

Bioquimia

Volumen **30**
Volume

Número **1**
Number

Enero-Marzo **2005**
January-March

Artículo:

Evaluación farmacológica de los efectos del 1-O-dodecilglicerol sintético en un modelo de angiogénesis inflamatoria

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Evaluación farmacológica de los efectos del 1-O-dodeciliglicerol sintético en un modelo de angiogénesis inflamatoria

Hélade Sotomayor-Pérez,* Miguel Bilbao-Díaz,* Beatriz González-López,* José Luis León-Álvarez,* Francisco Merchán-González,* Theudis Mosquera-Puig,* Ivones Hernández-Balmaseda,** Gabino Garrido-Garrido,** Yolanda Cristina Valdés-Rodríguez*

RESUMEN

Los éteres lipídicos (EL) representan un grupo de moléculas moduladoras de la respuesta biológica. Poseen efectos antitumorales, inmunomoduladores, antiinflamatorios y antiangiogénicos. Los 1-O-alkilgliceroles (AQG) presentan la estructura básica de los EL, lo cual pudiera explicar porqué exhiben varios de los efectos farmacológicos informados para éstos. En este trabajo se evaluaron los efectos del 1-O-dodeciliglicerol (DDG) en un modelo de angiogénesis inflamatoria de granuloma inducido por adyuvantes inoculados en una bolsa de aire subcutánea dorsal en ratas. Los parámetros medidos fueron: peso del granuloma, contenido de rojo carmín en los tejidos de éste como criterio de medición de angiogénesis, nitritos totales como medida de la producción de óxido nítrico y fosfolipasa A₂ total. El DDG disminuyó el peso del granuloma, e inhibió la neovascularización asociada, redujo los niveles de nitritos totales e inhibió la actividad de la fosfolipasa A₂ total en el modelo. Estos resultados, constituyen una pauta para profundizar en los efectos de los AQG y sus mecanismos de acción

Palabras clave: Éteres lipídicos, 1-O-alkilgliceroles, 1-O-dodeciliglicerol, angiogénesis inflamatoria, inflamación.

ABSTRACT

Ether lipids are modifiers of biological responses, its have shown antitumoral, immunomodulator, antiinflammatory and antiangiogenic effects in different experimental models. 1-O-alkylglycerols are analogues of ether lipids, because its present the basic structure of the ethers lipids with many pharmacological properties. We evaluated the effects of 1-O-dodecylglycerol (DDG) in an inflammatory angiogenesis model of adjuvants induced granulome. DDG reduced the granulome weight and the neovascularization associated to its development. Additionally, this compound reduced the levels of total nitrites, as a measure of nitric oxide production and inhibited the activity of total phospholipase A₂ in this model.

Key words: Ether lipids, 1-O-alkylglycerols, 1-O-dodecylglycerol, inflammatory angiogenesis, inflammation.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis, o neovascularización, es el proceso de formación, crecimiento y desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes¹ y es esencial en la reproducción y desarrollo normal del individuo.² Ocurre en condiciones fisiológicas como la reparación de los tejidos y el ciclo menstrual femenino¹ y en muchos estados fisiopatológicos designados como enfermedades angiogénicas, entre los que se encuentran el desarrollo de los tumores sólidos y sus metástasis, la retinopatía diabética y diversas afecciones de base inflamatoria como la artritis reumatoide y la psoriasis.^{1,3-5}

* Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana.

** Centro de Química Farmacéutica, Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia:

M en C. Hélade Sotomayor-Pérez.
5ta. A No. 8207 entre 82 y 84. Playa. Ciudad de La Habana, Cuba.
e-mail: helade@cieb.sld.cu

Apoyaron la realización de la investigación:
Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba.
Centro de Química Farmacéutica, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 15-01-2004
Aceptado: 18- 10-2004

La inflamación es la reacción de defensa del organismo frente a una lesión tisular provocada por agentes biológicos, químicos y físicos. No obstante, cuando el agente desencadenante persiste, o están deprimidos los mecanismos que regulan esta respuesta, se perpetúa cursando hacia la cronicidad con un incremento de la morbi-mortalidad de los pacientes y en múltiples ocasiones su resolución deja secuelas en el organismo.⁶

En la actualidad es generalmente aceptado que, en aras de posibilitar la ocurrencia de varios de los eventos involucrados en el proceso inflamatorio crónico, es necesaria la creación de una potente red vascular en el área inflamada a partir de vasos preexistentes. Las enfermedades inflamatorias crónicas casi siempre están acompañadas de una intensa neovascularización, apoyando la proliferación destructiva de los tejidos inflamatorios.⁷⁻⁹

Una de las estrategias terapéuticas actuales aplicada en el tratamiento de las denominadas enfermedades angiogénicas, incluyendo las de componente inflamatorio, es la inhibición farmacológica del proceso de neovascularización.

