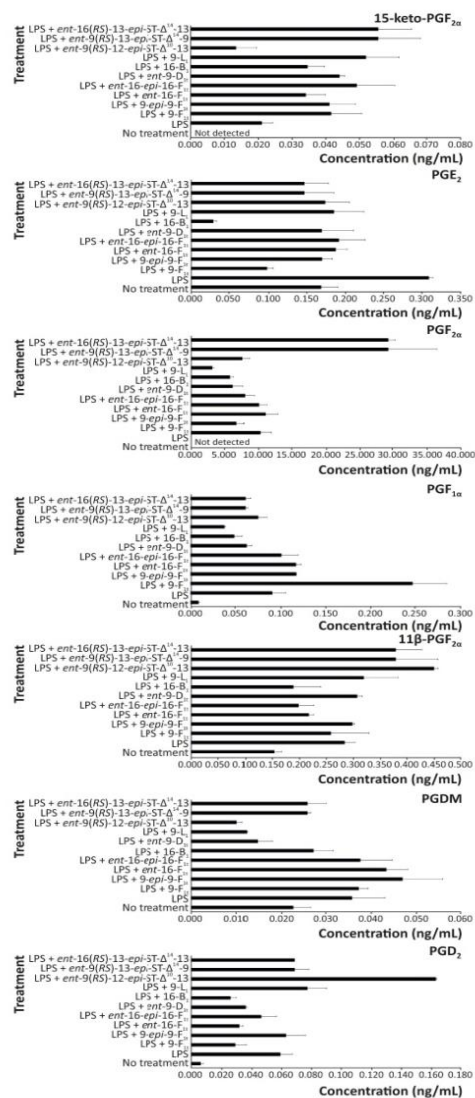


Fig. 3. Effect of individual phytoprostanes and phytofurans treatment of LPS-stimulated THP-1 monocytes cells in prostaglandin release into the growth medium. Prostaglandins were determined in the whole cell extracts of THP-1 cells pre-exposed to 50 μM of the individual plant oxylipins for 24 h followed by 24 h co-exposure with 100 ng/mL of LPS. Values show mean ± SD (n = 3). Bars with distinct capital letter in each bar-plot were significantly different at $p < 0.05$, according to one-way ANOVA and Tukey's multiple range test.

10-PhytoF, and *ent-16(RS)-13-epi-ST- $\Delta^{14,9}$ -PhytoF*) seemed to provide a collaborative stimulus to LPS, augmenting the concentration of 11 β -PGF_{2 α} significantly (0.403 ng/mL, on average) (Fig. 3). When evaluating the evolution of another PGD₂ metabolite (PGDM) due to the treatments applied to THP-1 cells, it was observed that its concentration in the growth medium increased 1.6-fold after exposure to LPS (Fig. 3), although the increase observed was not statistically significant. Two PhytoPs (9-L₁-PhytoP and 16-B₁-PhytoP), and one PhytoF (*ent-9(RS)-12-epi-ST- $\Delta^{10,13}$ -PhytoF*) decreased the amount of PGDM released into the medium, providing final concentrations of 0.015, 0.012, and 0.010 ng/mL, respectively (Fig. 3).

4. Discussion

4.1. Understanding the role of phytoprostanes and phytofurans as modulators of the prostaglandin profile of LPS-stimulated THP-1 monocytes

Although the changes in the intra- and extra-cellular concentrations of PGs as a result of the application of individual PhytoPs and PhytoFs as preventive agents of inflammation could indicate controversial biological activities of the separate compounds, it has to be taken into consideration that both of them are the result of the THP-cells metabolism. Accordingly, this would entail that the diverse human oxylipins monitored in the present work could be characterized by distinct kinetics, not only referring to their synthesis but also their excretion. In this regard, considering the level of these oxylipins as a whole (intra- and extra-cellular accumulative concentrations) would help with the understanding of the actual capacity of individual PhytoPs and PhytoFs to modulate the inflammatory response.

Thus, applying this analytical approach, it was observed that the concentration of the PGs PGE₂ and PGDM were not modified significantly by neither the pro-inflammatory stimulus applied nor by the treatment with individual PhytoPs or PhytoFs (Fig. 4). Also, with respect to the capacity of these compounds to prevent the modulation of the synthesis of PGs induced by LPS, the increase detected for the PGs 15-keto-PGF_{2 α} , PGF_{1 α} , and 11 β -PGF_{2 α} was not reverted by individual PhytoPs or PhytoFs. Indeed, regarding specific PhytoPs and PhytoFs, a biological activity reinforces the increasing trend recorded when applying the pro-inflammatory stimulus. Hence, this was observed for 15-keto-PGF_{2 α} for almost all the PhytoPs and PhytoFs which, although in a non-significant manner, exhibited the capacity to increase the concentration recorded when treating THP-1 cells with LPS by 1.7-fold, on average. A similar trend was observed for PGF_{1 α} and 11 β -PGF_{2 α} for which individual PhytoPs and PhytoFs increased their concentration by up to 2.3 and 1.7-fold, on average, relative to LPS-treated cells (0.077 and 0.310 ng/mL, respectively). Moreover, for these two PGs, the increase was statistically significant ($p < 0.01$) for 9-F_{1 τ} -PhytoP (0.179 ng/mL) and *ent-16(RS)-9-epi-ST- $\Delta^{14,10}$ -PhytoF* (0.527 ng/mL) (Fig. 4). On the contrary, individual PhytoPs and PhytoFs were competent for mitigating the increase of specific PGs induced by LPS. In this regard, the increased induced on the PGF_{2 α} concentration was significantly prevented by *ent-16-epi-16-F_{1 τ} -PhytoP*, *ent-9-D_{1 τ} -PhytoP*, 16-B₁-PhytoP, *ent-16(RS)-9-epi-ST- $\Delta^{14,10}$ -PhytoF*, and *ent-16(RS)-13-epi-ST- $\Delta^{14,9}$ -PhytoF*, which restored values that were not significantly different relative to untreated controls (Fig. 4). Similarly, concerning PGD₂, although most of the PhytoPs evaluated did not provide a significant mitigation of the pro-inflammatory changes induced by LPS, *ent-9-D_{1 τ} -PhytoP* reduced its level down to values found in the untreated control. Regarding PGD₂, it is important to notice that again *ent-16(RS)-9-epi-ST- $\Delta^{14,10}$ -PhytoF* reinforced the increase induced by LPS, giving rise to even significantly higher concentrations (0.133 ng/mL) (Fig. 4).

The biological activities of PhytoPs and PhytoFs have been suggested based on their structural similarity with mammal oxylipins derived from arachidonic acid (C20:4, n-6, AA) (isoprostanes and prostaglandins) that have important biological functions [63]. In this regard, to date, the

bioactivity of PhytoPs and, to a lower extent, of PhytoFs, has been described mainly for their immunomodulatory power [57–59,61,64–67], anti-cancer activity [68], and anti-inflammatory potential [34,61,69–72]. However, despite these studies, the current knowledge on these compounds' biological functions is still scarce, being restricted to assessing whole plant-extracts and, in marginal cases, some individual PhytoPs (e.g., 16-E₁-PhytoP). At the same time, there continues to be a gap of information concerning the biological interest of most PhytoPs and PhytoFs described so far.

In this scenario, the current availability of a wide range of synthesized individual PhytoPs and PhytoFs [42–47] has allowed new experimental designs that will somehow contribute to clarify the biological functions of these plant oxylipins, providing valuable information that can complete the current knowledge generated. Regarding the diverse aspects raised, one that needs to be addressed is the capacity of PhytoPs and PhytoFs to modulate the concentration of mammal isoprostanoids. This is of particular relevance because of the role of mammal isoprostanoids in an array of pathophysiological events, namely immunomodulation, vasoconstriction, platelet activation, and anti-aggregation, smooth muscle contraction of bronchi, and anti-inflammatory and apoptosis-inducing properties [73]. Therefore, describing the capacity of PhytoPs and PhytoFs to modulate the PG level during inflammation would allow for a better understanding of the current biological interest of plant oxylipins.

As for the immunomodulatory capacity already demonstrated by PhytoPs, this has been attributed to the structural analogy with human isoprostanoids (e.g., 16-E₁-PhytoP vs PGE₂) (Traidl-Hoffmann et al., 2005). This structural similarity allows 16-E₁-PhytoP to mimic the functionality of PGE₂, thus inhibiting the production of interleukin (IL)-12 by dendritic cells and the activation of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ) dependent mechanisms, that in turn cause the inhibition of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell (NF- κ B) [57,58]. Interestingly, these pathways are also involved in inflammation, and could indicate that the modulation of PG level achieved when exposed to a pro-inflammatory stimulus (Figs. 2 and 3) could be related to an anti-inflammatory effect of PhytoPs and PhytoFs.

Indeed, aside from the immunomodulatory competences, human isoprostanoids have also been explicitly associated to anti-inflammatory activity due to the presence of an A-, J-, or deoxy-J-ring systems in their structure [70]. Thus, the presence of these reactive groups (hydroxyl and keto groups) on the cyclopentenone ring, and additional electrophilic properties enclosed in the chemical structure of PhytoPs and PhytoFs, have prompted the evaluation of coincident bioactivities on the modulation of inflammation by these plant oxylipins. In this respect, the assessment of diverse PhytoPs on anti-inflammatory functions has allowed pointing out the 9 and 16 series of the PhytoPs A₁, B₁, and deoxy-J₁, as those with the anti-inflammatory potential [69], which has been attributed to their structural analogy with the mammal's PGA₁ and deoxy-PGJ₂ [71].

In the sequence of these previous characterizations, the present work describes the capacity of individual PhytoPs and PhytoFs to modulate the PG profile in a pro-inflammatory environment *in vitro*, using LPS-stimulated THP-1 monocytes. Inflammatory mediators derived from COX-2 (Table 1) were measured through a targeted metabolomic approach. In this regard, the PG profile of LPS-stimulated monocytes was characterized by an increased concentration of seven PGs and their metabolites (15-keto-PGF_{2 α} , PGF_{2 α} , 11 β -PGF_{2 α} , PGE₂, PGD₂, PGDM, and PGF_{1 α}), tentatively as a result of COX-2 up-regulation [74]. Considering the short half-life of primary PGs, in the present study, some PG conjugates were also monitored after an enzymatic hydrolysis that breaks down the glucuronide moieties present in PGs [75], thus determining all isoprostanoids present in cells lysates and supernatants and avoiding underestimations of their concentration [48].

The infection of cells by microorganisms activates the inflammatory response due to the recognition of the LPS present in the microbial wall

M. Campillo et al.

Free Radical Biology and Medicine 167 (2021) 335–347

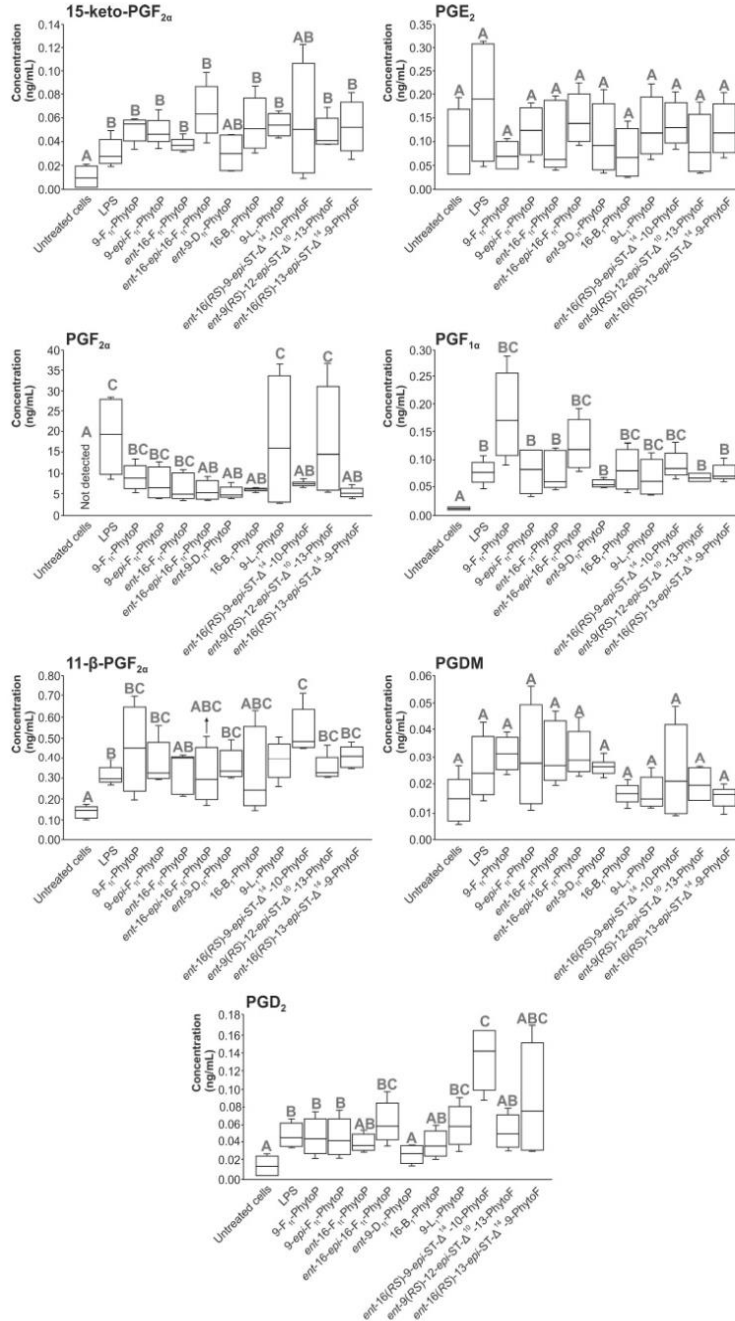


Fig. 4. Box plots with quartiles (upper values 75%, median 50%, and lower values 25%) of the effect of phytoconstanes and phytofurans on total (intracellular plus extracellular) prostaglandins THP-1 cells *in vitro* pre-exposed to 50 μM of individual plant oxylipins for 24-h, followed by 24-h treatment with 100 ng/mL of LPS. Boxes with a different capital letter within each plot are statistically different at $p < 0.05$ according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple range test.

by receptors of immune cells [2], which results in an overproduction of inflammatory mediators. Namely, PGE₂, which is synthesized from PGH₂ (formed from AA by COX-2), with the participation of various PG synthases [74] (Fig. 5), has versatile biological activities related to the inflammation process depending on binding to different E-prostanoid (EP) receptors (EP1, EP2, EP3, and EP4) [76], and specifically in monocytes [77]. The participation of PGE₂ in inflammation has been described as having a multifaceted role. This involves pro-inflammatory biological effects during the initial phases of the inflammatory process, including cell recruiting, activation, and proliferation, apoptosis, angiogenesis, and enhancement of immune cell surveillance, and augmenting sensory nerves to increase the pain response [78]. Besides, PGE₂ also controls mechanisms related to the resolution of inflammation in subsequent phases by acting as an immunosuppressive agent with respect to the cytokines and chemokines profiles expressed by immune cells (IL-12, IL-12p40, IFN- γ , and TNF- α , among others), as well as the expression level of their cognate receptors [79]. This anti-inflammatory effect is of special relevance in monocytes. In this cell population, PGE₂ triggers the inhibitory production of the chemokines responsible for the chemo-attraction of naïve T cells (CCL19), thus interfering with the activation of effector T cells [80].

