



**fonacit**

**ESTA REVISTA ES  
FINANCIADA  
PARCIALMENTE POR EL  
FONDO NACIONAL  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS Y  
TECNOLOGICAS**

**Av. Universidad. Esquina El Chorro. Torre MCT.  
Teléfonos: 505.2521 - 5052561 Caracas - Venezuela**

# Efecto del diltiazem sobre los lípidos séricos y lesiones ateroscleróticas en conejos hipercolesterolemicos

Marysabel Torres, Maira Carrizales, Rosalía Sutil, Mercedes Márquez, Marielena Muñoz, Aldo Reigosa\* y Víctor Barrios\*\*.

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, Instituto Oncológico Miguel Pérez Carreño\*, CIMBUC\*\*, Universidad de Carabobo, Valencia.

Dirigir correspondencia a Marysabel Torres: Urbanización El Bosque, Av. 114 (La Ceiba), Residencias Vulcano, Torre A, Apto 3D, Valencia, Edo. Carabobo. Teléfono Oficina: 02418666530, Habitación: 02416172739, Celular: 04144368392

Correo electrónico: mtorresr@uc.edu.ve

Este trabajo fue financiado por el Proyecto 96-008 del CDCH de la Universidad de Carabobo.

Recibido: 31/03/2007

Aceptado: 15/05/2007

## Resumen

El propósito de este estudio fue evaluar si la administración de diltiazem (30mg/día/vía oral), disminuye la hipercolesterolemia e inhibe la aterosclerosis en 38 conejos machos hipercolesterolemicos. Control: Conejarina por doce semanas, A: dieta rica con 0,3% de colesterol(DH) por doce semanas. B: DH por doce semanas y desde la tercera semana hasta la duodécima diltiazem. Grupo C: DH por dos semanas y Conejarina + diltiazem desde la tercera semana hasta la duodécima y D: DH por dos semanas y Conejarina desde la tercera hasta la duodécima semana. Se determinaron Colesterol Total (CT), LDL-colesterol (LDLc) y Triglicéridos (Tg) por métodos enzimáticos. A la duodécima semana, se sacrificaron los conejos y el estudio histológico fue realizado por los siguientes métodos: 1. Hematoxilina Eosina evaluó la presencia de lesiones, 2. Gomori's: evaluó la profundidad de las lesiones 3. Computarizado: midió la extensión de las lesiones. En el grupo A y B aumentaron significativamente el CT, LDLc y Tg en relación al control en todos los periodos, a excepción de los Tg a la duodécima semana. Respecto a las lesiones ateroscleróticas, los grupos A y B presentaron lesiones tipo II, III, IV y V, el porcentaje promedio de área lesionada fue: Grupo A: 47,20%, Grupo B: 57,60%. Estos resultados permiten concluir que el diltiazem ejerce un efecto hipolipidemiante cuando se administra junto con una dieta rica en 0,3% colesterol, se confirma que una dieta adecuada es una buena estrategia para prevenir las dislipidemias y que el diltiazem no previno, ni indujo regresión de las lesiones ateroscleróticas.

**Palabras claves:** diltiazem, hipercolesterolemia, conejos.

## Abstract

Effects of diltiazem on seric lipids and atherosclerotics lesions in hypercholesterolemics rabbits.