Los EL como modificadores de las respuestas biológicas introducen un nuevo concepto terapéutico en el tratamiento de múltiples enfermedades humanas ya que han mostrado diferentes efectos farmacológicos.^{10,11} Los EL sintéticos, edelfosina y s-fosfonato, han mostrado acciones antiangiogénicas en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.¹²⁻¹⁴ Los 1-O-alkilglicérols (AQG) (Figura 1), análogos estructurales de esta familia de compuestos, que conservan el grupo 1-O-alkilo de cadena larga al que se le atribuyen la mayoría de sus efectos farmacológicos,¹⁰ han mostrado algunas de las propiedades descritas para los EL.¹⁵⁻¹⁸

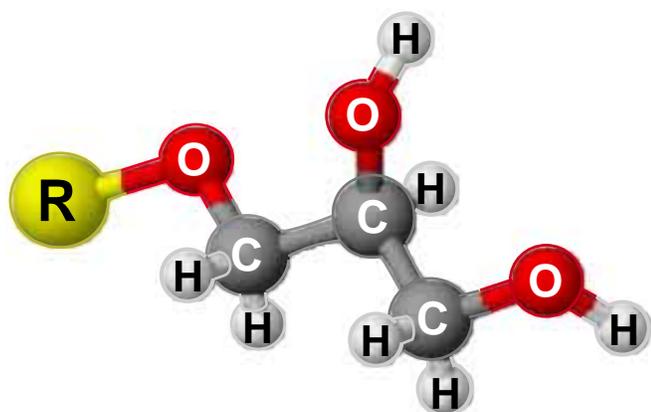


Figura 1. Estructura básica de los AQG.

Teniendo en consideración la similitud estructural de los AQG con EL más complejos, como edelfosina, miltefosina y limfosina, de los que se han descrito acciones antiinflamatorias,¹¹ antitumorales directas e indirectas^{10,11} y antiangiogénicas,^{12,13} entre otras, además de que en países desarrollados como Alemania, Estados Unidos y Francia se han empleado algunos de estos compuestos en estudios clínicos de diferente patología; se decidió estudiar los efectos del 1-O-dodeciliglicérol sintético (DDG) (compuesto de cadena lateral de 12 átomos de carbono) en un modelo de angiogénesis inflamatoria de granuloma inducido por adyuvantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material químico

El DDG fue obtenido por síntesis química en el Departamento de Química Básica del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, partiendo del 1,2-O-isopropilidenglicérol y utilizando el 1-clorododecano como derivado halogenado. Su pureza resultó mayor del 90 %.¹⁹

Preparación de las muestras

El DDG fue disuelto en solución hidroalcohólica al 10% en las cantidades apropiadas para obtener las dosis de 5, 10, 20 y 40 mg/kg; rango de concentración en el cual se ha observado efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos de los AQG sintéticos: 1-O-hexadeciliglicérol y el 1-O-octadeciliglicérol, en este modelo experimental.²⁰

Animales de experimentación

Se emplearon ratas Wistar macho con peso entre 200-270 g, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (Bejucal, Habana, Cuba), mantenidas antes y durante el experimento, en cajas adecuadas con agua y dieta peletizada *ad libitum* y temperatura e iluminación óptimas. Todos los procedimientos fueron desarrollados según lo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado de los Animales de Laboratorio y de acuerdo con las Normativas de la Unión Europea para la Experimentación Animal.

Angiogénesis mediante el modelo del granuloma inducido por adyuvantes

Para la inducción de granulomas, se empleó la técnica de Kobayashi y col.⁹ modificada al cambiar el