The results obtained in the present work evidenced a multidimensional modulation of intracellular PGE₂ and release into the growth medium. Thus, in the presence of specific PhytoPs and PhytoFs (9-F₁₁-PhytoP, *ent*-9-D₁₁-PhytoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST- Δ ¹⁴-10-PhytoF, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST- Δ ¹⁰-13-PhytoF) in the medium, found a non-significant decrease ($p > 0.05$), of this PG (Fig. 2). In this respect, diverse *in vivo* studies have demonstrated that this effect could be due to an inhibition of COX-2, which entails the subsequent decrease of the PGE₂ concentration [74], preventing the pro-inflammatory signaling cascade triggered by this PG [57,58]. Alternatively, some PhytoPs induced a significant increase in PGE₂ in THP-1 cells (*ent*-16-F₁₁-PhytoP and 16-B₁-PhytoP), which suggests specific, or even reverse, activities of the diverse plant oxylipins on the PGE₂ metabolism, probably affecting the activity of PGE₂ synthase and COX-2 in many ways [81]. Also, this modulatory activity was not precisely equal when considering intracellular levels and the concentration in the growth medium as a result of PGE₂, which could be due to the time window required for the biological

activity of the diverse PhytoPs and PhytoFs, depending on the signaling route or molecular targets [82]. This result would suggest that PhytoPs and PhytoFs, through a multifaceted capacity to modulate of PGE₂, could be involved in the modification of the blood vessels wall permeability and thus, on the formation of edemas and the infiltration of leukocytes, during the different phases of the inflammatory process [83]. Interestingly the analysis of the additive (intra- and extra-cellular concentrations of PGE₂) did not reproduce the significant differences observed when analyzing both fractions separately, which reinforces the idea on the relevance of the kinetics of synthesis of this PG and the effect of the separate PhytoPs and PhytoFs in specific phases of the inflammatory process.

Mammal PGE₂, through the action of PGE₂ 9-keto-reductase, is reduced to obtain PGF_{2 α} , which in turn, can also be synthesized from PGH₂ as a result of a reduction catalyzed by PGH₂ endoperoxide-reductase [84] (Fig. 5). Therefore, PGF_{2 α} is involved in creating the inflammatory environment by influencing the synthesis and secretion of IL1 β , IL6, IL8, and TNF α [85]. PGF_{2 α} was neither detected in THP-1 cells nor released to the growth medium under control conditions, while after exposure to LPS, it was found in quantifiable concentrations in both cases (Figs. 2 and 3). The decreased concentration of PGF_{2 α} induced by specific PhytoPs and PhytoFs (9-F₁₁-PhytoP, *ent*-9-D₁₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, 9-L₁-PhytoP, and *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST- Δ ¹⁰-13-PhytoF) could be attributed to a decreased synthesis of PGE₂ according to the above referred potential mechanisms of action [81] or even to the inhibition of the enzymatic routes responsible for its formation from PGE₂ or PGH₂ upon their capacity to interact with the complex network of substrates or enzymes characterized by a high sequence homology such as the PGF synthases AKR1C2 and AKR1C3, among others [86]. This trend was even stronger when considering the PGF_{2 α} released into the growth media, where almost all PhytoPs and PhytoFs mitigated the concentration of this PG. This is of particular relevance concerning 9-L₁-PhytoP, which surprisingly exhibited the most potent capacity to increase the intracellular level of PGF_{2 α} , while regarding the amount of this PG released to the growth medium, it appeared as the most potent compound in decreasing the concentration of PGF_{2 α} in the THP-1 growth medium. This finding reinforces the idea of existing specific time windows for the separate biological action of the plant oxylipins.

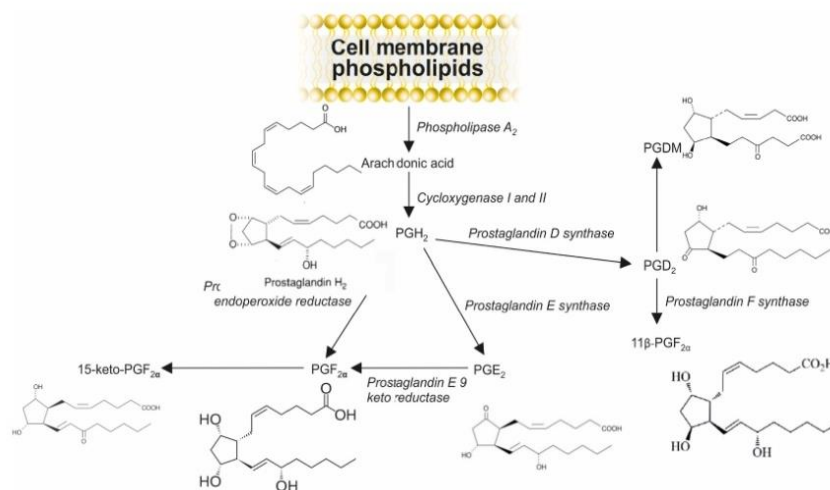


Fig. 5. Metabolic pathways affecting the prostaglandins-profile assessed in LPS-stimulated monocytes (THP-1 cell line) pre-exposed to phytoprostanes (9-F₁₁-PhytoP, 9-*epi*-9-F₁₁-PhytoP, *ent*-16-F₁₁-PhytoP, *ent*-16-*epi*-16-F₁₁-PhytoP, *ent*-9-D₁₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and 9-L₁-PhytoP) and phytofurans (*ent*-16(RS)-9-*epi*-ST- Δ ¹⁴-10-PhytoF, *ent*-9(RS)-12-*epi*-ST- Δ ¹⁰-13-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST- Δ ¹⁴-9-PhytoF).

PGF_{2α} is, in turn, metabolized to 15-keto-PGF_{2α} (Fig. 5), which is characterized by an anti-inflammatory activity developed by wounding-activated chemical defense molecules [87]. The upregulation of the intracellular concentration of 15-keto-PGF_{2α} induced by specific PhytoPs and PhytoFs (*ent*-16-*epi*-16-F_{1r}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and *ent*-9 (RS)-12-*epi*-ST-Δ¹⁴-13-PhytoF), or downregulation (*ent*-9-D_{1r}-PhytoP), contrasted with the almost constant increase of 15-keto-PGF_{2α} released caused by nearly all plant oxylipins, which is in good agreement with the cumulative significance of this result. Hence, this outcome strongly suggests the anti-inflammatory potential of PhytoPs and PhytoFs, according to the biological functions described for 15-keto-PGF_{2α} [87].

PGF_{1α}, a PG derived from dihomo-γ-linolenic acid, was found in THP-1 cells lysate, and the growth medium of LPS stimulated monocytes. Although neither individual PhytoPs nor PhytoFs exhibited the capacity to mitigate the increase in the intracellular concentration of PGF_{1α}, its release into the growth medium was significantly diminished by 9-L₁-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF, and *ent*-16 (RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF (Figs. 2 and 3). However, the joint analysis of the intra- and extracellular levels performed to provide information on the total synthesis of this PG as a result of the treatments monitored, did not confirm the capacity of PhytoPs and PhytoFs to modulate its status, which again, could be related to the ability of these compounds to take part in specific phases of the inflammatory process.

PGD₂, which was also detected in THP-1 monocytes, is closely involved in the course and resolution of inflammation. In this regard, PGD₂ is synthesized from PGH₂ by prostaglandin D-synthase and metabolized into several metabolites, including 11β-PGF_{2α} and PGDM, which maintain the pro- and anti-inflammatory characteristics described above for PGE₂ in the diverse phases of the inflammatory process [88]. The biological interest of PGD₂ regarding inflammation is found in its capacity to activate the PPAR-γ receptor by itself and by its metabolites, thus contributing to the resolution of inflammation [88]. A similar response of PGD₂ and 11β-PGF_{2α} was observed in both THP-1 cells and growth medium treated with individual PhytoPs and PhytoFs as modulatory agents of the inflammation induced by LPS (Figs. 2 and 3). PGD₂ is a structural isomer of PGE₂, and this could be responsible for the opposite response of PGD₂ and its metabolites relative to PGE₂, within the frame of the specific PG profile and metabolism of monocytes [89], as a specific modulatory action of the separate PhytoPs and PhytoFs.

5. Conclusions

As natural modulators of biological processes, the phytochemical compounds present in plant-based foods could be responsible for their anti-inflammatory properties. However, at present, there is still an open discussion on their competence to improve human health, in this case, regarding inflammation. Thus, concerning the newly-described class of secondary metabolites (PhytoPs and PhytoFs), specific compounds within this family (*ent*-16-*epi*-16-F_{1r}-PhytoP, *ent*-9-D_{1r}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF, and *ent*-16(RS)-13-*epi*-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF) showed, in addition to an absence of cytotoxicity on THP-1 monocytic cells, a valuable anti-inflammatory potential by modulating, *in vitro*, at 50 μM, the intracellular level of key PGs (15-keto-PGF_{2α}, PGF_{2α}, PGE₂, PGF_{1α}, PGD₂, and PGDM in THP-1 cells), mediators of the inflammatory process, as well as their release into the growth medium. Although this concentration could exceed the level obtained in target cells (almost unexplored) this preliminary study will enable the future discovery of the biological potential of the bioaccessible and bioavailable fraction of the target compounds, in respect to specific pathophysiological conditions. However, both intra- and extra-cellular PGs in an additive form restrict the significant capacity to modulate the quantitative PG profile to PGF_{2α} (*ent*-16-*epi*-16-F_{1r}-PhytoP, *ent*-9-D_{1r}-PhytoP, and 16-B₁-PhytoP), PGD₂ (9-D_{1r}-PhytoP and *ent*-16(RS)-9-*epi*-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF), and 15-*epi*-15-F_{2r} (*ent*-16-*epi*-16-F_{1r}-PhytoP, *ent*-9-D_{1r}-PhytoP, 16-B₁-PhytoP, and 9-L₁-PhytoP), suggesting that the

different individual PhytoPs and PhytoFs could act in diverse phases of the inflammatory process, characterized by the diverse quantitative profile of PGs according to their custom synthesis kinetic. Indeed, according to these results, the capacity of PhytoPs and PhytoFs to modulate the synthesis and overall level of PGs in the diverse phases of the inflammatory process needs to be further explored to understand their actual relevance as modulators of this pathological event. Also, as these plant oxylipins are present in a wide variety of plant-based foods, according to current knowledge, the unraveling of their anti-inflammatory potential is of high value in order to shed some light on the relative contribution of the separate bioactive components of these foods, *in vivo*, that would allow selecting the most beneficial compounds according to their quantitative profile of PhytoPs and PhytoFs. The findings described in the present work, regarding the capacity of individual PhytoPs and PhytoFs to restore the homeostasis of PGs in a pro-inflammatory environment, contribute to overcoming a critical limitation of studies with vegetable extracts that do not allow identifying the specific molecule/s displaying anti-inflammatory activities. On the other hand, the identification of the individual PhytoPs and PhytoFs responsible for specific bioactivities would allow extracting conclusions on the structure-activity relationship for this family of compounds and making suggestions on the possible mechanism of action of the individual PhytoPs and PhytoFs. These outcomes demonstrate the potential anti-inflammatory effects of specific PhytoPs and PhytoFs; however, based on these results, further mechanistic *in vitro* studies and *in vivo* experiments are needed to elucidate the operative character of the bioaccessible and bioavailable fractions of these compounds, and the involvement of the diverse cytokines and chemokines that co-participate in the inflammatory response.

Acknowledgments

This work was partially funded by the "Fundación Séneca de la Región de Murcia" Grupo de Excelencia 19900/GERM/15, and the Spanish project AGL2017-83386-R from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities. This work is included in the framework of the collaboration between the Spanish Research Council (CEBAS-CSIC) and CNRS-University of Montpellier, as "Projets Internationaux de Coopération Scientifique" (PICS-2015-261141). The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] B. Allam-Ndoul, F. Guénard, O. Barbier, M.C. Vohl, Effect of different concentrations of omega-3 fatty acids on stimulated THP-1 macrophages, *Genes Nutr* 12 (2017) 7, <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0554-6>.
- [2] O. Takeuchi, S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation, *Cell* 140 (2010) 805–820, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- [3] C.E. Mazzucco, G. Warr, Trichodimerol (BMS-182123) inhibits lipopolysaccharide-induced eicosanoid secretion in THP-1 human monocytic cells, *J. Leukoc. Biol.* 60 (1996) 271–277, <https://doi.org/10.1002/jlb.60.2.271>.
- [4] S. Medina, R. Domínguez-Perles, D.A. Moreno, C. García-Viguera, F. Ferreres, J. I. Gil, A. Gil-Izquierdo, The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans, *Food Chem.* 173 (2015), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.152>.
- [5] R. Domínguez-Perles, A. Gil-Izquierdo, F. Ferreres, S. Medina, Update on oxidative stress and inflammation in pregnant women, unborn children (nasciturus), and newborns - nutritional and dietary effects, *Free Radic. Biol. Med.* 142 (2019) 38–51, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.013>.
- [6] N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar, The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols, *Nutrients* 10 (2018) 1618, <https://doi.org/10.3390/nu10111618>.
- [7] O.J. Lara-Guzmán, Á. Gil-Izquierdo, S. Medina, E. Osorio, R. Álvarez-Quintero, N. Zuluaga, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, K. Muñoz-Durango, Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages, *Redox Biol* 15 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.017>.
- [8] C. Andrade, F. Ferreres, N.G.M. Gomes, S. Duangrisai, N. Srisombat, S. Vajrodaya, D.M. Pereira, A. Gil-Izquierdo, P.B. Andrade, P. Valentin, Phenolic profiling and biological potential of Ficus curtipes corner leaves and stem bark: 5-lipoxygenase inhibition and interference with NO levels in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, *Biomolecules* 9 (2019), <https://doi.org/10.3390/biom9090400>.