The purpose of this study was to evaluate whether the administration of diltiazem (30mg/day/oral route) decreases hypercholesterolemia and inhibits atherosclerosis in 38 male hypercholesterolemics rabbits. Control rabbits were given a standard diet for twelve weeks; Experimental rabbits were given: Group A: 0.3% cholesterol-enriched diet (HD) for twelve weeks. Group B: HD for 12 weeks and diltiazem from week 3 until week 12. Group C: HD for two weeks and standard diet + diltiazem from week 3 until week 12. Group D: HD for two weeks and standard diet from week 3 until week 12. Biochemical assays of Total Cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDLc) and Triglycerides (Tg) were done by enzymatic methods. The rabbits were sacrificed at week 12 and a histological study was carried out using the following methods: 1. Hematoxylin-eosin for determined the presence of lesions. 2. Gomori's: determined depth of lesions. 3. Computerized: determined extent of lesions. In groups A and B, TC, LDLc and Tg increased significantly in relation to control in all periods, with the exception of Tg at week 12. Regarding atherosclerotic lesions, groups A and B presented Type II, III, IV and V; average percentages of lesion extent were : Group A: 47.20% and Group B: 57.60%. These results suggest that diltiazem exerts a hypolipidic effect when administered in conjunction with a 0.3% cholesterol-enriched diet. It was confirmed that an adequate diet is a sound preventive strategy against dyslipidemia, and that diltiazem does not prevent or induces regression of atherosclerotic lesions.

**Key words:** diltiazem, hypercholesterolemia, rabbits

En los últimos treinta años, se han acumulado evidencias tanto experimentales como clínicas que sugieren que los calcio antagonistas poseen un significativo efecto antiaterosclerótico, independiente de sus propiedades antihipertensivas<sup>1</sup>. La enfermedad arterial coronaria es una de las consecuencias de la aterosclerosis, y se considera un desorden vascular que conduce a incapacidad y muerte en la mayoría de los países desarrollados<sup>2</sup>. Entre los cambios celulares asociados a una mayor vulnerabilidad de la placa aterosclerótica esta la pérdida de la regulación del calcio y el hecho ha generado interés acerca del posible potencial efecto antiaterogénico de los calcio antagonistas<sup>3,4</sup>.

Los antagonistas de calcio son considerados fármacos de primera línea en el tratamiento de la hipertensión, su efecto protector contra la isquemia miocárdica y potencial efecto antiaterogénico ha sido demostrado en varios modelos experimentales, lo que podría contribuir a su efecto preventivo en el proceso inicial aterosclerótico<sup>5</sup>, sin embargo, los resultados son inconsistentes y controversiales, así, un estudio llevado a cabo hace más de dos décadas en conejos hipercolesterolemicos concluye que el diltiazem (2mg/Kg/día), el isradipino (2,5 mg/Kg/día) y el verapamil (0.25 mg/Kg/día) disminuyen el contenido de calcio y magnesio de la aorta, sin embargo, el efecto antiaterogénico sólo fue observado con el verapamil<sup>6</sup>. En contraposición, otro estudio realizado en 1996, en hámsters hipercolesterolemicos muestra que la administración de 45 mg/Kg/día de diltiazem concomitantemente con la dieta rica en colesterol por un mes produjo una reducción en la severidad de las lesiones ateroscleróticas a nivel de las válvulas aórticas, arterias coronarias y arco aórtico, postulándose que el diltiazem actúa en las primeras fases de la aterosclerosis bloqueando el transporte de lípidos y su acumulación en el espacio subendotelial; mientras que el tratamiento con otro calcio antagonista la nifedipina, no suprimió el efecto aterogénico de una dieta rica en grasa, lo que sugiere que no todas las drogas calcio antagonistas poseen el mismo mecanismo de acción sobre la aterogenesis<sup>7</sup>.

Estudios recientes han renovado el interés acerca del potencial efecto estabilizador que poseen los calcio antagonistas de tercera generación, tal como la amlodipina, sobre la placa aterosclerótica<sup>8</sup>, así mismo, se ha reportado que la lacidipina disminuye la progresión y número de lesiones por paciente, postulándose que esta acción antiaterosclerótica es independiente de su efecto antihipertensivo<sup>9</sup>. Basados en lo anteriormente expuesto, se planificó el siguiente trabajo cuyo objetivo fue estudiar el efecto del tratamiento con diltiazem sobre los niveles séricos de lípidos y las lesiones ateroscleróticas de conejos hipercolesterolemicos Nueva Zelanda.