adyuvante completo de Freund por el adyuvante Montanide (0.8 mL) y aceite de croton (0.1%), los cuales fueron inoculados en la bolsa de aire subcutánea. A los 6 días, se sacrificaron los animales por inyección en la vena de la cola con 1 mL de solución del colorante rojo carmín (Sigma, Saint Louis, EUA), conteniendo 5% de gelatina blanca (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO. USA), previamente mantenido a 40° C en baño maría (Ultraterm, Alemania). Los animales fueron mantenidos a -4° C durante 20 min, posteriormente, se extrajeron los granulomas y se lavaron con agua destilada, antes de pesarlos en una balanza analítica (AND, Modelo ER-60A, Japón). El contenido de carmín en el tejido granulomatoso se tomó como indicativo de angiogénesis. Para medir la cantidad de colorante de los vasos formados en el granuloma, se cortó y se disolvió en 4 mL de NaOH 3 N, después se añadieron 2 mL de HCl al 37%, dejándolo reposar durante 15 min. A continuación se centrifugó a 8,500 g en una centrifuga clínica (Sigma 2K15, Alemania) durante 10 min, enseguida se filtró el sobrenadante y se midió la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro (Ultraspect Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB).

Evaluación de los efectos del DDG en el modelo de granuloma inducido por adyuvantes

Los animales se distribuyeron al azar en 6 grupos experimentales de 6 ratas cada grupo. A 5 grupos se les aplicó tratamiento 2 horas más tarde de haberseles inducido el granuloma y durante 5 días, mientras que el sexto grupo se mantuvo como control al que se le administró el vehículo. Los tratamientos consistieron en inocular por vía intraperitoneal (ip) el DDG a 5, 10, 20 y 40 mg/kg de peso y al grupo restante como control positivo, hidrocortisona a 10 mg/kg por igual vía. La evaluación de los efectos del DDG se realizó mediante el peso del granuloma y el contenido de carmín en el mismo.

Visualización de la vascularización asociada a la formación del granuloma

Se extrajo la piel que recubría la bolsa de aire, se cortó, estiró cuidadosamente y, finalmente se fotografió con una cámara digital (Epson PC). Para el procesamiento de las imágenes se empleó el programa Adobe PhotoShop 7.0 para Windows. También se fotografió el control sin granulomas.

Estimación de la producción de óxido nítrico

Para la estimación de óxido nítrico (NO) se empleó el suero de las ratas. Previo al sacrificio de los animales, se les realizó una extracción de sangre a través del plexo retro-orbital. Las muestras de sangre fueron centrifugadas (Sigma 2K15, Alemania) a 3,000 rpm durante 20 min para obtener el suero. La determinación de los niveles de nitritos totales se realizó por reducción de los nitratos a nitritos mediante la acción de la enzima nitrato reductasa inducida procedente de una cepa de *E. coli* 25922, producida por el Centro de Química Farmacéutica (La Habana, Cuba). Los nitritos totales fueron determinados mediante la reacción de Griess.²¹ Después de añadido el reactivo de Griess (1% sulfanilamida, 0.1% *N*-(1-naftil)-etilen-diamina dihidrocloruro en 0.25% de ácido fosfórico), se incubaron las muestras durante 15 min y se realizó la lectura espectrofotométrica en un lector de placas PR 521 (SUMA, Cuba), a una longitud de onda de 540 nm.²¹

Determinación de la actividad fosfolipasa A₂

La determinación de la actividad de fosfolipasa A₂ (FLA₂) se realizó en el homogenado de granuloma mediante un procedimiento estándar.²² Para ello, fue tomada una porción de 1 g de cada uno de los granulomas y colocados en un homogenizador (Edmund Bühler LBMA, Alemania) a 4 °C, con la adición de 10 mL de amortiguador KCl/histidina (Merck, Alemania) a pH 7.4, 1:10 (p/v). Posteriormente se centrifugó a 4 °C y 8500 g por 15 min, reteniendo el sobrenadante para las determinaciones de la actividad FLA₂ en el espectrofotómetro UV/visible (Ultraspect Plus Spectrophotometer, Pharmacia LKB).

La actividad de la FLA₂ fue referida a las proteínas totales en tejido granulomatoso (AE/mg de proteínas), determinadas por el método de azul de Coomassie.²³

Análisis estadístico

Se empleó el paquete de programas STATISTICA Versión 5.0 (StatSoft Inc., 1995) para Windows. Se llevó a cabo un análisis descriptivo calculándose la media y la desviación estándar. Posterior a la estadística descriptiva, se realizó la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, el análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan; para la estimación de la diferencia entre los grupos se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Angiogénesis mediante el modelo del granuloma inducido por adyuvantes

Transcurridos 6 días de la inyección de los adyuvantes, se observó un granuloma bien establecido, en todos los animales de los grupos experimentales. En el control, el peso promedio del granuloma fue de 4.97 ± 0.65 g y el contenido de rojo carmín fue de 0.103 ± 0.029 mg.

