

## **Peroxidacion de lipidos en pacientes con hipertrigliceridemia. Efecto del bezafibrato**

MARIA P. NEUMAN<sup>1</sup>, FERNANDO J. NEUMAN<sup>1</sup>, MARIA C. ROCCELLA<sup>2</sup>,  
YOLANDA MONTENERO<sup>2</sup>, JULIO E. BRUETMAN<sup>3</sup>, CLAUDIO GONZALEZ<sup>3</sup>, JOSE NEUMAN<sup>1</sup>

### **RESUMEN**

Un estudio nuestro anterior demostro que existe una fuerte correlacion entre el contenido de **lipoperbixidos de** las lipoproteinas de baja densidad (**LDL-LPO**) y **los niveles de trigliceridos** sericos (TG), asi como una correlacion inversa significativa entre LDL-LPO y el colesterol de la lipoproteina de alta densidad (HDL-C). En el presente estudio, 15 pacientes hipertrigliceridemicos fueron tratados con bezafibrato durante 8 semanas, en un intento de disminuir sus **niveles elevados** de LDL-LPO. Al finalizar el estudio, se hallaron las siguientes variaciones **significativas: LDL-LPO** (-58%,  $p < 0,002$ ), TG (-67%,  $p < 0,0001$ ), colesterol total (-19%,  $p < 0,0015$ ), colesterol de lipoproteinas de muy baja densidad (VLDL-C, -62%,  $p < 0,0002$ ), fibrinogeno (-23%,  $p < 0,01$ ), **HDL-C** (+34%,  $p < 0,0002$ ) y HDL3 (+38%,  $p < 0,0003$ ). Las reducciones paralelas de **TG y LDL-LPO**, con un incremento de **HDL-C**, refuerzan la fuerte asociacion entre estos parametros y demostraron el efecto antioxidante del bezafibrato. Este efecto, adicionado a la ya conocida reduccion de otros compuestos lipidicos y de fibrinogeno, apoyan el perfil antiaterotrombotico de este agente reductor de lipidos. REV ARGENT CARDIOL 2001; 69: 80-84.

*Palabras clave* Bezafibrato - Perbixidos lipidicos - Hipertrigliceridemia - Colesterol HDL - Aterotrombosis

### **INTRODUCCION**

Los perbixidos lipidicos (LPO) tienen un alto grado de participacion en la aterogenesis. (1) Numerosos estudios se han centrado en la oxidacion de la lipoproteina de baja densidad (LDL), pero el papel de las lipoproteinas ricas en trigliceridos, o sea, la lipoproteina de muy baja densidad (VLDL) y la (3-VLDL (2, 3) tambien fueron senaladas en el proceso oxidativo. En algunos estados patologicos, como la deficiencia de lipoproteinlipasa, la resistencia a la insulina, el alcoholismo, determinadas dislipidemias y en el estado posprandial, estas particulas transportan una cantidad considerable de colesterol, convirtiendose, por lo tanto, en factores de riesgo aterogenico, tal como se documenta en estudios epidemiologicos y angiograficos. (4, 5)

En un estudio previo (6) describimos una fuerte

correlacion entre el contenido de LDL-LPO y los niveles de trigliceridos sericos (TG). Este estudio utilizo un nuevo modelo de deteccin de LPO, desarrollado en nuestro laboratorio, el cual aplico la tecnica yodometrica de El-Saadani y colaboradores (7) a la fraccion LDL aislada por precipitacion polianionica, que tambien incluye la lipoproteina de densidad intermedia (IDL). (8) En el mismo estudio (6) tambien hallamos una fuerte correlacion inversa graficando el contenido de LDL-LPO contra el colesterol de la lipoproteina de alta densidad (HDL-C).

Con el objeto de normalizar la peroxidacion lipidica hallada en el estado hipertrigliceridemico, seleccionamos 15 pacientes con dicha condicion y los tratamos durante 2 meses con bezafibrato, un agente reductor de lipidos que demostro disminuciones sustanciales de TG e incrementos significativos de

<sup>1</sup> Instituto Privado de Enfermedades Cardiovasculares, Buenos Aires

<sup>2</sup> Instituto de la Obra Social del Ejercito, Buenos Aires

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Traducción de la publicacion realizada en *Advances in Therapy* 1998; 15: 142-150

Trabajo recibido para su publicacion: 2/00. Aceptado: 10/00

*Direccion para separatas:* Dra. Maria P. Neuman - Instituto Privado de Enfermedades Cardiovasculares, Ayacucho 685, (1026) Buenos Aires, Argentina

HDL-C. (9) También se evaluaron otros parámetros, incluido el fibrinogeno plasmático.

## MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron quince pacientes con niveles de TG de 250 mg/dl o superiores (Tabla 1). Se mantuvieron con una "dieta prudente" con un contenido calórico del 30%, el 20% y el 50% de grasas, proteínas y carbohidratos, respectivamente, con una ingestión diaria de colesterol inferior a los 300 mg y una relación de ácidos grasos poliinsaturados/saturados de aproximadamente 1. Asimismo, los pacientes fueron instruidos cuidadosamente para que evitaran la ingestión de antioxidantes y discontinuaran cualquier tratamiento con drogas reductoras de lípidos. Quedaron excluidos los individuos con disfunciones orgánicas. Tras un período *washout* de al menos 4 semanas, se trató a los pacientes con 400 mg diarios de bezafibrato "retard". Los estudios clínicos se llevaron a cabo en la semana -4 y al final del estudio. Los análisis bioquímicos se programaron para las semanas -4, 0, 4 y 8.

La extracción de sangre se realizó después de un ayuno de 12 horas y se analizaron los lípidos según la descripción anterior, (6) con la ayuda de equipos Boehringer Mannheim. Las apolipoproteínas se determinaron mediante ensayo inmunoturbidimétrico (Immunoturb; Immuno AG, Viena, Austria).

Para detectar la peroxidación de lípidos, desarrollamos una nueva técnica que adaptó el ensayo yodométrico de El-Saadani y colaboradores (7) a la fracción aislada de LDL obtenida por precipitación de polianiones (Wiener Laboratory SAIC, 2000 Rosario, Argentina). Los niveles de fibrinogeno plasmático se determinaron por duplicado por el método de Clauss (10) (Diagnostica Staco, 92600 Asnières, France).

Los valores de laboratorio obtenidos para las pruebas de seguridad incluyeron hematología (hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos blancos y diferencial), creatinina sérica, bilirrubina total, glucosa, urea, ácido úrico, aspartato y alanina aminotransferasas, fosfatasa alcalina y creatinquinasa.

### Análisis estadístico

Primero se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la distribución normal de los datos. Se analizó la significancia estadística de los datos apareados con la prueba no paramétrica de Friedman (Student-Newman-Keuls para el *test rank post hoc*) para TG, LDL-LPO, fibrinogeno, y VLDL-C, los que mostraron una distribución no normal. La significancia de los restantes parámetros distribuidos normalmente se determina por análisis de varianza (ANOVA) con la prueba Tukey *post hoc*. Se realizó el análisis computarizado mediante CSS/Statistica, versión 4.5,

Tabla 1  
Características basales de los pacientes

		Porcentaje
Edad	58,7 ± 10,0*	
Rango	39-70	
Índice masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	28,2 ± 3,2*§	
Rango	23,8-35,0	
Sexo (M/F)	8/7	
Hipertensión (n)	3	20
Diabetes (n)	5	33
Fumadores (n)	5	33
Ex fumadores (n)	3	20
Consumo alcohol* (n)	4	27
Enfermedad coronaria o arterial (n)	5	33

\* Media ± desviación estándar.

§ Pacientes con valores > 27 kg/m<sup>2</sup>: 60%.

\* MAAs de un año de abstinencia.

\* Dos o más copas diarias de vino o su equivalente en alcohol.

n: Cantidad de pacientes.

1993 (Stat Soft Corp, Tulsa, Okla, USA). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar, y la significancia se definió como  $p < 0,05$ .