- [9] M. Queiroz, D. Oppolzer, I. Gouvêas, A.M. Silva, A.L.R.N.A. Barros, R. Domínguez-Perles, New grape stems' isolated phenolic compounds modulate reactive oxygen species, glutathione, and lipid peroxidation in vitro: combined formulations with vitamins C and E, *Fitoterapia* 120 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.010>.
- [10] E.A. Miles, P. Zoubouli, P.C. Calder, Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures, *Nutrition* 21 (2005) 389–394, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.06.031>.
- [11] D.X. Hou, D. Luo, S. Tanigawa, F. Hashimoto, T. Uto, S. Masuzaki, M. Fujii, Y. Sakata, Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF- κ B pathway, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 742–751, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.006>.
- [12] D.X. Hou, S. Masuzaki, F. Hashimoto, T. Uto, S. Tanigawa, M. Fujii, Y. Sakata, Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-activated mouse macrophages: molecular mechanisms and structure-activity relationship, *Arch. Biochem. Biophys.* 460 (n.d.) 67–74, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.01.009>.
- [13] S. Parchmann, M.J. Mueller, Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32650–32655, <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32650>.
- [14] C. Cuyamendous, K.S. Leung, T. Durand, J.C.-Y. Lee, C. Oger, J.-M. Galano, Synthesis and discovery of phytofurans: metabolites of alpha-linolenic acid peroxidation, *Chem. Commun.* 51 (2015) 15696–15699, <https://doi.org/10.1039/c5cc05736a>.
- [15] J. Collado-González, T. Durand, F. Ferreres, S. Medina, A. Torrecillas, Á. Gil-Izquierdo, Phytofurans, *Lipid Technol.* 27 (2015) 127–130, <https://doi.org/10.1002/lite.201500020>.
- [16] M.C. García-García, M. del Río Celestino, Á. Gil-Izquierdo, C. Egea-Gilbert, J. M. Galano, T. Durand, C. Oger, J.A. Fernández, F. Ferreres, R. Domínguez-Perles, The value of legume foods as a dietary source of phytofurans and phytofurans is dependent on species, variety, and growing conditions, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 121 (2019), <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800484>, 1800484.
- [17] R. Domínguez-Perles, I. Sánchez-Martínez, M.D. Rodríguez-Hernández, I. López-González, C. Oger, A. Guy, T. Durand, J.M. Galano, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Optimization of free phytofurans and phytofurans production by enzymatic hydrolysis of pea extracts using esterases, *J. Agric. Food Chem.* 68 (2020) 3445–3455, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06624>.
- [18] A.M. Carrasco-Del Amor, E. Aguayo, J. Collado-González, A. Guy, J.-M. Galano, T. Durand, A. Gil-Izquierdo, Impact of packaging atmosphere, storage and processing conditions on the generation of phytofurans as quality processing compounds in almond kernels, *Food Chem.* 211 (2016) 869–875, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.132>.
- [19] A.M. Carrasco-Del Amor, E. Aguayo, J. Collado-González, A. Guy, J.-M. Galano, T. Durand, A. Gil-Izquierdo, Impact of processing conditions on the phytofurans profile of three types of nut kernels, *Free Radic. Res.* 51 (2017) 141–147, <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1288909>.
- [20] J. Collado, A. Moriana, I. Giron, M. Corell, S. Medina, T. Durand, A. Guy, J.-M. Galano, E. Valero, T. Garrigues, F. Ferreres, F. Moreno, A. Torrecillas, The phytofurans content in green table olives is influenced by Spanish-style processing and regulated deficit irrigation, *Leb. Und-Technologie* 64 (2015) 997–1003, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.005>.
- [21] J. Collado-González, C. Grosso, P. Valentao, P.B. Andrade, F. Ferreres, T. Durand, A. Guy, J.-M. Galano, A. Torrecillas, A. Gil-Izquierdo, Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by Spanish extra virgin olive oils: the involvement of bioactive compounds other than oleuropein and hydroxytyrosol, *Food Chem.* 235 (2017) 298–307, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.171>.
- [22] J. Collado, D. Pérez López, H. Memmi, M. Gijón, S. Medina, T. Durand, A. Guy, J.-M. Galano, D. Fernández, F. Carro, F. Ferreres, A. Torrecillas, Effect of the season on the free phytofurans content in Cornicabra extra virgin olive oil from deficit-irrigated olive trees, *J. Sci. Food Agric.* 96 (2016) 1585–1592, <https://doi.org/10.1002/jsfa.7259>.
- [23] S. Medina, J. Collado, F. Ferreres, J. Londoño, C. Jiménez-Cartagena, A. Guy, T. Durand, J.-M. Galano, A. Gil-Izquierdo, Valorization strategy of banana passion fruit shell wastes: an innovative source of phytofurans and phenolic compounds and their potential use in pharmaceutical and cosmetic industries, *J. Food Nutr. Res.* 5 (2017), <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-11-2>.
- [24] J. Collado, E. Aguayo, A. Guy, J.-M. Galano, T. Durand, Phytofurans in almonds: identification, quantification, and impact of cultivar and type of cultivation, *RSC Adv.* 5 (2015) 51233–51241, <https://doi.org/10.1039/C5RA07803B>.
- [25] S. Medina, J. Collado-González, F. Ferreres, J. Londoño-Londono, C. Jiménez-Cartagena, A. Guy, T. Durand, J.-M. Galano, A. Gil-Izquierdo, Quantification of phytofurans - bioactive oxylipins - and phenolic compounds of *Passiflora edulis* Sims shell using UHPLC-QqQ-MS/MS and LC-IT-DAD-MS/MS, *Food Chem.* 229 (2017) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.049>.
- [26] D. León-Pérez, S. Medina, J. Londoño-Londono, M. Cano-Lamadrid, A. Carbonell-Barrachina, T. Durand, A. Guy, C. Oger, J.-M. Galano, F. Ferreres, C. Jiménez-Cartagena, J. Restrepo-Osorno, A. Gil-Izquierdo, Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phytofurans and phytofurans contents, *Food Chem.* 280 (2019) 231–239, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.072>.
- [27] M. Pinciroli, R. Domínguez-Perles, M. Garbí, A. Abellán, C. Oger, T. Durand, J. M. Galano, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Impact of salicylic acid content and growing environment on phytofurans and phytofurans (stress biomarkers) in *oryza sativa* L., *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 12561–12570, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04975>.
- [28] M. Pinciroli, R. Domínguez-Perles, Á. Abellán, V. Bultel-Poncé, T. Durand, J.-M. Galano, F. Ferreres, Statement of foliar fertilization impact on yield, composition, and oxidative biomarkers in rice, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2018), <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05808>.
- [29] M. Pinciroli, R. Domínguez-Perles, A. Abellán, A. Guy, T. Durand, C. Oger, J. M. Galano, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Comparative study of the phytofurans and phytofurans content of indica and japonica rice (*oryza sativa* L.) flours, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017), <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03482>.
- [30] L.L. Pino Ramos, F. Jiménez-Aspee, C. Theoduloz, A. Burgos-Edwards, R. Domínguez-Perles, C. Oger, T. Durand, A. Gil-Izquierdo, L. Bustamante, C. Mardones, K. Marquez, D. Contreras, G. Schmieda-Hirschmann, Phenolic, oxylipin and fatty acid profiles of the Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*): antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes, *Food Chem.* 298 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125026>, 125026.
- [31] R. Domínguez-Perles, A. Abellán, D. León, F. Ferreres, A. Guy, C. Oger, J. M. Galano, T. Durand, A. Gil-Izquierdo, Sorting out the phytofurans and phytofurans profile in vegetable oils, *Food Res. Int.* 107 (2018) 619–628, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.013>.
- [32] S. Medina, J. Collado-González, F. Ferreres, J. Londoño-Londoño, C. Jiménez-Cartagena, A. Guy, T. Durand, J.-M. Galano, Á. Gil-Izquierdo, Potential of *Physalis peruviana* calyces as a low-cost valuable resource of phytofurans and phenolic compounds, *J. Sci. Food Agric.* 99 (2019) 2194–2204, <https://doi.org/10.1002/jsfa.9413>.
- [33] J. Marhuenda, S. Medina, A. Díaz, P. Martínez-Hernández, S. Arina, P. Zafrilla, J. Mulero, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, F. Ferreres, Dependency of phytofurans fingerprints of must and wine on viticulture and enological processes, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2015) 9022–9028, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03365>.
- [34] S. Martínez-Sánchez, R. Domínguez-Perles, S. Montoro, J.A. Gabaldón Hernández, A. Guy, T. Durand, C. Oger, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Bioavailable phytofurans and phytofurans from *Gracilaria longissima* have anti-inflammatory effects in endothelial cells, *Food Funct.* (2020), <https://doi.org/10.1039/D0FO00976H>.
- [35] M. Barbosa, J. Collado, P. Andrade, F. Ferreres, P. Valentao, J.-M. Galano, T. Durand, Non-enzymatic α -linolenic acid derivatives from the sea: macroalgae as novel sources of phytofurans, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 6466–6474, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01904>.
- [36] J. Collado, M. Cano-Lamadrid, D. Pérez López, Á. Carbonell-Barrachina, A. Centeno, S. Medina, I. Grinana, A. Guy, J. Galano, T. Durand, R. Domínguez-Perles, A. Torrecillas, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Effects of deficit irrigation, rootstock, and roasting on the contents of fatty acids, phytofurans, and phytofurans in pistachio kernels, *J. Agric. Food Chem.* (2020), <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02901>.
- [37] L. Lipan, J. Collado-González, R. Domínguez-Perles, M. Corell, V. Bultel-Poncé, J.-M. Galano, T. Durand, S. Medina, A. Gil-Izquierdo, Á. Carbonell-Barrachina, Phytofurans and phytofurans—oxidative stress and bioactive compounds—in almonds are affected by deficit irrigation in almond trees, *J. Agric. Food Chem.* 68 (2020) 7214–7225, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02266>.
- [38] D. León-Pérez, R. Domínguez-Perles, J. Collado-González, M. Cano-Lamadrid, T. Durand, A. Guy, J.-M. Galano, Á. Carbonell-Barrachina, J. Londoño-Londoño, F. Ferreres, C. Jiménez-Cartagena, Á. Gil-Izquierdo, S. Medina, Bioactive plant oxylipins-based lipidomics in eighty worldwide commercial dark chocolates: effect of cocoa and fatty acid composition on their dietary burden, *Microchem. J.* 157 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105083>, 105083.
- [39] S. Medina, I. Abu-Reidah, T. Durand, V. Bultel-Poncé, J.-M. Galano, R. Domínguez-Perles, Evaluation of Phoenix dactylifera edible parts and by-products as sources of phytofurans and phytofurans, *J. Agric. Food Chem.* (2020), <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03364>, XXXX.
- [40] J. Collado-González, D. Pérez-López, H. Memmi, M.C. Gijón, S. Medina, T. Durand, A. Guy, J.-M. Galano, F. Ferreres, A. Torrecillas, A. Gil-Izquierdo, Water deficit during pit hardening enhances phytofurans content - plant biomarker of oxidative stress- in extra virgin olive oil, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 3784.
- [41] S. Medina, A. Gil-Izquierdo, T. Durand, F. Ferreres, R. Domínguez-Perles, Structural/Functional Matches and Divergences of Phytofurans and Phytofurans with Bioactive Human Oxylipins, Antioxidants, Basel, Switzerland, 2018, p. 7, <https://doi.org/10.3390/antiox7110165>.
- [42] S. El Fanguour, A. Guy, V. Despres, J.-P. Vidal, J.-C. Rossi, T. Durand, Total synthesis of the eight diastereomers of the syn-anti-syn phytofurans F1 types I and II, *J. Org. Chem.* 69 (2004) 2498–2503, <https://doi.org/10.1021/jo035638i>.
- [43] S. El Fanguour, A. Guy, J.-P. Vidal, J.-C. Rossi, T. Durand, A flexible synthesis of the phytofurans B1 type I and II, *J. Org. Chem.* 70 (2005) 989–997, <https://doi.org/10.1021/jo048179+>.
- [44] A. Guy, S. Flanagan, T. Durand, C. Oger, J.-M. Galano, Facile synthesis of cyclopentenone B1- and L1-type Phytofurans, *Front. Chem.* 3 (2015) 41, <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00041>.
- [45] E. Pinot, A. Guy, A. Fournial, L. Balas, J.-C. Rossi, T. Durand, Total synthesis of the four enantiomerically pure diastereoisomers of the phytofurans E1Type II and of the 15-e2-isoprostanes, *J. Org. Chem.* 73 (2008) 3063–3069, <https://doi.org/10.1021/jo702455g>.
- [46] C. Cuyamendous, A. de la Torre, Y.Y. Lee, K.S. Leung, A. Guy, V. Bultel-Poncé, J.-M. Galano, J.C.-Y. Lee, C. Oger, T. Durand, The novelty of phytofurans, isofurans, dihomoisofurans and neurofurans discovery, synthesis and potential application, *Biochimie* 130 (2016) 49–62, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.08.002>.