La efectividad del modelo experimental para permitir la evaluación de los efectos antiangiogénicos de un compuesto, fue comprobada al evaluar la acción de la hidrocortisona, reconocido antiinflamatorio esteroide que exhibe marcados efectos antiangiogénicos, la cual a 10 mg/kg, redujo significativamente ($p < 0.05$) tanto el peso del granuloma como el contenido de carmín en los tejidos del mismo. Este hecho permite asegurar que el modelo del granuloma inducido por Montanide y aceite de croton, es adecuado como un modelo de angiogénesis inflamatoria.

Evaluación de los efectos sobre el peso del granuloma y contenido de carmín en el modelo del granuloma inducido por adyuvantes

En el *cuadro I* se resumen los resultados obtenidos al evaluar los efectos del DDG sobre la angiogénesis inflamatoria. En éste puede observarse que el DDG inhibió significativamente ($p < 0.05$) el peso del granuloma y el contenido de carmín en los tejidos del mismo con respecto al control.

Cuadro I. Comportamiento de los parámetros peso del granuloma y contenido de carmín en los grupos experimentales. Los datos muestran la media \pm desviación estándar.

Grupo (n = 6)	Peso del granuloma.(g)	Contenido de carmín. (mg)
Control	4.97 ± 0.65	0.103 ± 0.029
Hidrocortisona (10 mg/kg)	2.95 ± 0.16 *	0.049 ± 0.010 *
DDG (5 mg/kg)	2.85 ± 0.23 *	0.047 ± 0.007 *
DDG (10 mg/kg)	2.29 ± 0.27 †	0.037 ± 0.005 *
DDG (20 mg/kg)	1.34 ± 0.32 †	0.019 ± 0.005 †
DDG (40 mg/kg)	0.97 ± 0.10 †	0.011 ± 0.002 †

ANOVA con prueba de Duncan, * \dagger $p < 0.05$ entre grupos.

Visualización de la vascularización

En la *figura 2* se muestra la vascularización de la piel de la bolsa de aire asociada al granuloma. En ésta se puede observar la inducción de la neovascularización por los adyuvantes al comparar la piel de los animales del grupo control con granuloma sin tratar (*Figura 2B*) con la de los animales del control sin granuloma (*Figura 2A*).

Como se aprecia en la *figura 2C*, en los animales tratados con DDG (40 mg/kg) se produjo una reducción de la vascularización de la piel de la zona de la bolsa de aire asociada al granuloma, lo cual se evidenció al compararla con la de los animales del control con granuloma sin tratar (*Figura 2B*).

Estimación de la producción de óxido nítrico

Como se muestra en el *cuadro II*, el DDG redujo significativamente ($p < 0.05$) los niveles de nitritos totales como medida de la producción de NO, a las dosis de 20 y 40 mg/kg de peso, en el suero de animales con granuloma inducido por adyuvantes, siendo los niveles a estas dosis similares a los obtenidos en el grupo control sin granuloma. Los porcentajes de inhibición con respecto al control con granuloma fueron de 84.21 y 86.5 respectivamente.

Determinación de la fosfolipasa A₂

En la *figura 3* se muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto del DDG sintético sobre la actividad de la enzima FLA₂t en un homogenado de granuloma inducido por adyuvantes.

Como se observa, el DDG a las dosis empleadas inhibió significativamente ($p < 0.05$) la actividad de la FLA₂t, con respecto al control. Según el análisis estadístico realizado, el grupo tratado con la dosis de 5 mg/kg se comportó de igual forma que el tratado con hidrocortisona y diferente a los que recibieron las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg, estos últimos fueron similares entre sí.

DISCUSIÓN

El granuloma es una de las formas de expresión de la inflamación crónica. El modelo del granuloma inducido por adyuvantes en una bolsa de aire subcutánea se caracteriza por la intensa neovascularización que acompaña al crecimiento granulomatoso, la que es similar a la que se presenta, por ejemplo, en el lecho reumatoide.^{7,8} Este modelo permite realizar estudios