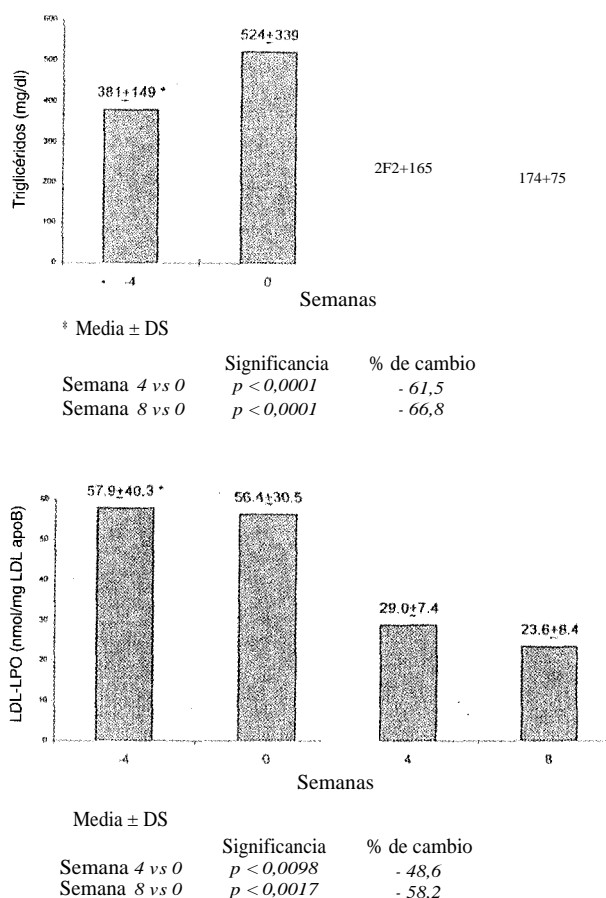


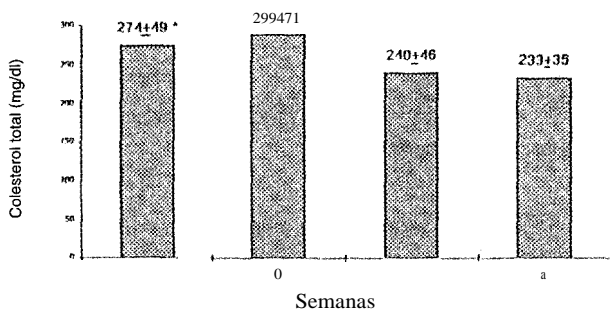
Fig. 1. Reducciones paralelas de los niveles de triglicéridos séricos (TG) y la concentración de lipoperóxidos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-LPO) en 15 pacientes en tratamiento con bezafibrato. Todos los valores representan la media ± DS.

**RESULTADOS**

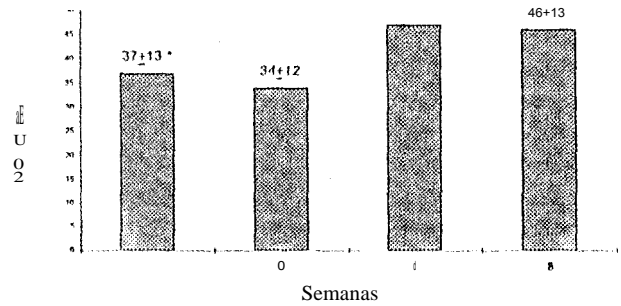
Paralelamente a la disminucion de los niveles de TG se encontro una persistente y altamente significativa reduccion del contenido de LPO-LDL. Esta reduccion, comparada con el valor inicial (semana 0), fue de alrededor del 49% ( $p < 0,0098$ ) y del 58% ( $p < 0,0017$ ), respectivamente, despues de 4 y 8 semanas de tratamiento. Como se esperaba, el tratamiento con bezafibrato tambien produjo una disminucion significativa de los niveles de TG ( $p < 0,0001$ ) a traves del estudio; a las 4 y 8 semanas se notaron

reducciones del 61% y el 67%, respectivamente (Figura 1).