- [47] C. Cuyamendous, K.S. Leung, V. Bultel-Poncé, A. Guy, T. Durand, J.-M. Galano, J. C.-Y. Lee, C. Oger, Total synthesis and *in vivo* quantitation of phytofurans derived from α -linolenic acid, *Eur. J. Org. Chem.* 2017 (2017) 2486–2490, <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700270>.
- [48] S. Medina, R. Domínguez-Perles, J.I. Gil, F. Ferreres, C. García-Viguera, J. M. Martínez-Sanz, A. Gil-Izquierdo, A 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 Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012), <https://doi.org/10.1002/rcm.6224>.
- [49] S. Medina, R. Domínguez-Perles, R. Cejuela-Anta, D. Villano, J.M. Martínez-Sanz, P. Gil, C. García-Viguera, F. Ferreres, J.I. Gil, A. Gil-Izquierdo, Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes, *Prostag. Other Lipid Mediat.* 99 (2012), <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.07.002>.
- [50] L.A. García-Flores, S. Medina, C. Gomez, C.E. Wheelock, R. Cejuela, J.M. Martínez-Sanz, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, A. Hernandez-Saez, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Aronia-citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: a lipidomic approach using representative oxylipins in urine, *Food Funct* 9 (2018) 463–475, <https://doi.org/10.1039/c7fo01409k>.
- [51] C.F. Labuschagne, N.J.F. van den Broek, P. Postma, R. Berger, A.B. Brenkman, A protocol for quantifying lipid peroxidation in cellular systems by F2-isoprostane analysis, *PLoS One* 8 (2013), e80935, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080935>.
- [52] A. Parihar, T.D. Eubank, A.I. Doseff, Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death, *J. Innate Immun.* 2 (2010) 204–215, <https://doi.org/10.1159/000296507>.
- [53] R. Ross, Atherosclerosis—an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 115–126, <https://doi.org/10.1056/nejm199901143400207>.
- [54] J. Auwerx, The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *Experientia* 47 (1991) 22–31, <https://doi.org/10.1007/BF02041244>.
- [55] O. Sharif, V.N. Bolshakov, S. Raines, P. Newham, N.D. Perkins, Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages, *BMC Immunol.* 8 (2007) 1, <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-1>.
- [56] V.H. Guaiquil, J.C. Vera, D.W. Golde, Mechanism of vitamin C inhibition of cell death induced by oxidative stress in glutathione-depleted HL-60 cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40955–40961, <https://doi.org/10.1074/jbc.M106878200>.
- [57] C. Traidl-Hoffmann, V. Mariani, H. Hochrein, K. Karg, H. Wagner, J. Ring, M. J. Mueller, T. Jakob, H. Behrendt, Pollen-associated phytoosterolates inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 627–636, <https://doi.org/10.1084/jem.20041065>.
- [58] S. Gilles, V. Mariani, M. Bryce, M.J. Mueller, J. Ring, T. Jakob, S. Pastore, H. Behrendt, C. Traidl-Hoffmann, Pollen-derived E1-phytoosterolates signal via PPAR-gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms, *J. Immunol.* 182 (2009) 6653–6658, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802613>.
- [59] J. Gutermuth, M. Beversdorff, C. Traidl-Hoffmann, J. Ring, M.J. Mueller, H. Behrendt, T. Jakob, Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoosterolates on primary immune responses *in vivo*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (2007) 293–299, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.03.017>.
- [60] J.C.-Y. Lee, D.S. AlGhawas, K. Poutanen, K.S. Leung, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, H. El-Nezami, Dietary oat bran increases some proinflammatory polyunsaturated fatty-acid oxidation products and reduces anti-inflammatory products in apolipoprotein E(-/-) mice, *Lipids* 53 (2018) 785–796, <https://doi.org/10.1002/lipd.12890>.
- [61] N. Gonzalez Roldán, R. Engel, S. Düpöw, K. Jakob, F. Koops, Z. Orinska, C. Vigor, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, U. Jappe, K.A. Duda, Lipid mediators from timothy grass pollen contribute to the effector phase of allergy and prime dendritic cells for glycolipid presentation, *Front. Immunol.* 10 (2019) 974, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00974>.
- [62] S. Medina, R. Domínguez-Perles, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, T. Gil-Izquierdo, The effects of the intake of plant foods on the human metabolome, *TrAC Trends Anal. Chem.* (Reference Ed.) 52 (2013), <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.08.002>.
- [63] J.-M. Galano, Y.Y. Lee, C. Oger, C. Vigor, J. Vercauteren, T. Durand, M. Giera, J. Lee, Isoprostanes, neuroprostanes and phytoosterolates. An overview of 25 years of research in chemistry and biology, *Prog. Lipid Res.* 68 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.09.004>.
- [64] V. Mariani, S. Gilles, T. Jakob, M. Thiel, M.J. Mueller, J. Ring, H. Behrendt, C. Traidl-Hoffmann, Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction, *J. Immunol.* 178 (2007) 7623–7631, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7623>.
- [65] S. Oeder, F. Alessandrini, O.F. Wirz, A. Braun, M. Wimmer, U. Frank, M. Hauser, J. Durner, F. Ferreira, D. Ernst, M. Mempel, S. Gilles, J.T.M. Buters, H. Behrendt, C. Traidl-Hoffmann, C. Schmidt-Weber, M. Akdis, J. Gutermuth, Pollen-derived nonallergic substances enhance Th2-induced IgE production in B cells, *Allergy* 70 (2015) 1450–1460, <https://doi.org/10.1111/all.12707>.
- [66] S. Gilles, D. Jacoby, C. Blume, M.J. Mueller, T. Jakob, H. Behrendt, K. Schaeckel, C. Traidl-Hoffmann, Pollen-derived low-molecular weight factors inhibit 6-sulfo LacNAc+ dendritic cells' capacity to induce T-helper type 1 responses, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 40 (2010) 269–278, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03369.x>.
- [67] W.T. Soh, L. Aglas, G.A. Mueller, S. Gilles, R. Weiss, S. Scheibhofer, S. Huber, T. Scheidt, P.M. Thompson, P. Briza, R.E. London, C. Traidl-Hoffmann, C. Cabrele, H. Brandstetter, F. Ferreira, Multiple roles of Bet v 1 ligands in allergen stabilization and modulation of endosomal protease activity, *Allergy* 74 (2019) 2382–2393, <https://doi.org/10.1111/all.13948>.
- [68] J.L. Gutierrez-Pajares, C. Ben Hassen, C. Oger, J.-M. Galano, T. Durand, P.G. Frank, Oxidized products of α -linolenic acid negatively regulate cellular survival and motility of breast cancer cells, *Biomolecules* 10 (2019), <https://doi.org/10.3390/biom10010050>.
- [69] L.J. Marnett, T.L. Wright, B.C. Crews, S.R. Tannenbaum, J.D. Morrow, Regulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide is revealed by targeted deletion of inducible nitric-oxide synthase, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13427–13430, <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13427>.
- [70] D.S. Straus, C.K. Glass, Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets, *Med. Res. Rev.* 21 (2001) 185–210, <https://doi.org/10.1002/med.1006>.
- [71] L.J. 2nd Roberts, J.D. Morrow, Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 808–820, <https://doi.org/10.1007/s0018-002-8469-8>.
- [72] L. Minghetti, R. Salvi, M. Lavinia Salvatori, M.A. Ajmone-Cat, C. De Nuccio, S. Visentin, V. Bultel-Poncé, C. Oger, A. Guy, J.-M. Galano, A. Greco, A. Bernardo, T. Durand, Nonenzymatic oxygenated metabolites of α -linolenic acid B1- and L1-phytoosterolates protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR- γ activation, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 41–50, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.025>.
- [73] S. Medina, R. Domínguez-Perles, J.I. Gil, F. Ferreres, A. Gil-Izquierdo, Metabolomics and the diagnosis of human diseases - A guide to the markers and pathophysiological pathways affected, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014), <https://doi.org/10.2174/0929867320666131119124056>.
- [74] Y. Harada, K. Hatanaka, M. Kawamura, M. Saito, M. Ogino, M. Majima, T. Ohno, K. Ogino, K. Yamamoto, Y. Taketani, S. Yamamoto, M. Katori, Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E2 formation in rat carrageenin-induced pleurisy, *Prostaglandins* 51 (1996) 19–33, [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/0090-6980(95)00168-9).
- [75] E. Moita, A. Gil-Izquierdo, C. Sousa, F. Ferreres, L.R. Silva, P. Valentão, R. Domínguez-Perles, N. Baenas, P.B. Andrade, Integrated analysis of COX-2 and iNOS derived inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW macrophages pre-exposed to Echinium plantagineum L. Bee pollen extract, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059131>.
- [76] E. Ricciotti, G.A. FitzGerald, Prostaglandins and inflammation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 986–1000, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>.
- [77] A. Kashmiry, R. Tate, G. Rotondo, J. Davidson, D. Rotondo, The prostaglandin EP4 receptor is a master regulator of the expression of PGE2 receptors following inflammatory activation in human monocyte cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1863 (2018) 1297–1304, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.003>.
- [78] M. Nakanishi, D.W. Rosenberg, Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer, *Semin. Immunopathol.* 35 (2013) 123–137, <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0342-8>.
- [79] P. Kalinski, Regulation of immune responses by prostaglandin E2, *J. Immunol.* 188 (2012) 21–28, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>.
- [80] R. Muthuswamy, J. Mueller-Berghaus, U. Haberkorn, T.A. Reinhardt, D. Schendörfer, P. Kalinski, PGE(2) transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells, *Blood* 116 (2010) 1454–1459, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-258038>.
- [81] M. Murakami, H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh, I. Kudo, Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 32783–32792, <https://doi.org/10.1074/jbc.M003505200>.
- [82] Y. Du, T. Kemper, J. Qiu, J. Jiang, Defining the therapeutic time window for suppressing the inflammatory prostaglandin E2 signaling after status epilepticus, *Expert Rev. Neurother.* 16 (2016) 123–130, <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1134322>.
- [83] A.S. Andreasen, K.S. Krabbe, R. Krogh-Madsen, S. Taudorf, B.K. Pedersen, K. Møller, Human endotoxemia as a model of systemic inflammation, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 1697–1705, <https://doi.org/10.2174/092986708784872393>.
- [84] J.R. Burgess, H. Yang, M. Chang, M.K. Rao, C.P. Tu, C.C. Reddy, Enzymatic transformation of PGH2 to PGF2 alpha catalyzed by glutathione S-transferases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 (1987) 441–447, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(87\)90294-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(87)90294-4).
- [85] C. Xu, W. Liu, X. You, K. Leimert, K. Popowycz, X. Fang, S.L. Wood, D.M. Slater, Q. Sun, H. Gu, D.M. Olson, X. Ni, PGF2 α modulates the output of chemokines and pro-inflammatory cytokines in myometrial cells from term pregnant women through divergent signaling pathways, *Mol. Hum. Reprod.* 21 (2015) 603–614, <https://doi.org/10.1093/molehr/gav018>.
- [86] D.M. Duffy, Novel contraceptive targets to inhibit ovulation: the prostaglandin E2 pathway, *Hum. Reprod. Update* 21 (2015) 652–670, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv026>.
- [87] G.M. Nylund, F. Weinberger, M. Rempt, G. Pohnert, Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria*

M. Campillo et al.

- vermiculophylla, *PLoS One* 6 (2011), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029359> e29359.
- [88] W.-L. Song, M. Wang, E. Ricciotti, S. Fries, Y. Yu, T. Grosser, M. Reilly, J. Lawson, G. FitzGerald, Tetranor PGDM, an abundant urinary metabolite reflects biosynthesis of prostaglandin D2 in mice and humans, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1179–1188, <https://doi.org/10.1074/jbc.M706839200>.

Free Radical Biology and Medicine 167 (2021) 335–347

- [89] H. Matsumoto, H. Naraba, M. Murakami, I. Kudo, K. Yamaki, A. Ueno, S. Oh-ishi, Concordant induction of prostaglandin E2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E2 over thromboxane and prostaglandin D2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230 (1997) 110–114, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5894>.

ANEXO 2. A PHYTOPROSTANE FROM GRACILARIA LONGISSIMA INCREASES PLATELET ACTIVATION, PLATELET ADHESION TO LEUKOCYTES AND ENDOTHELIAL CELL MIGRATION BY POTENTIAL BINDING TO EP3 PROSTAGLANDIN RECEPTOR



International Journal of
Molecular Sciences



Article

A Phytoprostane from *Gracilaria longissima* Increases Platelet Activation, Platelet Adhesion to Leukocytes and Endothelial Cell Migration by Potential Binding to EP3 Prostaglandin Receptor

Silvia Montoro-García ¹, Sara Martínez-Sánchez ¹, Miguel Carmena-Bargueño ², Horacio Pérez-Sánchez ², María Campillo ¹, Camille Oger ³, Jean-Marie Galano ³, Thierry Durand ³, Ángel Gil-Izquierdo ⁴ and José Antonio Gabaldón ^{5,*}

- ¹ Izipisua Lab, HiTech, Health Sciences Department, Universidad Católica de Murcia (UCAM), Campus de los Jerónimos 135, 30107 Guadalupe, Spain
 - ² Structural Bioinformatics and High-Performance Computing Research Group (BIO-HPC), Computer Engineering Department, Universidad Católica de Murcia (UCAM), Campus de los Jerónimos 135, 30107 Guadalupe, Spain
 - ³ Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247-CNRS, Faculty of Pharmacy, University of Montpellier-ENSCM, 34093 Montpellier, France
 - ⁴ 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
 - ⁵ Molecular Recognition and Encapsulation Research Group (REM), Health Sciences Department, Universidad Católica de Murcia (UCAM), Campus de los Jerónimos 135, 30107 Guadalupe, Spain
- * Correspondence: jagabaldon@ucam.edu; Tel.: +34-968-278622



Citation: Montoro-García, S.; Martínez-Sánchez, S.; Carmena-Bargueño, M.; Pérez-Sánchez, H.; Campillo, M.; Oger, C.; Galano, J.-M.; Durand, T.; Gil-Izquierdo, Á.; Gabaldón, J.A. A Phytoprostane from *Gracilaria longissima* Increases Platelet Activation, Platelet Adhesion to Leukocytes and Endothelial Cell Migration by Potential Binding to EP3 Prostaglandin Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2730. <https://doi.org/10.3390/ijms24032730>

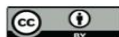
Academic Editor: Tzong-Shyuan Lee

Received: 31 December 2022

Revised: 21 January 2023

Accepted: 26 January 2023

Published: 1 February 2023



Copyright: © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Plant phytoprostanes (PhytoPs) are lipid oxidative stress mediators that share structural similarities with mammal prostaglandins (PGs). They have been demonstrated to modulate inflammatory processes mediated by prostaglandins. The present study aims to test the effects of the most abundant oxylipin from *Gracilaria longissima*, ent-9-D1t-Phytoprostane (9-D1t-PhytoP), on platelet activation and vascular cells as well as clarify possible interactions with platelets and the endothelial EP3 receptor. Platelet and monocyte activation was assessed by flow cytometry in the presence of purified 9-D1t-PhytoP. Cell migration was studied using the human Ea.hy926 cell line by performing a scratch wound healing assay. The RNA expression of inflammatory markers was evaluated by RT-PCR under inflammatory conditions. Blind docking consensus was applied to the study of the interactions of selected ligands against the EP3 receptor protein. The 9D1t-PhytoP exerts several pharmacological effects; these include prothrombotic and wound-healing properties. In endothelial cells, 9D1t-PhytoP mimics the migration stimulus of PGE₂. Computational analysis revealed that 9D1t-PhytoP forms a stable complex with the hydrophobic pocket of the EP3 receptor by interaction with the same residues as misoprostol and prostaglandin E₂ (PGE₂), thus supporting its potential as an EP3 agonist. The potential to form procoagulant platelets and the higher endothelial migration rate of the 9-D1t-PhytoP, together with its capability to interact with PGE₂ main target receptor in platelets suggest herein that this oxylipin could be a strong candidate for pharmaceutical research from a multitarget perspective.

Keywords: phytoprostanes; prostaglandins; platelets; EP3 receptor; migration; inflammation

1. Introduction

The discovery of plant oxylipins in the 1990s marked a breakthrough in oxidized free fatty acids. These molecules, similar to human prostaglandins (PGs, mammal oxylipins) [1], are generated through the oxidation of polyunsaturated fatty acids such as α -linolenic acid, without the participation of the enzyme cyclooxygenase (COX), as occurs in humans [2–4]. Oxidative stress in plants can lead to the dysregulation of lipid metabolism and the release of multiple lipid mediators, such as phytoprostanes (PhytoPs, plant isoprostanes) and

phytofuran (PhytoFs), participating in the redox balance in different crops [2,5–7]. Recently, PhytoPs have been extensively characterized in a wide diversity of plant-based foods, including nuts, hazelnuts, almonds, vegetable oils, cereals, olives, wine, peas, rice, several tropical fruits, cocoa, macroalgae, chocolate, pistachios, dates, and especially in legumes, at different concentrations [8–10]. Moreover, oxylipins extracted from the red macroalgae *Gracilaria longissima* have been shown to modulate pro-inflammatory responses associated with endothelial dysfunction [11]. In another recent paper, distinct purified oxylipins were able to prevent the up-regulation of PGs metabolites induced by lipopolysaccharide in THP1 cells, protecting against inflammatory disorders [12]. Therefore, oxylipins have a myriad of functions that are still being elucidated.