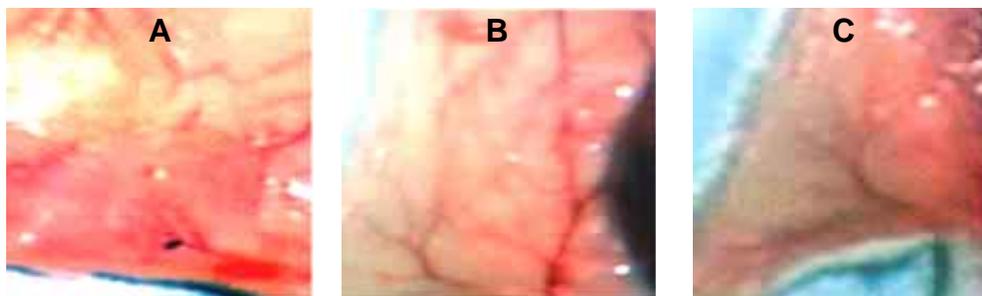


Figura 2. Vascularización de la piel de la bolsa de aire asociada al granuloma. La piel fue cortada, estirada y fotografiada con cámara digital Epson PC. 2A) Control sin granuloma, 2B) control con granuloma sin tratar y 2C) grupo tratado con DDG (40 mg/kg).

Cuadro II. Comportamiento de los niveles de nitritos totales como medida de la producción de óxido nítrico en los grupos experimentales. Los datos muestran la media \pm desviación estándar.

Grupo (n = 6)	Nitritos totales. (μ M)
Control con granuloma	212.79 \pm 5.44
Control sin granuloma	32.50 \pm 4.07 *
DDG (5 mg/kg)	211.81 \pm 4.73
DDG (10 mg/kg)	201.51 \pm 5.84
DDG (20 mg/kg)	33.60 \pm 4.20 *
DDG (40 mg/kg)	28.68 \pm 4.18 *

ANOVA con prueba de Duncan, * $p < 0.05$ contra control con granuloma.

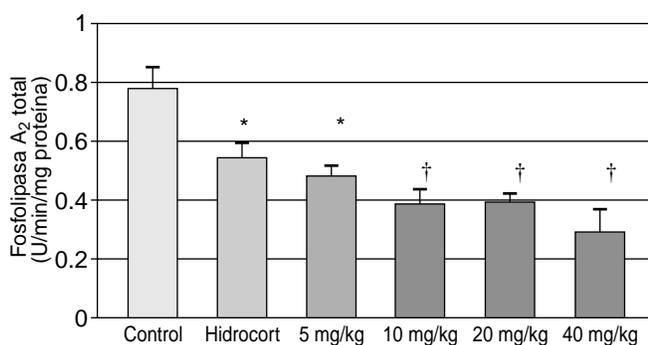


Figura 3. Efecto del DDG (5, 10, 20 y 40 mg/kg) sobre el comportamiento de la actividad de la fosfolipasa A_2 total referida como U/min/mg de proteínas totales. (n = 6). Control: granuloma de animales sin tratar, control positivo: hidrocortisona. Se representa la media \pm DE. ANOVA con prueba de Duncan, * $p < 0.05$ contra control, † $p < 0.05$ contra control, DDG (5 mg/kg) e hidrocortisona.

en dos direcciones, la reacción inflamatoria crónica y la angiogénesis asociada a ésta. La vascularización en el granuloma puede ser evaluada cuantificando el contenido de carmín en los tejidos de éste, previo haberse inyectado el colorante en la vena de la cola de los animales.^{7-9,24}

La reducción del peso del granuloma y el contenido de carmín en los tejidos del mismo por el DDG constituye una evidencia experimental de los efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos de este compuesto, resultados que coinciden con lo informado en la literatura sobre la acción antiinflamatoria^{15,16,18,25} y antiangiogénica¹²⁻¹⁴ de otros EL en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* a la vez que indica uno de mecanismos potenciales que median la acción de los AQG.

A partir de 1994, se han realizado varios experimentos con AQG de origen natural y sus análogos sintéticos que mostraron efectos antiinflamatorios^{16,18} mediante la inhibición de la actividad FLA_2 de secreción (FLA_2s) en miocitos de la íntima de la aorta de ratas hiperactivadas con $IL-1\beta$.¹⁸ Por otra parte, también se observó un efecto antiinflamatorio de éstos en el modelo de inflamación crónica del granuloma inducido por pellet de algodón mediante la reducción del peso e inhibición de la actividad FLA_2t .¹⁶

Con respecto a los efectos antiangiogénicos de los EL, ha sido demostrado que la edelfosina inhibe la formación de túbulos en las células de la microvasculatura endotelial humana (HMEC-1), exhibiendo así actividad antiangiogénica *in vitro*¹² y muestra actividad antiangiogénica *in vivo*,¹³ aunque los mecanismos exactos por los cuales este compuesto ejerce estos efectos son desconocidos. Otro EL, el s-fosfonato, constituye un potente inhibidor de la angiogénesis, lo que ha sido demostrado *in vivo* empleando el modelo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo.¹⁴