Métodos

**Diseño experimental:** Se emplearon treinta y ocho conejos machos Nueva Zelanda, de 8 a 10 semanas de edad, adquiridos en el Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), fueron cuidados según las normas establecidas por el Instituto Nacional de Salud y la Oficina de Salud Pública de los Estados Unidos de América<sup>10</sup>. El Comité de Ética de Investigaciones de la Universidad de Carabobo aprobó el estudio.

Los animales fueron colocados en jaulas individuales bajo luz controlada y climatizados antes de empezar el estudio. El alimento se pesó antes de suministrarlo a los animales y 24 horas después, se determinó que la dieta diaria a recibir cada grupo sería un promedio de 150 g/ día. El aporte de agua fue ad-libitum. El periodo de experimentación fue de 12 semanas.

**Preparación de la dieta hipercolesterolemica:** se preparó semanalmente, añadiendo a la Conejarina (dieta estándar), 0,3% de Colesterol (Sigma, St. Louis, MO) y fue almacenada a 4°C hasta su uso. La dosis de diltiazem (Parke-Davis, Venezuela) utilizada fue de 30 mg diarios por vía oral la cual se administró finamente dividida con el alimento. Los animales se dividieron en cinco grupos distribuidos al azar (Tabla 1)

Tabla 1.- Clasificación de los grupos por las dietas y tratamiento recibido durante 12 semanas

GRUPO	N	0- 2 SEMANAS	3 A 12 SEMANAS
Control	6	Conejarina	Conejarina
A	8	Conejarina + 0,3% de Colesterol	Conejarina + 0,3% de Colesterol
B	8	Conejarina + 0,3% de Colesterol	Conejarina + 0,3% de Colesterol + Diltiazem
C	8	Conejarina + 0,3% de Colesterol	Conejarina + Diltiazem
D	8	Conejarina + 0,3% de Colesterol	Conejarina

**Recolección de la muestra:** Fueron extraídos 5ml de sangre de la vena marginal de la oreja de cada conejo, previo ayuno de 14 horas. Se realizaron dos tomas de básicas de sangre, (antes de comenzar la administración de la dieta hipercolesterolemica, con un intervalo de una semana entre ellas). Después de comenzar la administración de la DH se realizaron tomas de sangre a las dos, seis, nueve y doce semanas.

**Determinación de los lípidos séricos:** Las determinaciones de los lípidos séricos colesterol total (CT), colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (LDLc), y triglicéridos (Tg) se llevaron a cabo en el suero obtenido de la muestra de sangre. El CT y Tg se determinaron por el método enzimático colorimétrico directo (CHOD-PAP, Merck), la LDLc mediante la técnica modificada<sup>11</sup> que consiste en la precipitación selectiva de las LDL con heparina (Merck) en ausencia de cationes divalentes como Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup> y Mn<sup>++</sup>, manteniéndose el pH del plasma en 5,2; quedando las VLDL y las HDL en el sobrenadante.

**Estudio histopatológico:** Al final de la duodécima semana, los conejos se sacrificaron, previa anestesia con ketamina (60mg/Kg), procediéndose a la remoción de la arteria aorta abdominal. El material se lavo inmediatamente en NaCl 0.15 M a temperatura ambiente y se fijó en solución neutra de formalina al 10% por 24 horas. Las preparaciones se deshidrataron en etanol en grado creciente (70 y 100%), se incluyeron en parafina, se hicieron cortes transversales de 4 mm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina y la técnica de Gomori's, la cual se emplea para teñir las fibras elásticas, permitiendo evaluar la profundidad de la lesión<sup>12</sup>. Las preparaciones se observaron al microscopio de luz con aumentos progresivos desde 2.5 hasta 40 x 10 y las lesiones se tipificaron según la clasificación de la American Heart Association<sup>13</sup>.