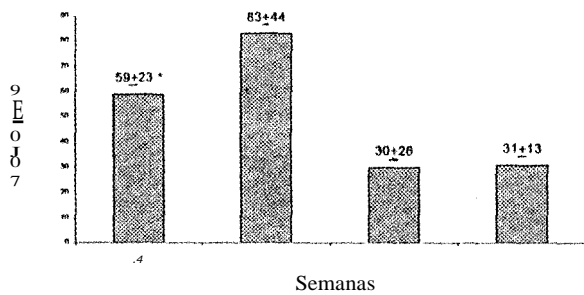
El colesterol total tambien se redujo significativamente ( $p < 0,006$  y  $p < 0,0015$ ), el 17% a y el 19%, en las semanas 4 y 8. El contenido de colesterol de VLDL mostro reducciones altamente significativas ( $p < 0,0002$ ), del 63% y el 62%, en las mismas semanas, pero el LDL-C disminuyo solo ligeramente ( $p =$  no significativo; Figura 2). La misma tendencia pudo observarse en la apolipoproteina-B total, que disminuyo en un 14% y un 11% en las semanas 4 y 8 ( $p =$  NS). La LDL-



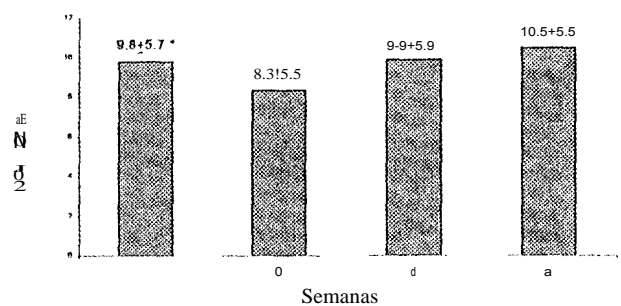
	Significancia	% de cambio
Semana 4 vs 0	$p < 0,008$	-16,9
Semana 8 vs 0	$p < 0,0015$	-12,9



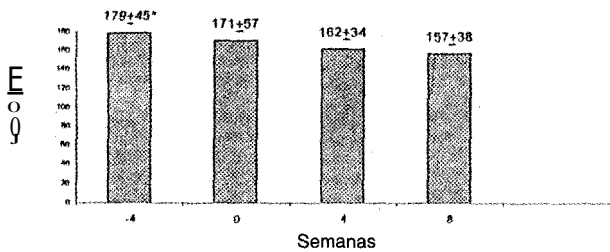
	Significancia	% de cambio
Semana 4 vs 0	$p < 0,0002$	35,4
Semana 8 vs 0	$p < 0,0002$	34,2



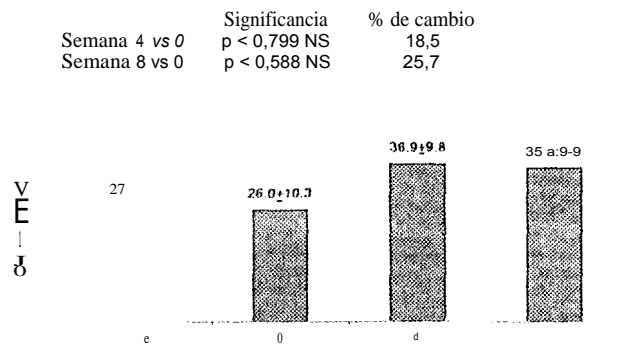
	Significancia	% de cambio
Semana 4 vs 0	$p < 0,0002$	-63,1
Semana 8 vs 0	$p < 0,0002$	-62,4



	Significancia	% de cambio
Semana 4 vs 0	$p < 0,799$ NS	18,5
Semana 8 vs 0	$p < 0,588$ NS	25,7



	Significancia	% de cambio
Semana 4 vs 0	$p < 0,885$ NS	- 5,7
Semana 8 vs 0	$p < 0,692$ NS	- 8,7



	Significancia	% de cambio
Semana 4 vs 0	$p < 0,0002$	41,9
Semana 8 vs 0	$p < 0,0003$	37,7

Fig. 2. Efectos del bezafibrato sobre los niveles totales de colesterol de lipoproteina de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteina de baja densidad (LDL). Todos los valores representan la media ± DS. NS: No significativo.

Fig. 3. Incremento del colesterol de lipoproteina de alta densidad (HDL-C) y sus subfracciones con bezafibrato. Todos los valores representan la media ± DS.

apolipoproteína-B arroja ligeras variaciones no significativas durante el estudio.