In humans, prostanoids are bioactive ligands characteristic of distinct cell types (endothelium, platelets, smooth muscle, neurons, among others) and physiological states. Originating from arachidonic acid (AA) and PG endoperoxides, the most relevant prostanoids for platelet and vascular function are thromboxane A₂ (TxA₂), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), and prostacyclin (PGI₂). These prostanoids exhibit subtle differences in their chemical structure and can bind a wide diversity of prostanoid receptors on the surface of platelets, herein sustaining homeostasis and playing an important role in pathogenic mechanisms, including the inflammatory response, platelet aggregation, and vascular tone regulation [13]. More recently, PGE₂ has been found to present four EP receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) that trigger G-protein-coupled signaling pathways [14]. Among them, EP3 and EP4 receptors are much more prominent in human platelets and endothelium and appear to be valuable drug targets [15,16]. Consistent with these findings, a recent study showed PGE₂ can bind either a pro-thrombotic (EP3) or anti-thrombotic (EP4) receptor on the surface of platelets [17].

Additionally, PhytoPs are geometric isomers of human PGs, more concretely of PGE₂, where the PhytoPs side chains display a *cis* configuration, compared to the *trans* of PGs [1]. That is why, biologically, PhytoPs could potentially exert their effect through the activation of prostanoid receptors and further intracellular signaling. However, evidence supporting a role for PhytoPs in the regulation of platelets and prostanoids sensitive cells is lacking. Furthermore, to identify the underlying mechanism regulated by a PhytoP of interest, its corresponding receptor must be elucidated. It is then understandable why the *in vitro* and *in silico* characterization of these purified compounds individually could improve our understanding of their biological implications in health and disease. The present study aims to test the effects of ent-9-D1t on platelet activation markers and human vascular cells, as well as to clarify with docking simulations possible interactions with the EP3 receptor.

2. Results

2.1. Individual PhytoPs and PhytoFs Composition in *Gracilaria Longissima* Extract

The analysis of the individual and total oxylipins was performed by UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS. The most abundant species of oxylipin in the extract was the compound 9-D1t-PhytoP (FP-2), being 29-fold higher than the second most abundant PhytoPs and PhytoFs (Table 1).

Table 1. Levels of oxylipins (PhytoPs and PhytoFs, ng/sample) in raw material, after methanol extraction.

Sample	PhytoPs ^Z							PhytoFs ^Y				
	FP-1	FP-2	FP-3	FP-4	FP-5	FP-6	FP-7	Total	FF-1	FF-2	FF-3	Total
1	38.5	1591	55.1	0.2	3.1	9.0	13.6	1717.9	171.9	23.1	13.6	208.7
2	25.2	752	26.7	<0.1	1.1	3.6	7.0	815.7	298.2	31.7	6.7	336.6
3	52.8	1967	44.8	0.2	3.4	10.0	12.1	2100.6	307.6	7.7	12.1	326.8

^Z FP-1, 9-F₁₁-PhytoP; FP-2, 9-D₁₁-PhytoP; FP-3, ent-16-F₁₁-PhytoP + ent-16-epi-16-F₁₁-PhytoP; FP-4, 16-B₁₁-PhytoP; FP-5, 9-epi-9-F₁₁-PhytoP; FP-6, 9-L₁₁-PhytoP; FP-7, 9-epi-9-D₁₁-PhytoP. ^Y FF-1, ent-16-(RS)-9-epi-ST-Δ¹⁴-10-PhytoF; FF-2, ent-16-(RS)-13-epi-ST-Δ¹⁴-9-PhytoF; FF-3, ent-9-(RS)-12-epi-ST-Δ¹⁰-13-PhytoF.

2.2. *PhytoPs* Extract Stimulates Platelet Activation and Aggregation

We first tested the effects of a 9-D1t-PhytoP-rich extract on platelet activation markers in whole blood. The preincubation with the extract alone was only able to upregulate glycoprotein IV (CD36), an atherosclerotic stress marker ($p = 0.0009$) (Figure 1B). However, the extract did not impair the CD62P and CD36 expression induced by ADP and AA (both $p < 0.001$) (Figure 1A,B). A good correlation was observed between CD62P and CD36 mean fluorescence intensity (MFI) for all the conditions. Finally, platelet aggregation (decrease in CD61 MFI) was induced by ADP in whole blood ($p < 0.05$), but also pretreated with extract/ADP and extract/AA, showing a synergistic effect with AA (all $p < 0.05$, Figure 1C). Arachidonic acid alone was not able to stimulate platelet aggregation in a significant way (Figure 1C). These results indicate that *Gracilaria sp.* Extract alone induces platelet activation, but it was not sufficient for an aggregation response.

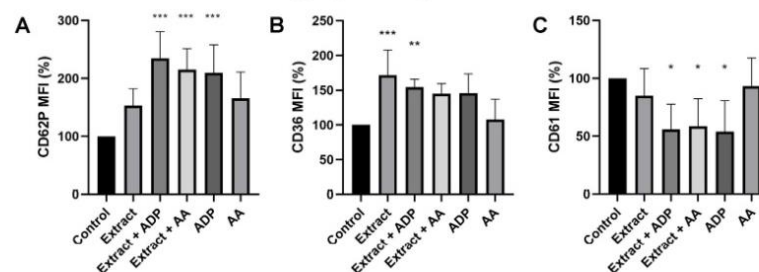


Figure 1. Effects of the *Gracilaria longissima* extract rich in 9-D1t- on the expression of platelet activation markers. (A) CD62P (P-selectin) MFI. (B) CD36 (glycoprotein IV) MFI. (C) CD61 (glycoprotein IIIa) MFI. The final concentrations in citrated blood were: 129 nM extract, 20 μ mol/L ADP, and 3 μ g/mL AA. MFI: Mean fluorescence intensity. The bars show mean and standard deviation ($n = 9$ different blood donors). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control condition (PBS).

2.3. 9-D1t-PhytoP Affects Platelet Aggregation through EP Receptors

We then tested the hypothesis that 9-D1t-PhytoP treatment modulates platelet activation induced by ADP. Citrated whole blood ($n = 5$ blood donors) was treated with 20 and 100 nM purified 9-D1t-PhytoP for 10 min before ADP stimulation. In Figure 2A,B, the ability of 100 nM 9-D1t-PhytoP to increase P-selectin and CD36 expression on single platelets was significant (both $p < 0.001$). Treatment with 20 nM of 9-D1t-PhytoP alone did not trigger platelet aggregation ($p = 0.723$) but a higher concentration (100 nM) did ($p < 0.001$, Figure 2C). 9-D1t-PhytoP was also able to enhance the extent of ADP-induced platelet aggregation ($p < 0.001$), which was consistent with previous data with *Gracilaria longissima* extract rich in 9-D1t-PhytoP.

As platelets express mainly two receptors for prostanoids (EP3 and EP4 receptors), the effects of 100 nM 9-D1t-PhytoP on platelet activation in whole blood, induced by ADP as an agonist, were determined in the presence of selective EP3 and EP4 receptor ligands (Figure S1). At this high ADP concentration (20 μ M), we did not observe any effect of 40 nM PGE₂ preincubation on platelet aggregation (CD61) or CD62P expression (Figure S1A–C), even in the presence of 100 nM 9-D1t-PhytoP, although CD36 expression tended to increase ($p = 0.056$, Figure S1B). The combination of ligands and 100 nM 9-D1t-PhytoP slightly displayed a synergistic effect in the presence of 200 nM Sulprostone for CD36 ($p = 0.051$). Nonetheless, the stimulation with ADP did not seem adequate for the 9-D1t-PhytoP characterization. Therefore, the same experiment was performed without ADP as an agonist.

In the absence of an ADP agonist (Figure 3), the distinct modulators alone were unable to significantly stimulate platelet activation and aggregation (all $p > 0.05$). Only ONO AE3-208 (EP4 antagonist) displayed a prothrombotic profile (Figure 3A,B) ($p = 0.0007$ for CD62P), in a similar pattern as 9-D1t-PhytoP ($p = 0.018$). Moreover, platelet aggregation

(CD61 decrease) induced by 9-D1t-PhytoP (CD61, $p = 0.0146$), was blocked by the EP3 ligands, PGE₂ (agonist, $p = 0.048$) and L798-106 (antagonist, $p = 0.015$), denoting thus a possible competition for the same receptor, but not by Sulprostone ($p = 0.83$). No changes appeared in these platelet markers when 9-D1t-PhytoP and EP4 modulators were incubated together, compared to 9-D1t-PhytoP alone (all $p > 0.05$).

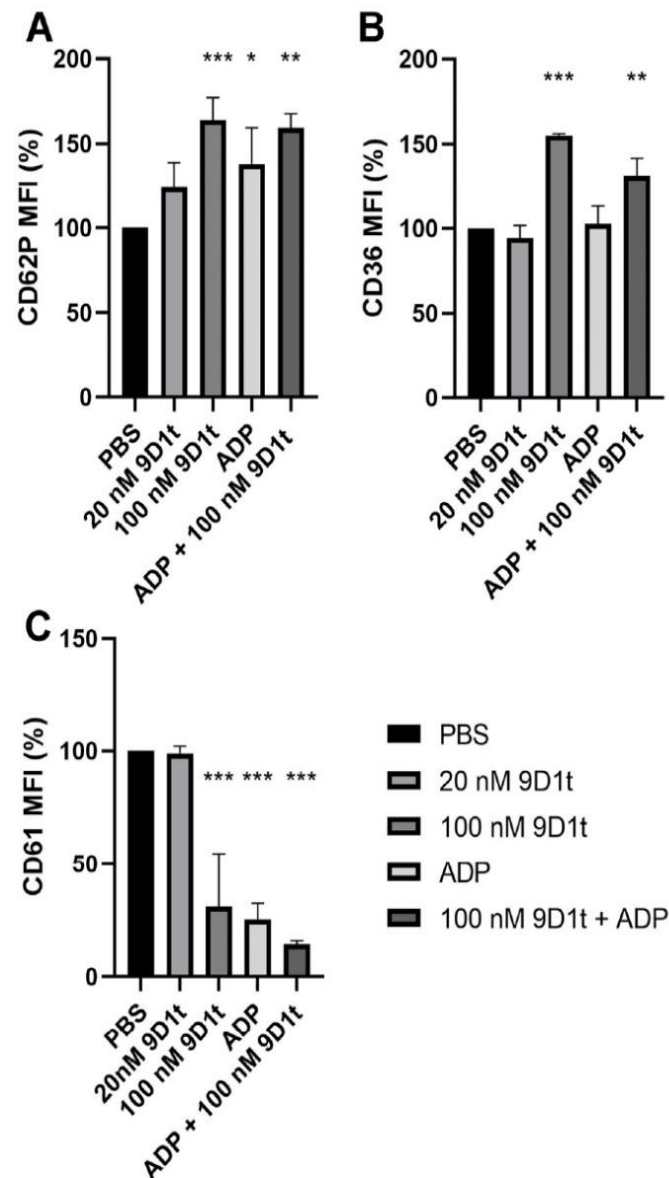


Figure 2. Effects of 9-D1t-PhytoP on the expression of platelet activation markers. (A) CD62P (P-selectin) expression. (B) CD36 (glycoprotein IV) expression. (C) CD61 (glycoprotein IIIa) expression. The final concentrations in citrated whole blood were: 20–100 nM 9-D1t-PhytoP and 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP. MFI: mean fluorescence intensity. The bars show mean and standard deviation ($n = 5$ different blood donors). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control condition (PBS).

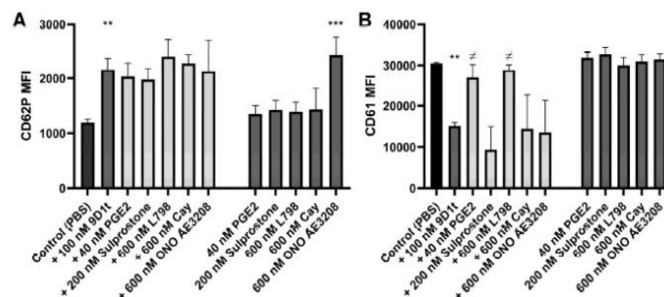


Figure 3. Effects of 100 nM 9-D1t-PhytoP alone or in combination with distinct EP receptor ligands on the expression of platelet activation markers. (A) CD62P (P-selectin) expression. (B) CD61 (glycoprotein IIIa) expression. Samples of whole blood were stimulated for 10 min and analyzed by flow cytometry. MFI: Mean fluorescence intensity. The bars show mean and standard deviation ($n = 5$ different blood donors). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control condition (PBS); and $\neq p < 0.05$ vs. 9-D1t-PhytoP.

Next, we examined the effects of 9-D1t-PhytoP on platelet activation markers by blocking the EP3/EP4 receptors first. Accordingly, we found a reduction in activation/aggregation in the presence of EP3 ligands, denoting thus the contribution of 9-D1t-PhytoP to the aggregation via the EP3 receptor (Figure 4, all $p > 0.05$), whereas in the presence of Cay10598, treatment with 100 nM 9-D1t-PhytoP stimulated activation and aggregation (CD62P $p < 0.001$ and CD61 $p = 0.358$, respectively).

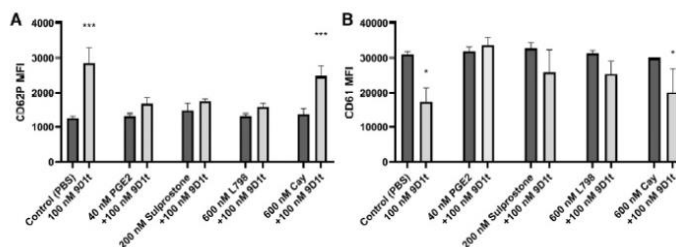


Figure 4. The EP4 agonist Cay10598 inhibits the effect of 9-D1t-PhytoP. (A) CD62P (P-selectin) expression. (B) CD61 (glycoprotein IIIa) expression. Samples of whole blood were preincubated with EP3/EP4 ligands (black) for 10 min plus 100 nM 9-D1t-PhytoP (gray) for additional 10 min at 37 °C and analyzed by flow cytometry ($n = 5$). MFI: mean fluorescence intensity. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. control condition (PBS).

2.4. 9-D1t-PhytoP Alone Does Not Increase Platelet Adhesion to Leukocytes

There is evidence that the overall effects of prostanoids on human platelet function are the consequence of a balance between stimulatory effects exerted at the EP3 receptor and inhibitory effects acting at the EP4 receptor. For that purpose, we tested the effects of ligands of these two receptors in combination with purified 9-D1t-PhytoP and examined the platelet adhesion to leukocytes by FCM (Figure S2, Q2: CD14+CD42b+).

As shown in Figure 5, treatment with the EP3 agonists (PGE₂ and Sulprostone) increased platelet binding, similar to the EP4 antagonist (ONO AE3-208) (all $p < 0.05$). Treatment with 9-D1t-PhytoP alone, or in combination with 20 nM PGE₂, did not trigger platelet adhesion to leukocytes (123.98% and 135.34%, respectively, $p > 0.05$), although a synergistic effect was found when fresh blood was treated with Sulprostone in addition to 9-D1t-PhytoP (204.18%, $p < 0.01$). Interestingly, the effect of the EP3 antagonist L798,106 was slightly counteracted by the addition of 9-D1t-PhytoP (93.19% vs. 121.30%), denoting a potential competition for the same EP receptor ($p > 0.05$).