**Extensión de las lesiones:** Sobre las aortas preservadas en formalina al 10% se colocó papel transparente, se dibujó el contorno de las arterias y las lesiones con un marcador para acetato, luego se tomaron fotografías de cada una de ellas con una cámara digital, para luego trasladar la información a una computadora<sup>14,15</sup>; posteriormente utilizando el programa Paint para Windows, se dibujaron por separado, los contornos y las lesiones y se grabaron en archivos separados, los cuales fueron procesados en un programa de computación diseñado (SDIAP) en la Unidad de Imágenes Medicas, CIM-BUC, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo para calcular la extensión de las lesiones con relación a la magnitud total de la aorta.

**Análisis estadístico:** Los resultados obtenidos con relación al CT, LDLc y Tg se presentan como medias  $\pm$  el error estándar (ES) y las comparaciones a los diferentes periodos se realizaron por ANOVA de una vía y el test de Tukey-Kramer (InStat, versión 3.0 for Windows). Las lesiones ateroscleróticas se agruparon según el tipo y número de lesiones, se les realizó la prueba de Fisher's, para esto, se asociaron las lesiones que presentaron los grupos, de la siguiente forma: 1. Lesiones tempranas: se sumaron las Tipo II y III. 2. Lesiones avanzadas: se sumaron las Tipo IV y V, la comparación entre los porcentajes de lesiones de los grupos se realizó mediante una "t" no pareada. La probabilidad estadística de  $p < 0.05$  fue considerada significativa en todos los casos.

## Resultados

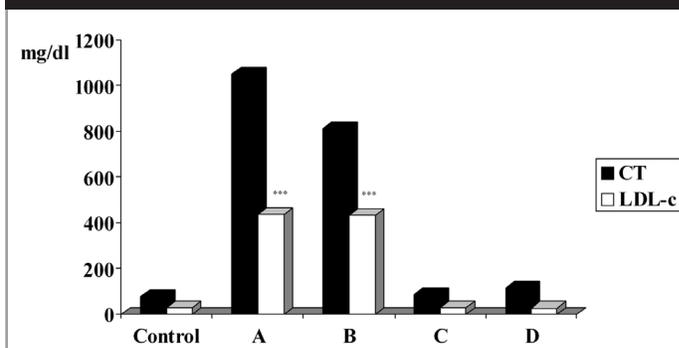
La administración de una dieta rica en 0.3% de Colesterol incremento significativamente el CT, LDLc y Tg desde las dos semanas (dato no mostrado).

**Colesterol total y LDL-colesterol (LDLc):** En los gráficos 1, 2 y 3 se observan los valores de Colesterol total y LDLc a las seis, nueve y doce semanas de experimentación, los parámetros mencionados en los grupos A (Conejarina + 0.3% de Colesterol por 12 semanas) y B (Conejarina + 0.3% de Colesterol por 12 semanas y a partir de la tercera semana, administración de diltiazem hasta la duodécima semana) mostraron un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en relación con el grupo control en los periodos ya citados, los grupos C (Conejarina + 0.3 % de Colesterol por 2 semanas, y a partir de la tercera semana suspensión de la dieta hipercolesterolemica y administración de diltiazem hasta la duodécima semana) y D (dieta hipercolesterolemica por dos semanas y a partir de la tercera semana Conejarina hasta la duodécima semana) no mostraron cambios a las seis, nueve y doce semanas, con relación al control, ni entre ellos. A las seis, nueve y doce semanas, los valores de CT y LDLc en los grupos A y B fueron significativamente mayores que C y D ( $p < 0.001$ ), y significativamente mayores en A que en B ( $p < 0.001$ ), en todos los periodos, excepto las LDLc que a las seis semanas no mostró diferencias entre los grupos A y B ,