Diversos compuestos endógenos son mediadores de la reacción inflamatoria crónica y de la angiogénesis asociada o no a ésta. En la última década, el radical libre NO ha sido considerado importante en la etiología de la reacción inflamatoria. Dicho compuesto interviene en la fisiopatología de múltiples procesos, entre ellos, el choque séptico, enfermedades inflamatorias autoinmunes y otros estados patológicos. Numerosos estudios preclínicos y clínicos indican que la

sobreproducción del NO, por inducción de la actividad de la óxido nítrico sintetasa inducida (NOSi), promueve los signos clásicos de la inflamación.²⁶

Actualmente se conoce que el NO posee la capacidad de reaccionar con enzimas que contienen hierro en su centro activo y que por esta vía puede estimular la actividad de la enzima ciclooxigenasa, lo que pudiera influir en la producción de mediadores inflamatorios. Algunos de estos mediadores son inductores de angiogénesis, como es el caso de la prostaglandina E₂ (PGE₂) de la cual se conoce que estimula la proliferación de las células endoteliales microvasculares y la neovascularización *in vivo*.²⁷

Por otra parte, el NO induce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular endothelial Growth Factor*, VEGF),²⁸ uno de los mayores inductores de angiogénesis.²⁹ A su vez, ha sido informado también que el VEGF-C es capaz de estimular la liberación del propio NO desde las células endoteliales.³⁰ Adicionalmente, el conocimiento de que esta especie reactiva puede ser generada por neutrófilos, macrófagos y linfocitos, corrobora su participación en las enfermedades inflamatorias y en la angiogénesis asociada a estos estados patológicos.

La disminución de los niveles de nitritos totales, como medida de la producción de NO obtenida en este estudio en el suero de los animales con granuloma inducido por adyuvantes y tratados con el DDG sintético a las dosis de 20 y 40 mg/kg de peso, resulta de gran importancia ya que constituye una evidencia más de las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas del mismo.

La FLA₂ desempeña un papel fundamental en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria, debido a la producción de potentes mediadores pro-inflamatorios, incluyendo al araquidonato y otros mediadores lipídicos derivados y la 2-lisofosfatidilcolina. Entre los múltiples mecanismos que pudieran estar implicados en los efectos antiinflamatorios de los AQGs, la inhibición de la actividad FLA₂ parece ser el principal.^{15,18}

La diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos a 5 mg/kg y las restantes dosis del compuesto ($p < 0.05$), al evaluar los efectos inhibitorios del DDG sobre la actividad de la FLA₂, sugieren un comportamiento dosis-dependiente, lo que presupondría la existencia de un efecto mediado por mecanismos específicos. Sin embargo, en referencia a los mecanismos propuestos para la familia de los EL, resulta más lógica la idea de una acción inespecífica, con su incorporación a la membrana³¹ al presentar una estructura anfipática con dos grupos OH y una

cadena 1-O-alquilo, lo cual afectaría el estado crítico micelar variando la fluidificación de ésta y afectando la función de la FLA₂.

No obstante, la evaluación *in vitro* de la actividad de FLA₂s indica un efecto directo de los AQG;¹⁸ sin embargo, el hecho de que las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg tengan un comportamiento similar y diferente a la de 5 mg/kg pudiera ser debido a que esta última dosis no logra afectar críticamente la membrana sin tener una inhibición significativa sobre la función de la enzima.

La propiedad inhibitoria de otros AQG sobre la actividad de la FLA₂ ha sido informada en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Recientemente han sido evaluados los efectos del 1-O-hexadecilglicerol sintético (100, 200 y 400 µg/mL) sobre la actividad FLA₂s en cultivo de miocitos de la íntima de aorta de ratas, hiperactivados con IL-1β y se observó una marcada inhibición, la cual tiene lugar a dos niveles: la actividad enzimática y la biosíntesis de la proteína.¹⁸ La disminución de la expresión de la enzima por el 1-O-hexadecilglicerol sintético pudiera estar relacionada con la cascada de señalización celular que media entre la estimulación por la IL-1β y la transcripción del gen para la FLA₂s, aspecto que debe ser confirmado. Por otra parte, el 1-O-hexadecilglicerol sintético (200 y 400 µg/mL) inhibió significativamente la expresión de la FLA₂s con respecto al control utilizado (IL-1β, 10 ng/mL), lo que indica que a estas concentraciones, este AG logra inhibir la expresión de la enzima.¹⁸