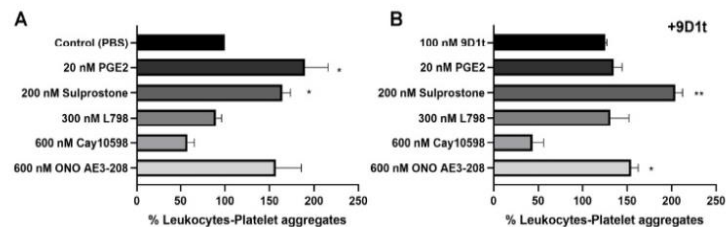


Figure 5. 9-D1t-PhytoP effect on the formation of platelet–leukocyte in fresh EDTA blood. (A) Relative counts in the presence of EP3/EP4 ligands. (B) Relative counts in the presence of EP3/EP4 ligands plus 100 nM 9D1t. Values are normalized to control (PBS). Values are mean \pm SD ($n = 3$ with different blood donors). Stars denote significant differences as compared to samples without activation (PBS, control) */** $p < 0.05/0.01$, * p value derived from 2-tailed paired t -test.

To confirm that the effect of 9-D1t-PhytoP was mediated via EP3 receptor activation, fresh blood was also treated with the EP4 ligands (ONO AE3-208 and Cay10598) together with 100 nM 9-D1t-PhytoP. The presence of 9-D1t-PhytoP did not influence the inhibitory effect of the EP4 agonist Cay10598. Conversely, 9-D1t-PhytoP had no effect on the ONO AE3-208-induced platelet adhesion to leukocytes (Figure 5B), thus suggesting that the modulatory effect of 9-D1t-PhytoP was mediated predominantly by the EP3 receptor.

2.5. 9-D1t-PhytoP Does Not Compromise Endothelial Cell Viability

Before testing the capacity of purified 9-D1t-PhytoP to modulate gene expression and migration on endothelial cells, the cytotoxic effect on the line Ea.hy926, a well-established model of endothelial cell-based studies, was assessed. Treatment with 9-D1t-PhytoP was not found to affect the viability or proliferation up to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the first 48 h. However, at higher concentrations (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 days, the viability was significantly reduced ($p < 0.05$) (Figure S3).

2.6. 9-D1t-PhytoP Bioactivity over the Endothelium

2.6.1. 9-D1t-PhytoP Contributes to In Vitro Migration

PGE₂ is known to stimulate migration and angiogenesis in endothelial cells. As shown in Figure 6, 300 nM 9-D1t-PhytoP significantly increased migration in a similar manner as PGE₂ ($p = 0.004$, respectively).

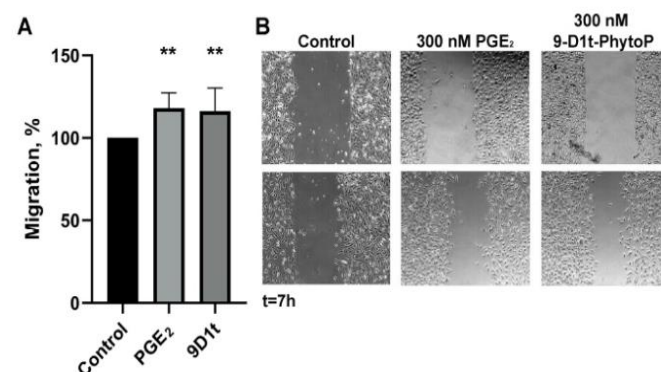


Figure 6. Migration (wound closure) in human endothelial Ea.hy926 cells in the presence of 300 nM PGE₂ and 9-D1t-PhytoP, respectively. (A) Percentage of migrated area following the wound healing assay ($n = 3$). (B) Representative images of the wound healing assay at $t = 0$ and $t = 7$ h. Statistic differences compared with control ** $p < 0.01$.

2.6.2. 9-D1t-PhytoP Induces an Endothelial Dysfunctional Status

Gene expression of NOS3, COX-2 (PGST), ICAM-1, and IL-6 were measured after 9-D1t-PhytoP and TNF- α treatments (Figure S4). 9-D1t-PhytoP alone did not produce significant changes in NOS3, ICAM-1, nor PGST expression in endothelial cells. However, TNF- α treatment was able to decrease NOS3 expression ($p = 0.012$, and increase ICAM-1 ($p = 0.0001$), PGST ($p = 0.0002$), and IL-6 expression ($p = 0.0262$). Pretreatment with 300 nM 9-D1t-PhytoP and TNF- α showed a synergistic effect on NOS3 and ICAM-1 expression ($p = 0.0087$).

2.7. Computational Methods for Discovering the Biological Receptors of 9-D1t-PhytoP

2.7.1. 9-D1t-PhytoP Binds to the Hydrophobic Pocket of EP3

We then performed blind docking (BD) approaches with the EP3 receptor (PDBs: 6M9T). Our model system compared the clusters of their well-characterized agonists (misoprostol and PGE₂) and antagonists (L-798,106). Figure 7C shows the potential binding of 9-D1t-PhytoP to the hydrophobic pocket of EP3, in a similar way to Misoprostol (synthetic prostanoid, EP3 agonist) (energy binding e-11, Figure S5).

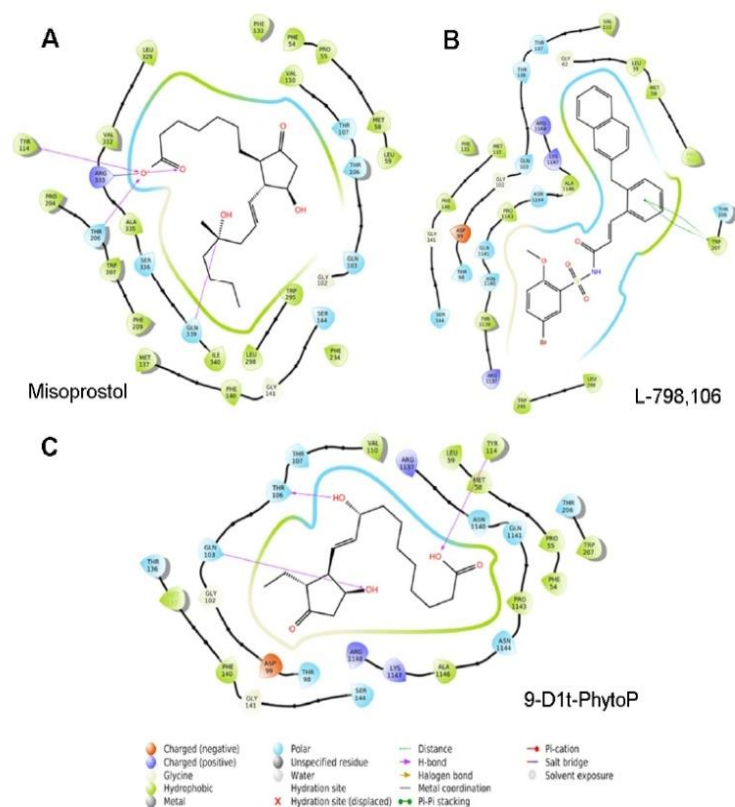


Figure 7. Two-dimensional protein–ligand interactions diagram generated between EP3 receptor (PDB: 6M9T) and (A) Misoprostol (EP3 agonist); (B) L-798,106 (EP3 antagonist); and (C) 9-D1t-PhytoP ligands, using the Ligand Interaction script in Maestro (Schrödinger Inc., www.schrodinger.com, accessed on 14 May 2022). It outlines a cavity consisting of several proximate hydrophobic and hydrophilic residues (Thr 106 and 107, shown in blue circles) where 9-D1t-PhytoP potentially binds. A hydrogen bond between the ligand and Gln 103 is shown by an arrow.

2.7.2. 9-D1t-PhytoP Shares Hydrophobic Interactions with EP3 Agonists

In order to give more information about the molecular recognition of 9-D1t-PhytoP to EP3, 100 ns MD simulations were rendered, and the binding of the PhytoP to the hydrophobic cavity remains stable with the top averaging interactions shown in Figure 8. PGE₂, Misoprostol, and 9-D1t-PhytoP share hydrophobic interactions with Arg333, Tyr114, and Thr206, whereas the EP3 antagonist, L-798,106, does not (Figure 8 and Figure S6). On the contrary, L-798,106 does not reach far down into the binding pocket, which could lead to a non-activating conformation.

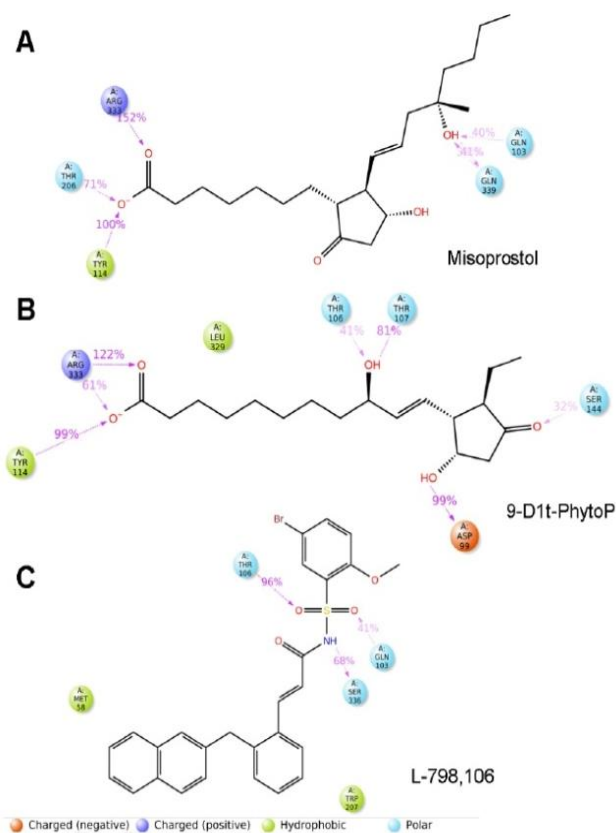


Figure 8. Two-dimensional protein–ligand interactions of the molecular dynamics diagrams generated between EP3 receptor (PDB: 6M9T) and (A) Misoprostol (EP3 agonist), (B) 9-D1t-PhytoP, and (C) L-798,106 (EP3 antagonist) using the Simulation Interactions Diagram script in Maestro (Schrodinger Inc., www.schrodinger.com, accessed on 20 December 2022).

3. Discussion

In order to understand the modulating vascular and platelet activity of PhytoPs as bioactive ingredients from plant foods, it is necessary to delve into the specific function of the different EP receptor subtypes. Thus, the current study aimed at characterizing (1) the effect of purified 9-D1t-PhytoP on platelet activation and aggregation, (2) the effects of 9-D1t-PhytoP on vascular cells such as monocytes in the presence of EP selective modulators, (3) the migration and inflammatory protein expression changes in endothelial cells, and (4) the mechanistic binding to the EP3 receptor. The results of these studies suggest that 9-D1t-PhytoP acts as a fine tuner of platelet function primarily through its potential

interaction with EP3, allowing diverse pharmacological strategies useful in cardiovascular treatment and prevention.

The high structural homology of PhytoPs to human prostanoids such as PGE₂ has attracted tremendous appreciation in recent years, especially by unraveling the potential biological activities that they could exert in human vascular cells and platelets. PGE₂ can bind at least four structurally different receptor subtypes (EP1–4), resulting in diverse and often opposite final biological responses [18]. Moreover, a “dual” effect of PGE₂ on platelet response (i.e., activatory at nanomolar concentrations and inhibitory at micromolar concentrations) was repeatedly observed in early studies [15,19]. Much research on the use of prostanoids such as PGE₂ and its synthetic analogs (Sulprostone, Misoprostol) over their selective EP3 receptor subtype has been performed [20,21]. Nonetheless, as previously reported, such agonists mimic the effects of low concentrations of PGE₂ on platelets induced by ADP, but they do not enhance platelet aggregation without agonist stimulation [22,23]. Further, multiple mammal prostanoids (i.e., enhanced thromboxane production) are synthesized in response to distinct agonists making it difficult to attribute the final cellular response to any one particular compound (PhytoPs, AA, thrombin, etc.). As platelet activation mediated by ADP is independent of the lipoxygenase- and cyclooxygenase-dependent metabolites of arachidonic acid, and in order to avoid confounding crosstalk, we selected ADP as the agonist [24].

As the most abundant oxylipin found in *Gracilaria longissima* extract was the 9-D1t-PhytoP, the study aimed at evaluating its particular bioactivity over vascular elements, as well as deciphering the potential receptors in humans. For this, our previous work studied the effect of *Gracilaria longissima* extract rich in 9-D1t-PhytoP in endothelial cells and found that it did not provide significant mitigation of the pro-inflammatory changes induced by TNF- α but has not been tested in human platelets yet [11]. In contrast, in another study, the ent-9-D1t-PhytoP reduced pro-inflammatory markers in monocytes to values found in the untreated control [12]. The functions of only a few oxylipins have been characterized in platelets, and those that have been characterized still remain controversial [25]. Herein, we focused now on the potential that the 9-D1t-PhytoP-EP3 might display in thrombus formation, by regulating platelet activation and aggregation. In the current experiments, we addressed the possibility that the effect of the 9-D1t-PhytoP was mediated by PG receptors mainly through the EP3 receptor. Moreover, we measured the effect of 9-D1t-PhytoP in platelets pre-treated with an EP3 antagonist (L798,106) and an EP4 agonist (Cay10598) on the expression of P-selectin (secreted from α -granules) and CD36 with and without ADP stimulation. The results of these experiments point out that 9-D1t-PhytoP has a stimulatory effect on platelet function via the EP3 receptor, under non-aggregating conditions. It is important to notice that the opposing anti-aggregatory action of PGE₂ for 9-D1t-PhytoP through the IP receptor has not been tested. Moreover, the high potency of 9-D1t-PhytoP as a potentiator implies that an EP2 receptor is unlikely to be involved [16]. EP2 receptors are associated with the relaxant actions of PGE₂ on vascular and respiratory smooth muscles, and Sulprostone is virtually inactive in these systems [26]. Furthermore, it is likely that the EP3 rather than the epinephrine subtype mediates the potentiating effect, as 9-D1t-PhytoP is more potent than PGE₂ and Sulprostone in the current conditions.