**Triglicéridos:** En el gráfico 4, se observa que a las seis, nueve y doce semanas de experimentación el grupo A presentó, con respecto al control un incremento significativo de los niveles de Tg ( $p < 0,001$ ), el grupo B fue significativamente mayor que su control a la sexta ( $p < 0,001$ ) y novena ( $p < 0.05$ ) semana, mientras que a la duodécima semana no mostró

diferencias, a las seis, nueve y doce semanas, el grupo B, fue significativamente menor que en el grupo A ( $p < 0,001$ ), los niveles de Tg en el grupo A fueron significativamente mayores a los de los grupos C y D a la sexta, novena y duodécima semana ( $p < 0,001$ ), los valores de Tg del grupo B fueron mayores que los del grupo C ( $p < 0,01$ ) y que los del grupo D ( $p < 0,001$ ), a las seis y nueve semanas. A las doce semanas no hubo diferencias entre B y C y el grupo B fue mayor que D ( $p < 0,001$ ), a las seis, nueve y doce semanas no se observaron cambios entre los grupos C y D al compararlos con su control, cuando se comparan los grupos C y D, sólo se observó que a las 12 semanas, los Tg en el grupo C fueron significativamente mayores que en el grupo D ( $p < 0.01$ ).

**Gráfico 1 Colesterol total y LDLc a las 6 semanas de experimentación**



\*\*\*, se refiere a la comparación de CT y LDL-c en todos los grupos, en relación a su valor control

\*\*\*= $p < 0.001$

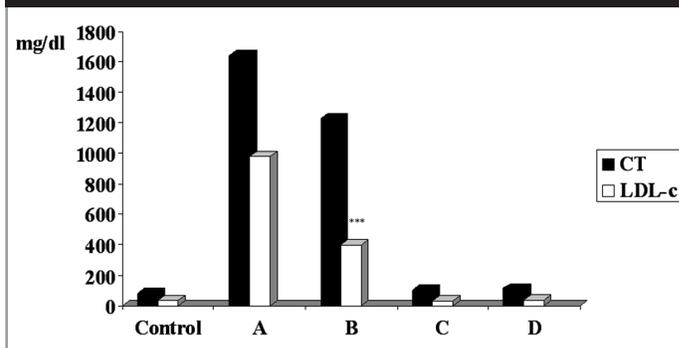
A= Conejarina+ 0,3% de colesterol durante 12 semanas

B= Conejarina + 0,3% de colesterol durante 12 semanas + diltiazem desde la tercera semana.

C= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina + diltiazem

D= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina

**Gráfico 2 Colesterol total y LDL-c a las 9 semanas de experimentación**



\*\*\*, se refiere a la comparación de CT y LDL-c en todos los Grupos, en relación a su valor control

\*\*\*= $p < 0.001$

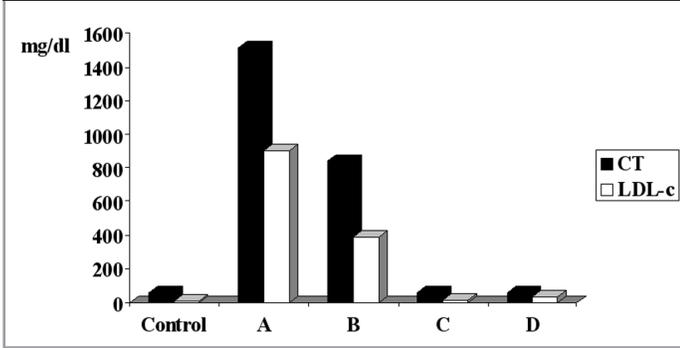
A= Conejarina+ 0,3% de colesterol durante 12 semanas

B= Conejarina + 0,3% de colesterol durante 12 semanas + diltiazem desde la tercera semana.

C= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina + diltiazem

D= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina

**Gráfico 3 Colesterol total y LDL-c a las 12 semanas de experimentación**



\*\*\*, se refiere a la comparación de CT y LDL-c en todos los grupos, en relación a su valor control

\*\*\*= $p < 0.001$

A= Conejarina+ 0,3% de colesterol durante 12 semanas

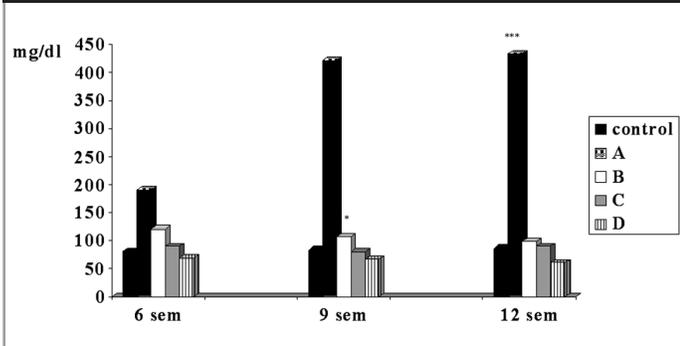
B= Conejarina + 0,3% de colesterol durante 12 semanas + diltiazem desde la tercera semana.

C= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina + diltiazem

D= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina

presentaron lesiones a nivel de las arterias, mientras que los grupos, A (Conejarina + 0,3% de Colesterol durante las doce semanas) y el B (Conejarina + 0,3% de Colesterol por 12 semanas y a partir de la tercera semana, administración de diltiazem hasta la duodécima semana) evidenciaron por medio de la tinción hematoxilina-eosina lesiones tipo II, III, IV y V las cuales se observan en las Fotos 1, 2, 3 y 4 respectivamente. En cuanto a la profundidad de las lesiones observadas en los grupos A y B, a través de la tinción de Gomoris, se observa disminución y hasta desaparición de las fibras elásticas de la capa muscular subyacente a la placa, con disrupción de dicha capa muscular y cúmulos de material lipídico, esto se presentó en todas los tipos de lesiones, acentuándose a medida que progresaban las lesiones, tal como se observa en la Foto 5, donde aparece una lesión tipo II (1) y tipo V (2). Se calculó el área de lesión de cada arteria (Tabla 2), mediante un programa computarizado SDIAPP y se determinó que los grupos A y B presentaron en gran parte de su superficie lesiones ateroscleróticas, el Grupo A presentó un promedio de 47,42% de superficie ocupada por placas ateroscleróticas y el Grupo B un 57,6% de área lesionada, no siendo esta diferencia significativa. ( $t=1.004$ ,  $p=0.3353$ ). Los resultados de la prueba de Fisher's (intervalo de 95% de confianza: 0.784 a 2.466, usando la aproximación de Katz), arrojan que cuando se comparan las lesiones tempranas y avanzadas de los grupos A y B la diferencia entre las fracciones fue 0.1923, por lo que no hubo diferencias significativas entre estos.

**Gráfico 4 Triglicéridos a las seis, nueve y doce semanas de experimentación**



\*\*\* y \* se refiere a la comparación de Tg en todos los grupos, en relación a su valor control

A= Conejarina+ 0,3% de colesterol durante 12 semanas

B= Conejarina + 0,3% de colesterol durante 12 semanas + diltiazem desde la tercera semana.

C= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina + diltiazem

D= Conejarina + 0,3% de colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de DH y conejarina