En las semanas 4 y 8 se encontraron elevaciones significativas ( $p < 0,0002$ ) del 35% y el 34% de HDL-C. Ambas subfracciones, HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>, también se incrementaron con el tratamiento, pero la significancia estadística ( $p < 0,0002$  y  $p < 0,0003$ ) se alcanzó solo con HDL<sub>3</sub>, que subió el 42% y el 38% en las semanas 4 y 8 (Figura 3). La relación colesterol total/HDL-C descendió el 38% y el 44%, de  $9,6 \pm 6,0$  a  $5,9 \pm 1,5$  ( $p < 0,001$ ), en esas mismas semanas.

El fibrinógeno se redujo significativamente después de 4 a 8 semanas de tratamiento, en un 9% ( $p < 0,05$ ) y un 23% ( $p < 0,01$ ), respectivamente.

## DISCUSION

Numerosos estudios evaluaron, hasta ahora, la susceptibilidad de LDL a la oxidación *in vitro*, lo cual no predice estrictamente el proceso *in vivo*. Con un modelo sencillo, desarrollado en nuestro laboratorio, que evita la ultracentrifugación, (6) fue posible detectar LPO en las lipoproteínas circulantes. Con el empleo de esta metodología hallamos una fuerte correlación entre la concentración LDL-LPO y TG y una correlación significativa, pero inversa, entre LDL-LPO y HDL-C.

Estos resultados impulsaron nuestra hipótesis de que, reduciendo los TG e incrementando el HDL-C, era posible contrarrestar los efectos de la peroxidación lipídica. La reducción paralela de LDL-LPO y TG alcanzada en el presente ensayo, al igual que el incremento de HDL-C, confirma nuestra especulación. Hoffman y colaboradores (11) dieron cuenta de una susceptibilidad reducida a la peroxidación lipídica inducida por sales de cobre después del tratamiento con bezafibrato, pravastatin y colestiramina. Por el contrario, Nakandakare y colaboradores, (12) con el tratamiento de bezafibrato para la hiperlipidemia mixta no hallaron reducción de la susceptibilidad de LDL a la oxidación a pesar de la modificación en la composición de LDL. El bezafibrato, sin embargo, sí redujo la tasa de degradación *in vitro* de LDL oxidada por parte de los macrófagos peritoneales del ratón.

El efecto favorable del bezafibrato sobre la dislipidemia obtenido en este estudio puede explicar la reducción sustancial (58%) de la concentración de LDL-LPO. Sin embargo, no se puede excluir la acción antioxidante directa de esta droga porque, aunque su estructura no satisface los criterios de los compuestos antioxidantes, algunos de sus metabolitos hidroxilados más polares pueden cumplirlos.

Existe una evidencia cada vez mayor de la importancia de la hipertrigliceridemia sumada a bajos niveles de HDL-C en la patogénesis de la aterosclerosis. Esta asociación se hizo notar en un seguimiento del Stockholm Prospective Study (13) (el cual con-

cluyó que los TG son factores de riesgo aterosclerótico independientes), en el estudio de Helsinki, (14) en la experiencia PROCAM (4) y en el estudio Framingham, (15) así como en la progresión de la enfermedad coronaria monitoreada angiográficamente (5) o en la evaluación ultrasonográfica de la aterosclerosis de la carótida. (16)

Los pacientes hipertriglicéridémicos de nuestro estudio eran un grupo heterogéneo con una alta incidencia de diabetes, elevado índice de masa corporal, alcoholismo, tabaquismo e hipertensión (Tabla 1). En esas entidades patológicas suele tener lugar una constelación de factores de riesgo: niveles elevados de TG y bajos de HDL-C, resistencia a la insulina y preponderancia de una subfracción densa y pequeña de LDL, la cual se considera que es una partícula aterogénica con probabilidades de sufrir oxidación y está estrechamente asociada con la resistencia a la insulina. (17,18) Los individuos con el denominado patrón B tienen una proporción mayor de esta subfracción con frecuente concomitancia de hipertrigliceridemia; ese patrón puede normalizarse con el uso de fibratos. (19) Asimismo, la LDL está protegida de la oxidación por la HDL, que lleva enzimas antioxidantes como la paraoxonasa. (20)

## CONCLUSION

El presente estudio confirmó que, después de 8 semanas de tratamiento, el bezafibrato redujo fuertemente la lipoperoxidación de la LDL (58%), los TG (67%), el colesterol total (19%), la VLDL-C (62%) y el fibrinógeno (23%), mientras que incrementó el HDL-C (34%). La reducción paralela de TG y LDL-LPO, así como la elevación de HDL-C, respaldan nuestros resultados anteriores sobre la estrecha asociación entre estos parámetros y demuestra que el bezafibrato posee un efecto antioxidante además de su actividad antiaterotrombótica.