Extensive FCM approaches have considerably extended our knowledge of platelet-leukocyte interactions and their implications on health and disease [27,28]. We now tested the effect of 9-D1t-PhytoP on the capacity of platelets to form platelet-leukocytes aggregates. The platelet binding to other vascular cells in the presence of 9-D1t-PhytoP provided an amplification of the thrombotic state, which could become a therapeutic target in various diseases. Furthermore, leukocyte recruitment plays a significant role in the early phase of inflammation and endothelial dysfunction. It is well established that PGE₂ induces endothelium migration [29], but we also confirmed that the high dose of 9-D1t-PhytoP contributes to in vitro migration as well. Finally, the activation of endothelium promoted IL-6 overexpression (Figure S4D), confirming the data that high doses of the EP ligand are able to induce a dysfunctional status. Moreover, one has to keep in mind that arterial and

venous endothelial cell lines have been used in the literature with controversial differences in the release of vasoactive substances such as PGs or TxA_2 [30,31]. We assessed the effects of 9-D1t-PhytoP in arterial endothelial cells (Ea.hy926 cell line) in order to give continuity to our previous studies [11,32].

In order to understand the precise binding mode of the 9-D1t-PhytoP and its potential EP3 receptor, a combination of docking and MD was performed. The EP3 receptor presents dual signaling that requires extensive structural studies [33,34]. The residues that made high-energy contributions to the final poses of EP3-misoprostol, EP3-9-D1t-PhytoP, and EP3-PGE₂ were R333, T206, and Y114, providing a disparate binding model to EP3-L-798,106. Indeed, recent crystallographic studies have reported molecular details of such interactions; the tested agonists tend to adopt an L-shaped conformation in the EP3 binding site, which is important for receptor activation, and 9-D1t-PhytoP perfectly overlaps with it [33,34].

These results suggest that PhytoPs may have prothrombotic and pro-invasive effects, in addition to their known immunomodulatory abilities [12], in a similar manner as mammal PGE₂. The originality of the current work lies in the combination of ex vivo platelet activation together with classical endothelial in vitro approaches. Although current results are very promising, further studies are needed to establish the EP receptors' affinity of this and other PhytoPs and perhaps a dual role with distinct prostanoid receptors. It is also important to implement in vivo studies of the extracts with the aim of confirming a clinical effect.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Reagents

The PhytoPs: 9-F1t-PhytoP; ent-16-F1t-PhytoP, ent-16-epi-16-F1t-PhytoP; 9-epi-9-F1t-PhytoP; 9-D1t-PhytoP; 9-epi-9-D1t-PhytoP; 16-B1-PhytoP; and 9-L1-PhytoP; as well as the PhytoFs: ent-16(RS)-9-epi-ST- Δ 14-10-PhytoF; ent-9(RS)-12-epi-ST- Δ 10-13-PhytoF; and ent-16(RS)-13-epi-ST- Δ 14-9-PhytoF were synthesized according to already published procedures [35] and provided by the *Institut des Biomolécules Max Mousseron* (IBMM) (Montpellier, France). PGE₂ and other agonists of EP3/EP4 receptors (Sulprostone and Cay10598, respectively), as well as antagonists (L-798,106 and ONO AE3-208, respectively), were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA).

4.2. Analytical Extract Rich in Oxylipins

The oxylipins from *Gracilaria longissima* were extracted and characterized as previously published [8,11]. Briefly, 1 g of powdered algae was mixed with 5 mL of methanolic butylated hydroxyanisole (BHA) (99.9: 0.1, v/w), and the extracts were cleaned up by SPE. The PhytoP and PhytoF extracts were prepared at room temperature (RT). After SPE, the extracts were then reconstituted in 200 μ L of MeOH/MilliQ-water (50/50, v/v), filtered through a 0.45 μ m filter (Millipore, MA, USA), and immediately analyzed by UHPLC-ESI-Qq-MS/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

4.3. In Vitro Assessment of Platelet Activation and Polymorphonuclear Leukocytes (PMNs)-Platelet Aggregates

Nine healthy participants (without any treatment) were recruited among the staff of the Catholic University of Murcia (UCAM). Fresh blood samples were collected in commercial 2 mL sodium citrate (32%) and EDTA Vacutainer tubes using a 20-gauge needle (the first 2 mL was discarded). The blood extractions were performed in accordance with the Helsinki declaration and approved by the UCAM Research Ethics Committee. All participants provided written informed consent.

Saline dilutions of 0.2 μ g of characterized oxylipins (Table 1) and agonists were freshly prepared and added to 40 μ L of fresh citrated blood (rending 129 nM) for 10 min, followed by platelet activation marker analysis by flow cytometry (FCM). The platelet subpopulations (normal platelets and platelet aggregates (PA)) in whole blood were distinguished

from other cells based on the presence of constitutive platelets' membrane receptor CD42b (glycoprotein Ib) and CD61 (glycoprotein IIIa, fibrinogen receptor activation, and the formation of platelet aggregates). The surface expression of platelet membrane activation markers such as CD62P (P-selectin) and CD36 (glycoprotein IV) was then assessed as already published [28,36]. After incubation with extract and EP receptor ligands for 10 min, the stimulated whole blood (5 μ L) was labeled with mouse-anti-human CD61-fluorescein isothiocyanate (FITC), mouse-anti-human CD62P-BV786, mouse-anti-human CD42b-allophycocyanin (APC), and CD36-phycoerythrin (PE) (all from BD Biosciences, Oxford, UK) for 15 min, diluted with 1 mL of filtered PBS and then analyzed in a FACS Fortessa flow cytometer (BD, Becton Dickinson, Oxford, UK). Positive controls of platelet activation were also assessed after the incubation of the whole blood for 2 min with adenosine-5'-diphosphate (ADP, 0.02 mmol/L; Biodata Corporation, Horsham, PA, USA) and arachidonic acid (AA, 250 μ g/mL; Biodata Corporation, Horsham, PA, USA), giving a monophasic, complete, and irreversible aggregation [37].

Mouse antihuman monoclonal fluorochrome-conjugated antibody anti-CD14-BUV395 and CD42b-APC were mixed with 50 μ L of fresh EDTA anticoagulated whole blood in TruCount tubes (all from BD) containing a strictly defined number of fluorescent count beads. After incubation for 15 min, red blood cells were lysed by 450 μ L of lysing solution (BD, Oxford, UK) for 15 min, followed by dilution in 1 mL of PBS and immediate flow cytometric analysis. Monocytes and other polymorphonuclear leukocytes (PMNs) were selected by gating strategies based on forward and side scatter to select monocytes and side scatter versus CD14 expression to exclude granulocytes (some lymphocytes and neutrophils might be included in this gate too) (Figure S2). Absolute counts of CD14⁺ leukocytes (in cells per microliter) were obtained by calculating the number of gated events proportional to the number of the count beads according to the manufacturer's recommendations. CD14⁺ leukocyte-platelet aggregates were defined as events positive to CD14 and the platelet marker CD42b [27]. The number of events collected was 10,000 for the CD14⁺ leukocyte gate subset. Isotype controls for all the FCM assays were performed with different monoclonal anti-IgG1 (BD Biosciences).

Citrated and EDTA anticoagulated blood was incubated with ligands of platelet EP3 and EP4 receptors for 10 min at room temperature (RT). In total, 200 nM Sulprostone (agonist) and 600 nM L798,106 (antagonist) were used to stimulate the EP3 receptor. Whilst 600 nM Cay10598 (agonist) and ONO AE3-208 (antagonist) were used to stimulate the EP4 receptor, respectively, 20–40 nM PGE₂ was also used in the same conditions. Whole blood was incubated with 20–100 nM purified 9-D1t-PhytoP plus the above ligands and then processed by FCM.

4.4. Cell Line and Culture Conditions

Endothelial Ea.hy 926 (ATCC[®]CRL2922) human cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Cells were grown in DMEM containing 4.5 g L⁻¹ glucose, supplemented with GlutaMAX[™], 10% fetal bovine serum (FBS), and 1% non-essential amino acids at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The passage number of the cells used in this study was between 3–8 for the Ea.hy926 cell line.

4.5. Cell Viability Assay

The toxicity of 9-D1t-PhytoP (up to 1 μ M, 0.01% DMSO) dissolved in complete medium was tested in Ea.hy 926 cells. For this, exponentially growing cells were seeded into a 96-well plate at a density of 10⁴ cells/well. After the time of incubation (48 h and 6 days) with growing concentrations of 9-D1t-PhytoP, the cells were incubated with AlamarBlue solution at 10% concentration (ThermoFisher, Massachusetts, USA) for 4 h at 37 °C. The absorbance of the media was measured in a microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, Winooski, VT, USA) at 570 nm and 600 nm of reference. Cell viability was calculated as the average optic density (OD) of the wells/average OD of control wells and expressed as a percentage (%).

4.6. Cell Migration Assay

Cell migration was studied using the Ea.hy926 cell line by performing a scratch wound healing assay in standard medium supplemented with 5% FBS. Typically, 30,000 cells were plated in low 35 mm dishes with culture inserts following the manufacturer's instructions (Ibidi, Martinsried, Germany). After appropriate cell attachment and monolayer formation (around 24 h), inserts were removed with sterile forceps to create a wound field of approximately 500 μm . Detached cells were gently removed with DPBS before treatment. Confluent cells were incubated in one of the following treatments: control (0.01% DMSO), 300 nM PGE₂, or 300 nM 9-D1t-PhytoP. The cells were then placed in a cell culture incubator, and they were allowed to migrate. At 0 and 7 h (linear growth phase) [38,39], 10 fields of the injury area were photographed with an inverted phase contrast microscope using 10 \times magnification. For each time point, the area uncovered by cells was determined by Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Each treatment was performed in triplicate.

The migration speed of the wound closure was given as the percentage of the recovered area at each time point, relative to the initially covered area (t_0). The velocity of wound closure (%/h) was calculated according to the following equation and slopes are expressed as percentages relative to control conditions: Slope (%area/h) = (% covered area/ t_x) – [(% covered area t_0) * ($t_x - t_0$)].

4.7. Biological Activity in an Endothelial Dysfunction Model

In order to study the effects that 9-D1t-PhytoP produced on the EA.hy926 phenotype, cells were seeded in 24-well plates at 8×10^4 cells/well in DMEM supplemented with 5% FBS and treated with 100 nM 9-D1t-PhytoP (per triplicate) for 16 h, as previously published [11]. Then, 20 ng/mL TNF- α was added for an additional 6 h of incubation time.

Total RNA was extracted from EA.hy926 cells using 300 μL 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 a Sensifast cDNATM Synthesis kit (Bioline, Taunton, MA, USA). The mRNA levels of the target genes were quantified by RT-PCR using a SensiFAST SYBER Hi-ROX Kit (Bioline, Taunton, MA, USA) in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, 5 μL of 1:5 diluted cDNA was added to the qPCR reaction containing 10 μL 2X SensiFAST Mix and 400 nM of each primer in a total volume of 20 μL .

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 (NOS3), interleukin-6 (IL-6), and COX-2 (PGST) were purchased (all from Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). The relative mRNA expression of the genes of interest was represented by: $2^{-(\Delta\Delta\text{CT})} = [\text{CT}(\text{gene of interest}) - \text{CT}(\text{Actin})]_{\text{test}} - [\text{CT}(\text{gene of interest}) - \text{CT}(\text{Actin})]_{\text{control}}$.

The relative quantification of gene expression was evaluated by the comparative fold change $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [40]. An average value of each target gene after actin normalization at the time point showing the 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 in triplicate.

4.8. Blind Docking

Blind docking (BD) consensus was applied to the study of the interactions of selected ligands against the EP3 receptor protein. The BD method allows to calculate the most probable interaction hotspots for a given ligand across the selected protein surface [41].

Regarding input file preparation, the crystallized structure of the EP3 receptor was obtained from the PDB database with the code 6M9T (<https://www.rcsb.org/structure/6M9T>, accessed on 21 December 2022) [42]. The PDB file was processed using Maestro (www.schrodinger.com, accessed on 21 December 2022) tools: Protein Preparation Wizard

was used for refining the structure, to avoid clashes between atoms, and System Builder was used for calculating partial atomic charges using the OPLS3e force field [43]. Finally, the structure was converted to the mol2 format. Ligands PGE₂ and L-798,106 were prepared using Maestro tool LigPrep applying an OPLS3e force field. Additionally, both molecules were processed with the tool LigPrep of Maestro to calculate the charges of each atom using the force field OPLS3e. The resulting structures were saved in the mol2 format.

When performing BD consensus runs, two docking engines, Autodock Vina [44] and Lead Finder [45], were selected, and a grid box size whose dimensions were 30 × 30 × 30 Å was specified with default parameters. All BD calculations were carried out using the MetaScreener suite of scripts (<https://github.com/bio-hpc/metascreeener>, accessed on 21 December 2022). Lead Finder accepts protein and ligand files directly in the mol2 format, and for Vina, all the molecules were prepared using Gasteiger charges [46] with AutoDockTools (<https://autodock.scripps.edu/>, accessed on 21 December 2022) and converted to the pdbqt format. In the BD process, several docking calculations are performed in parallel, with one instance of the ligand starting on each alpha carbon of the protein model. Next, a distribution of docking score values as an approximation of binding energies and their structural clusters of poses was generated [41]. Finally, individual BD calculations obtained by each docking engine were discussed to obtain a BD consensus with the superposition and the scores of both methods. The scoring function of both algorithms 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 each ligand. The interactions between the studied ligands and the residues of the protein were calculated using PLIP (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>, accessed on 21 December 2022).

4.9. Molecular Dynamics

For each ligand, the most relevant interactions cluster after BD calculations were selected and a specific ligand pose was specified. Next, such poses were selected to run a molecular dynamic simulation (MD), which allows to study the time evolution of the protein–ligand systems. In addition, and in order to compare with known experimental results, the crystallographic pose of misoprostol (PDB ligand code J9P) from the PDB entry 6M9T was set up with Maestro tools to run another MD. The three MD calculations were carried out with Maestro-Desmond software (Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2020. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2020). Protein–ligand complexes were inserted into a membrane of POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [47] at 300 K, and the transmembrane region was obtained following the data of the UniProt database (<https://www.uniprot.org/>, accessed on 21 December 2022). The complexes created were immersed in a box filled with water molecules using the simple point charge (SPC) scheme. The dimension of the box was set to 10 × 10 × 10 Å. Cl[−] and Na⁺ ions were added to obtain a final NaCl concentration of 0.15 M. Energy minimization was carried out by 2000 steps using the steepest descent method with a threshold of 1.0 kcal/mol/Å. Periodic boundary conditions were used, and a cutoff of 9 Å was established for van der Waals interactions, and the Particle Mesh Ewald (PME) method with a tolerance of 10^{−9} was used in the electrostatic part. The NPT simulations were realized at 300 K with the Nosé-Hoover algorithm [48], and the pressure was maintained at 1 bar with the Martyna–Tobias–Klein barostat [49]. The same force field used to prepare the molecules was used in all runs [43]. All the runs had a time of simulation of 100 ns.

4.10. Statistical Analysis

Continuous variables were tested for normality of distribution with the Kolmogorov–Smirnov test. Normal data are presented as mean standard deviation (SD) and non-normal data are presented as median (interquartile range). Comparisons were performed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc analysis (normally distributed data) or

Mann–Whitney U test (non-normally distributed data). The analyses were performed using SPSS 22.0 for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A two-tailed probability value of $p < 0.05$ was considered significant in all statistical analyses.