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el posible mecanismo implicado en la propiedad inhibitoria de los AQG sobre la actividad de la FLA₂. Entre éstas, si consideramos que esta enzima requiere de un estado micelar para actuar sobre su sustrato y que los AQG son moléculas anfipáticas que se incorporan a las bicapas foliolipídicas de las membranas celulares, la acumulación de estos compuestos podría afectar el estado micelar crítico provocando cambios en la fluidez de la membrana y por tanto una disminución en la función de la enzima. Por otra parte, teniendo en cuenta la analogía estructural entre los AQG y la molécula base de los fosfoglicéridos se pudiera pensar que la inhibición sobre la enzima es de tipo competitiva. No se debe descartar la posibilidad de múltiples mecanismos para este efecto.¹⁸

Los efectos inhibitorios sobre la FLA₂, referidos para avalar en gran medida su acción antiinflamatoria al impedir la generación de eicosanoides, muchos de los cuales son potentes factores angiogénicos, podrían justificar en parte sus efectos antiangiogénicos. De estos eicosanoides, las prostaglandinas inducen la

expresión de VEGF, estimulando así la angiogénesis de forma directa e indirecta por mediación del incremento de la permeabilidad vascular, lo que produce alteraciones en la matriz extracelular que propician la neovascularización. Este efecto sobre la FLA₂, también limita la inflamación y reduce la angiogénesis pues impide que en el área inflamada sean liberados diferentes factores angiogénicos.

Los EL incrementan los niveles de interferón- γ (IFN- γ),³² que tiene acción antiangiogénica³³ por lo que este mecanismo pudiera intervenir en la mediación de sus efectos antiangiogénicos.

Como se puede observar, los resultados obtenidos demuestran los efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos del DDG en el modelo del granuloma inducido por adyuvantes y constituyen la primera evidencia experimental de sus efectos inhibitorios sobre la producción de NO y la actividad de la FLA₂t. Estos hallazgos reafirman la necesidad de encaminar estudios a la elucidación del mecanismo o los mecanismos de acción que median los efectos observados.

Una cuestión adicional es que anteriormente han sido referidos los efectos antitumorales directos y antiinvasivos, *in vivo*, en diferentes modelos experimentales de la mezcla de AQG proveniente de *Galeocerdo cuvieris*^{16,17} y del 1-O-hexadeciliglicerol sintético,¹⁷ así como del DDG.²⁰ Se están realizando estudios para dilucidar los posibles mecanismos de acción que median estos efectos.

En la actualidad es aceptado que el desarrollo de los tumores sólidos a partir de 2 a 3 mm³ y la formación de metástasis son fenómenos dependientes de la neovascularización.^{4,5} Estos nuevos vasos le permiten al tumor la adquisición de oxígeno y nutrientes para su desarrollo, así como la eliminación de productos de desecho de su metabolismo y la entrada de las células tumorales en la circulación para ocasionar metástasis.³³ De hecho, se reconoce que algunos citostáticos convencionales a los que se les atribuían otras propiedades, tienen acción antiangiogénica, entre ellos se destaca el metotrexate, cuyas propiedades antiangiogénicas han sido evaluadas mediante el modelo de angiogénesis inflamatoria del granuloma inducido por adyuvantes.⁷ Esto pudiera conferirle una nueva dimensión a nuestros resultados, después de demostrarse estos efectos también en modelos de angiogénesis tumoral, podrían constituir un posible mecanismo de su acción antitumoral.