## SUMMARY

### LIPID PEROXIDATION IN PATIENTS WITH HYPERTRIGLYCERIDEMIA

**Based on a previous study where we found a strong positive correlation between low density lipoprotein lipid peroxides (LDL-LPO) and serum triglyceride (TG) levels and a significant inverse correlation between LDL-LPO and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), 15 hypertriglyceridemic patients were treated with bezafibrate for 8 weeks, with the aim to normalize the elevated LDL-LPO levels found in these subjects. At the end of the study significant variations were found due to medical treatment: TG (-67%,  $p < 0.0001$ ), LDL-LPO (-58%,  $p < 0.002$ ), total cholesterol (-19%,  $p < 0.0015$ ),**

VLDL-C (-62%,  $p < 0.0002$ ), fibrinogen (-23%,  $p < 0.01$ ), HDL-C (+34%,  $p < 0.0002$ ) and HDL<sub>3</sub> (+38%,  $p < 0.0003$ ). **The concomitant reduction in TG and LDL-LPO levels, with a rise in HDL-C, reinforces the close association previously found between these parameters and showed an antioxidative effect of bezafibrate. The additional decrease of other lipid compounds and fibrinogen supports bezafibrate antiatherothrombotic profile.**

*Key words* Bezafibrate - Lipid peroxides - Hypertriglyceridemia - Cholesterol - Atherothrombosis

#### BIBLIOGRAFIA

- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE y col. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.
- Mohr D, Stocker R. Radical-mediated oxidation of isolated human very-low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1186-1192.
- Parthasarathy S, Quinn MT, Schwenke DC y col. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 398-404.
- Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-737.
- Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993; 88: 2762-2770.
- Neuman MP, Montenero Y, Neuman FJ y col. Screening of preformed oxidized low density lipoprotein isolated by a polyanion precipitation method. Its correlation with serum triglyceride levels. *Pharmacol Res* 1998; 37: 265-272.
- El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed M y col. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 1989; 30: 627-630.
- Demacker PN, Hijmans AG, Brenninkmeijer BJ y col. Five methods for determining low-density lipoprotein cholesterol compared. *Clin Chem* 1984; 30:1797-1800.
- Neuman MP, Kurlat MI, Neuman J. Elevation of high density lipoprotein cholesterol (cHDL) and reduction of the total cholesterol/cHDL index in the treatment of hyperlipoproteinemias lib and IV with bezafibrate. *Curr Med Res Opin* 1983; 8:358-367.
- Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 1957;17: 237-246.
- Hoffman R, Brook GJ, Aviram M. Hypolipidemic drugs reduce lipoprotein susceptibility to undergo lipid peroxidation: In vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* 1992; 93: 105-113.
- Nakandakare ER, Carvalho MDT, Lottenberg AMP y col. Bezafibrate treatment of mixed lipidemia modifies plasma LDL composition but not the Cu<sup>2+</sup>-induced TBARS production despite lowering the rate of in vitro degradation of oxidized LDL by mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis X*; October 1994; Montreal (abstract).
- Carlson LA, Bottiger LE. Risk factors for ischaemic heart disease in men and women. Results of the 19-year follow-up of the Stockholm Prospective Study. *Acta Med Scand* 1985; 218:207-211.
- Frick MH, Elo O, Haapa K y col. Helsinki Heart Study: Primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317: 1237-1245.
- Castelli WP. Epidemiology of triglycerides: A view from Framingham. *Am J Cardiol* 1992; 70:3H-9H.
- Hodis HN, Mack WJ, LaBree L y col. Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy. A randomized, controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 1996; 124:548-556.
- Graaf J, Hak-Lemmers FILM, Hectors MPC y col. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 298-306.
- Reaven GM, Chen YDL, Jeppesen J y col. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individual with small-dense low density lipoprotein particles. *J Clin Invest* 1993; 92: 141-146.
- Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ y col. Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:763-772.
- Mackness MI, Abbott C, Arrol S y col. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829-834.