5. Conclusions

In conclusion, 9-D1t-PhytoP is the most abundant oxylipin in the macroalgae *Gracilaria longissima*, and it influences human platelet activation in blood with/without ADP agonist stimulus. Furthermore, our results encourage future studies using 9-D1t-PhytoP instead of PGE2 or Sulprostone, because of its pro-aggregatory potential. This work estimated the critical interactions with the binding site residues of the EP3 receptor to decipher the biological activity reported here. The selective agonists of the platelet EP3 receptor such as 9-D1t-PhytoP and Misoprostol deserve further investigation as targeting newly designed compounds might develop novel clinical strategies.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24032730/s1>.

Author Contributions: The authors of the following manuscript all made significant contributions, allowing them to achieve the set objectives: S.M.-G., Á.G.-I. and J.A.G. were responsible for the conception, design, and assessment of the work. In addition, they substantively revised and corrected the manuscript's previous remission. C.O., J.-M.G. and T.D. were in charge of accomplishing the chemical synthesis of oxylipins used as reference materials and validation. M.C.-B. and H.P.-S. performed molecular models. S.M.-S., M.C. and S.M.-G. carried out the formal analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. M.C.-B. is a predoctoral student funded by the Plan Propio de Investigación, UCAM.

Funding: This research was funded by the *Fundación Séneca de la Región de Murcia*: 20646/JLI/18, *Jóvenes Líderes en Investigación*, the Grupo de Excelencia 19900/GERM/15, and the Spanish project AGL2017-83386-R from the Spanish Ministry of Science, Innovation, and Universities. This work is included in the framework of the collaboration between the Spanish Research Council (CEBAS-CSIC) and CNRS-University of Montpellier, as "Projets Internationaux de Cooperation Scientifique" (PICS-2015-261141). Supercomputing resources in this work have been supported by the Plataforma Andaluza de Bioinformática of the University of Málaga, by the supercomputing infrastructure of the NLHPC (ECM-02, Powered@NLHPC), and by the Extremadura Research Centre for Advanced Technologies (CETA–CIEMAT), funded by the European Regional Development Fund (ERDF). CETA–CIEMAT belongs to CIEMAT and the Government of Spain.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

References

1. Medina, S.; Gil-Izquierdo, A.; Durand, T.; Ferreres, F.; Dominguez-Perles, R. Structural/Functional Matches and Divergences of Phytosteranes and Phytofurans with Bioactive Human Oxylipins. *Antioxidants* **2018**, *7*, 165. [CrossRef] [PubMed]
2. Collado-Gonzalez, J.; Cano-Lamadrid, M.; Perez-Lopez, D.; Carbonell-Barrachina, A.A.; Centeno, A.; Medina, S.; Grinan, I.; Guy, A.; Galano, J.M.; Durand, T.; et al. Effects of Deficit Irrigation, Rootstock, and Roasting on the Contents of Fatty Acids, Phytosteranes, and Phytofurans in Pistachio Kernels. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 8915–8924. [CrossRef] [PubMed]
3. Collado-Gonzalez, J.; Medina, S.; Durand, T.; Guy, A.; Galano, J.M.; Torrecillas, A.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. New UHPLC-QqQ-MS/MS method for quantitative and qualitative determination of free phytosteranes in foodstuffs of commercial olive and sunflower oils. *Food Chem.* **2015**, *178*, 212–220. [CrossRef] [PubMed]
4. Medina, S.; Collado-Gonzalez, J.; Ferreres, F.; Londono-Londono, J.; Jimenez-Cartagena, C.; Guy, A.; Durand, T.; Galano, J.M.; Gil-Izquierdo, A. Quantification of phytosteranes—bioactive oxylipins—and phenolic compounds of *Passiflora edulis* Sims shell using UHPLC-QqQ-MS/MS and LC-IT-DAD-MS/MS. *Food Chem.* **2017**, *229*, 1–8. [CrossRef]
5. Pincioli, M.; Dominguez-Perles, R.; Abellan, A.; Guy, A.; Durand, T.; Oger, C.; Galano, J.M.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. Comparative Study of the Phytosterane and Phytofuran Content of indica and japonica Rice (*Oryza sativa* L.) Flours. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 8938–8947. [CrossRef]

6. Pincioli, M.; Dominguez-Perles, R.; Garbi, M.; Abellan, A.; Oger, C.; Durand, T.; Galano, J.M.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. Impact of Salicylic Acid Content and Growing Environment on Phytoprostane and Phytofuran (Stress Biomarkers) in *Oryza sativa* L. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 12561–12570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lipan, L.; Collado-Gonzalez, J.; Dominguez-Perles, R.; Corell, M.; Bultel-Ponce, V.; Galano, J.M.; Durand, T.; Medina, S.; Gil-Izquierdo, A.; Carbonell-Barrachina, A. Phytoprostanes and Phytofurans-Oxidative Stress and Bioactive Compounds-in Almonds are Affected by Deficit Irrigation in Almond Trees. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 7214–7225. [[CrossRef](#)]
8. Dominguez-Perles, R.; Abellan, A.; Leon, D.; Ferreres, F.; Guy, A.; Oger, C.; Galano, J.M.; Durand, T.; Gil-Izquierdo, A. Sorting out the phytoprostane and phytofuran profile in vegetable oils. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 619–628. [[CrossRef](#)]
9. Carrasco-Del Amor, A.M.; Aguayo, E.; Collado-Gonzalez, J.; Guy, A.; Galano, J.M.; Durand, T.; Gil-Izquierdo, A. Impact of packaging atmosphere, storage and processing conditions on the generation of phytoprostanes as quality processing compounds in almond kernels. *Food Chem.* **2016**, *211*, 869–875. [[CrossRef](#)]
10. Carrasco-Del Amor, A.M.; Aguayo, E.; Collado-Gonzalez, J.; Guy, A.; Galano, J.M.; Durand, T.; Gil-Izquierdo, A. Impact of processing conditions on the phytoprostanes profile of three types of nut kernels. *Free Radic. Res.* **2017**, *51*, 141–147. [[CrossRef](#)]
11. Martinez Sanchez, S.; Dominguez-Perles, R.; Montoro-Garcia, S.; Gabaldon, J.A.; Guy, A.; Durand, T.; Oger, C.; Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A. Bioavailable phytoprostanes and phytofurans from *Gracilaria longissima* have anti-inflammatory effects in endothelial cells. *Food Funct.* **2020**, *11*, 5166–5178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Campillo, M.; Medina, S.; Fanti, F.; Gallego-Gomez, J.I.; Simonelli-Munoz, A.; Bultel-Ponce, V.; Durand, T.; Galano, J.M.; Tomas-Barberan, F.A.; Gil-Izquierdo, A.; et al. Phytoprostanes and phytofurans modulate COX-2-linked inflammation markers in LPS-stimulated THP-1 monocytes by lipidomics workflow. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *167*, 335–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lara-Guzman, O.J.; Gil-Izquierdo, A.; Medina, S.; Osorio, E.; Alvarez-Quintero, R.; Zuluaga, N.; Oger, C.; Galano, J.M.; Durand, T.; Munoz-Durango, K. Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 1–11. [[CrossRef](#)]
14. Markovic, T.; Jakopin, Z.; Dolenc, M.S.; Mlinaric-Rascan, I. Structural features of subtype-selective EP receptor modulators. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 57–71. [[CrossRef](#)]
15. Petrucci, G.; De Cristofaro, R.; Rutella, S.; Ranelletti, F.O.; Pocaterra, D.; Lancellotti, S.; Habib, A.; Patrono, C.; Rocca, B. Prostaglandin E2 differentially modulates human platelet function through the prostanoid EP2 and EP3 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 391–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Paul, B.Z.; Ashby, B.; Sheth, S.B. Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells. *Br. J. Haematol.* **1998**, *102*, 1204–1211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Iyu, D.; Juttner, M.; Glenn, J.R.; White, A.E.; Johnson, A.J.; Fox, S.C.; Heptinstall, S. PGE1 and PGE2 modify platelet function through different prostanoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2011**, *94*, 9–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Philipose, S.; Konya, V.; Sreckovic, I.; Marsche, G.; Lippe, I.T.; Peskar, B.A.; Heinemann, A.; Schuligoi, R. The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 2416–2423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Matthews, J.S.; Jones, R.L. Potentiation of aggregation and inhibition of adenylate cyclase in human platelets by prostaglandin E analogues. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Heptinstall, S.; Espinosa, D.I.; Manolopoulos, P.; Glenn, J.R.; White, A.E.; Johnson, A.; Dovlatova, N.; Fox, S.C.; May, J.A.; Hermann, D.; et al. DG-041 inhibits the EP3 prostanoid receptor—a new target for inhibition of platelet function in atherothrombotic disease. *Platelets* **2008**, *19*, 605–613. [[CrossRef](#)]
21. Kuriyama, S.; Kashiwagi, H.; Yuhki, K.; Kojima, F.; Yamada, T.; Fujino, T.; Hara, A.; Takayama, K.; Maruyama, T.; Yoshida, A.; et al. Selective activation of the prostaglandin E2 receptor subtype EP2 or EP4 leads to inhibition of platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* **2010**, *104*, 796–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schober, L.J.; Khandoga, A.L.; Dwivedi, S.; Penz, S.M.; Maruyama, T.; Brandl, R.; Siess, W. The role of PGE(2) in human atherosclerotic plaque on platelet EP(3) and EP(4) receptor activation and platelet function in whole blood. *J. Thromb. Thrombolysis* **2011**, *32*, 158–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schober, L.J.; Khandoga, A.L.; Penz, S.M.; Siess, W. The EP3-agonist sulprostone, but not prostaglandin E2 potentiates platelet aggregation in human blood. *Thromb. Haemost.* **2010**, *103*, 1268–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rinder, C.S.; Student, L.A.; Bonan, J.L.; Rinder, H.M.; Smith, B.R. Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release. *Blood* **1993**, *82*, 505–512. [[CrossRef](#)]
25. Lagarde, M.; Chen, P.; Vericel, E.; Guichardant, M. Fatty acid-derived lipid mediators and blood platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2010**, *82*, 227–230. [[CrossRef](#)]
26. Jadhav, V.; Jabre, A.; Lin, S.Z.; Lee, T.J. EP1- and EP3-receptors mediate prostaglandin E2-induced constriction of porcine large cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2004**, *24*, 1305–1316. [[CrossRef](#)]
27. Shantsila, E.; Montoro-Garcia, S.; Lip, G.Y. Monocytes circulate in constant reversible interaction with platelets in a [Ca2+]-dependent manner. *Platelets* **2014**, *25*, 197–201. [[CrossRef](#)]
28. 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](#)]

29. Rao, R.; Redha, R.; Macias-Perez, I.; Su, Y.; Hao, C.; Zent, R.; Breyer, M.D.; Pozzi, A. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16959–16968. [[CrossRef](#)]
30. Lau, S.; Gossen, M.; Lendlein, A.; Jung, F. Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 978. [[CrossRef](#)]
31. Geenen, I.L.; Molin, D.G.; van den Akker, N.M.; Jeukens, F.; Spronk, H.M.; Schurink, G.W.; Post, M.J. Endothelial cells (ECs) for vascular tissue engineering: Venous ECs are less thrombogenic than arterial ECs. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2015**, *9*, 564–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Martinez-Sanchez, S.M.; Perez-Sanchez, H.; Antonio Gabaldon, J.; Abellan-Aleman, J.; Montoro-Garcia, S. Multifunctional Peptides from Spanish Dry-Cured Pork Ham: Endothelial Responses and Molecular Modeling Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hollenstein, K. Structures shed light on prostanoid signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 3–5. [[CrossRef](#)]
34. Morimoto, K.; Suno, R.; Hotta, Y.; Yamashita, K.; Hirata, K.; Yamamoto, M.; Narumiya, S.; Iwata, S.; Kobayashi, T. Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 8–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vigor, C.; Balas, L.; Guy, A.; Bultel-Poncé, V.; Reversat, G.; Galano, J.M.; Durand, T.; Oger, C. Isoprostanoids, Isofuranoids and Isoketals—From Synthesis to Lipidomics. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, *2022*, 137–149. [[CrossRef](#)]
36. van Velzen, J.F.; Laros-van Gorkom, B.A.; Pop, G.A.; van Heerde, W.L. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thromb. Res.* **2012**, *130*, 92–98. [[CrossRef](#)]
37. Hechler, B.; Cattaneo, M.; Gachet, C. The P2 receptors in platelet function. *Semin. Thromb. Hemost.* **2005**, *31*, 150–161. [[CrossRef](#)]
38. Albuquerque-Gonzalez, B.; Bernabe-Garcia, A.; Bernabe-Garcia, M.; Ruiz-Sanz, J.; Lopez-Calderon, F.F.; Gonnelli, L.; Banci, L.; Pena-Garcia, J.; Luque, I.; Nicolas, F.J.; et al. The FDA-Approved Antiviral Raltegravir Inhibits Fascin1-Dependent Invasion of Colorectal Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers* **2021**, *13*, 861. [[CrossRef](#)]
39. Albuquerque-Gonzalez, B.; Bernabe-Garcia, M.; Montoro-Garcia, S.; Bernabe-Garcia, A.; Rodrigues, P.C.; Ruiz Sanz, J.; Lopez-Calderon, F.F.; Luque, I.; Nicolas, F.J.; Cayuela, M.L.; et al. New role of the antidepressant imipramine as a Fascin1 inhibitor in colorectal cancer cells. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 281–292. [[CrossRef](#)]
40. 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](#)]
41. Tapia-Abellan, A.; Angosto-Bazarra, D.; Martinez-Banaclocha, H.; de Torre-Minguela, C.; Ceron-Carrasco, J.P.; Perez-Sanchez, H.; Arostegui, J.L.; Pelegrin, P. MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 560–564. [[CrossRef](#)]
42. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Roos, K.; Wu, C.; Damm, W.; Reboul, M.; Stevenson, J.M.; Lu, C.; Dahlgren, M.K.; Mondal, S.; Chen, W.; Wang, L.; et al. OPLS3e: Extending Force Field Coverage for Drug-Like Small Molecules. *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 1863–1874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. 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](#)]
45. Stroganov, O.V.; Novikov, F.N.; Stroylov, V.S.; Kulkov, V.; Chilov, G.G. Lead finder: An approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening. *J. Chem. Inf. Model* **2008**, *48*, 2371–2385. [[CrossRef](#)]
46. Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219–3228. [[CrossRef](#)]
47. Koynova, R.; Caffrey, M. Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1255*, 213–236. [[CrossRef](#)]
48. Tapias, D.; Sanders, D.P.; Bravetti, A. Geometric integrator for simulations in the canonical ensemble. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 084113. [[CrossRef](#)]
49. Martyna, G.J.; Tobias, D.J.; Klein, M.L. Constant pressure molecular dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 4177–4189. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.