REFERENCIAS

- Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis: Search and discovery. *Perspect Biol Med* 1985; 29: 10-36.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 109-131.
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
- Folkman J, Ingber D. Inhibition on angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 89-96.
- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. N Engl J Med* 1995; 333: 1157-1763.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Chapter 5. Fifth Edition. London, UK: Mosby International Ltd. 1998: 68-70.
- Jackson JR, Bolognese B, Hilleass L, Kassiss S, Adams J, Griswold DE, Winkler JD, Pharmacological effects of SB220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 687-692.
- Jackson JR, Bolognese B, Mangar CA, Hubbard WC, Marshall LA, Winkler JD. The role of platelet activating factor and other mediators in inflammatory angiogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1392: 145-152.
- Kobayashi S, Inaba K, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effects of tetrandine on angiogenesis in adjuvant-induced chronic inflammation and tube formation of vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 346-349.
- Berdel WE, Andreesen R, Munder PG. *Synthetic alkylphospholipid analogues: a new class of antitumor agents*. In: Kuo JF (Ed) Phospholipids and cellular regulation. Vol. II. Florida: CRC Press. 1985: 41-73.
- Houlihan WJ, Lohmeyer M, Workman P, Cheon S. Phospholipid antitumor agents. *Med Res Rev* 1995; 15: 157-223.
- Candal FJ, Bosse DC, Vogler WR, Ades EW. Inhibition of induced angiogenesis in human microvascular endothelial cell line by ET-18-OCH₃. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 34: 175-178.
- Vogler WR. The anticancer drug edelfosine is a potent inhibitor of neovascularization *in vivo*. *Cancer Invest* 1998; 16: 549-553.
- Jackson JK, Burt HM, Oktaba AM, Hunter W, Scheid MP, Mouhajir F, et al. The antineoplastic ether lipid, s-phosphonate, selectively induces apoptosis in human leukemic cells and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 41: 326-332.
- Burford RG, Gowdey CW. Anti-Inflammatory activity of alkoxyglycerols in rats. *Inter Pharmacodyn* 1968; 173: 56-70.
- Valdés Y. Propiedades Biológicas de los AQG de origen marino. *Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas*. 1997. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Sotomayor H. Efectos antitumorales *in vivo* de los AQG del aceite de hígado de tiburón *Galeocerdo cuvieris* y del 1-O-hexadeciliglicerol sintético. *Tesis para el título de Maestro en Ciencias*. Facultad de Biología. Universidad de la Habana 1999. p. 31-49.
- Bilbao M. Efectos antiinflamatorios de los AQG obtenidos por síntesis química. *Tesis para el título de Maestro en Ciencias*. 2001. IFAL, Universidad de La Habana.
- León J, Merchán F, Bilbao M, Nils A. Síntesis del 1-O-dodeciliglicerol. *Rev Cub Farm* 2002; 36 (Supl Esp 1): 127-129.
- Sotomayor H, Primelles FA, León JL, Merchán F, Valdés Y, González B, Mosquera T. *Efectos del 1-O-hexadeciliglicerol y 1-O-octadeciliglicerol en un modelo de angiogénesis inflamatoria*. 17^{ma} Conferencia de Química. 2002. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba: 86-88.
- Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacte-

- rial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. *Methods Comp Methods Enzymol* 1995; 7: 78-83.
22. Hotter G, León OS, Catafau-Roselló J. Tissular prostanoid release phospholipase A₂ activity and lipid peroxidation in pancreas transplantation. *Transplantation* 1991; 51: 987-990.
 23. Spector T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantification. *Anal Biochem* 1978; 86: 142-146.
 24. Colville-Nash PR, Alam CAS, Appleton I, Brown JR, Seed MP, Willoughby DA. The pharmacological modulation of angiogenesis in chronic granulomatous inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1463-1472.
 25. Bilbao M, Valdés Y, León JL, Merchán F, Santana I, Peña Y. Evaluación farmacológica de la serie homóloga de los AQP en el modelo de edema inducido por carragenina. *Rev Cub Farm* 2002; 36 (Supl Esp 1): 114-116.
 26. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 361-374.
 27. Fajardo L, Kwan H, Kowalski J, Prionas S, Allison A. Dual role of tumour necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 1992; 140: 539-544.
 28. Tuder R, Flook B, Voelkel N. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 95: 1798-1807.
 29. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinol Rev* 1997; 18: 4-25.
 30. Witzensichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 1998; 153: 381-394.
 31. Diomedede L, Llamia G, D'Incalci M, Impesatory L, Algeri M, Modest EJ. Antitumor activity of synthetic ether lipids is not enhanced by pharmacological modulation of tumor lipid composition. *Int J Cancer* 1994; 59: 561-580.
 32. Pignol B, Chaumeron S, Coulomb H, Maisonneuve T, Vandamme B, Broquet C, Mencia-Huerta JM, Braquet P. Immunomodulatory activity of two new aza alkyl phospholipid antineoplastic drugs. *Anticancer Drugs* 1992; 3: 599-608.
 33. Bollag W, Majewski S, Jablonska S. Cancer combination chemotherapy with retinoids: Experimental rationale. *Leukemia* 1994; 9: 1453-1457.