**Tabla 2.- Tipo de lesiones ateroscleróticas y porcentaje de superficie de la arteria dañada**

Grupos	Estudio Histopatológico (Tipo de lesiones)*	Determinación de la superficie dañada (%) **
Control	Sin lesiones	0
Grupo A: Dieta 0,3% Colesterol por 12 semanas	A1 = tipo II,III,IV A2 = tipo II A3 = tipo III,IV A4 = tipo II,III,IV A5 = tipo III, V A6 = tipo II,III	A1 = 62,35 A2 = 29,64 A3 = 58,13 A4 = 45,61 A5 = 33,12 A6 = 55,68 Promedio 47,42
Grupo B: Dieta 0.3% de Colesterol por 12 semanas y Diltiazem a partir de la 3ra semana	B1**= tipo IV B2= tipo II,IV,V B3= tipo II,III,IV B4= tipo II,III,IV B5= tipo II,III,IV,V B6= tipo II,IV B7= tipo II,V B8= tipo II,IV	B1= 25,77 B2= 78,77 B3= 62,09 B4= 60,61 B5= 45,63 B6= 34,30 B7= 94,94 B8= 58,69 Promedio= 57,60
Grupo C: Dieta 0,3% de Colesterol por dos semanas. Diltiazem + Conejarina entre las 3ra y 12ava semanas	Sin lesiones	0
Grupo D: Dieta 0.3% de Colesterol por dos semanas y Conejarina entre la tercera y doceava semana	Sin lesiones	0

\* Clasificación de la American Heart Association, 1995. (Stary y col., 1995)

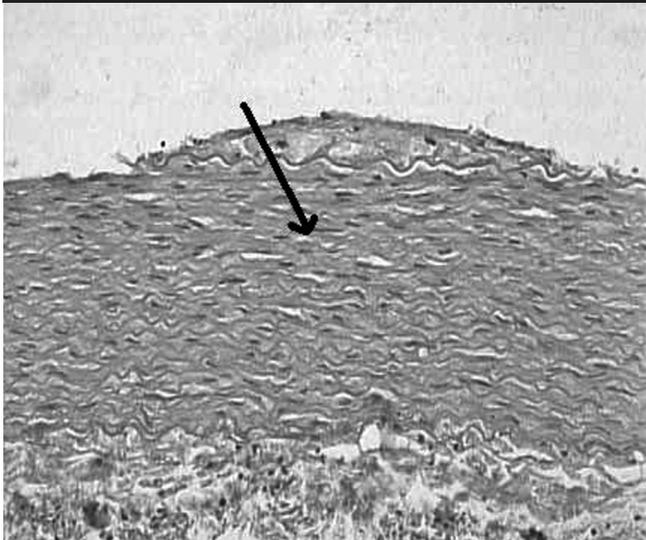
\*\*Método descrito en el texto.

A1-A6: representa cada conejo de ese grupo

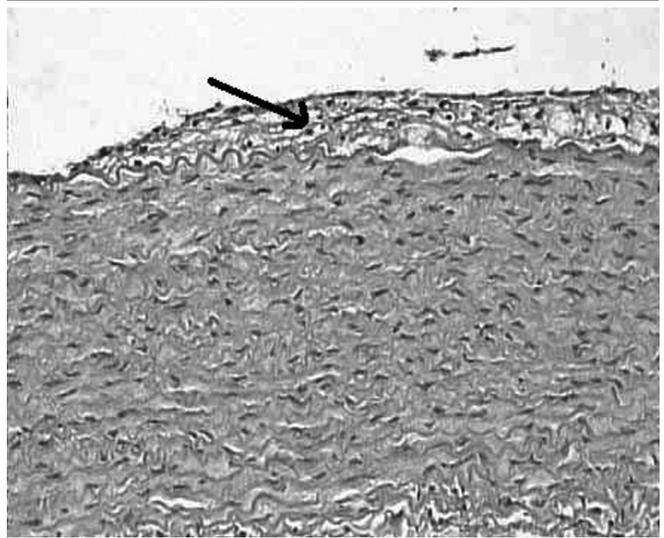
B1-B8: representa cada conejo de ese grupo

**Lesiones ateroscleróticas:** el estudio anatomopatológico (Tabla 2) reportó que los grupos control, C (Conejarina + 0.3 % de Colesterol por 2 semanas, y a partir de la tercera semana, suspensión de la dieta hipercolesterolemica y administración de diltiazem hasta la duodécima semana) y D (dieta hipercolesterolemica por dos semanas y a partir de la tercera semana Conejarina hasta la duodécima semana) no

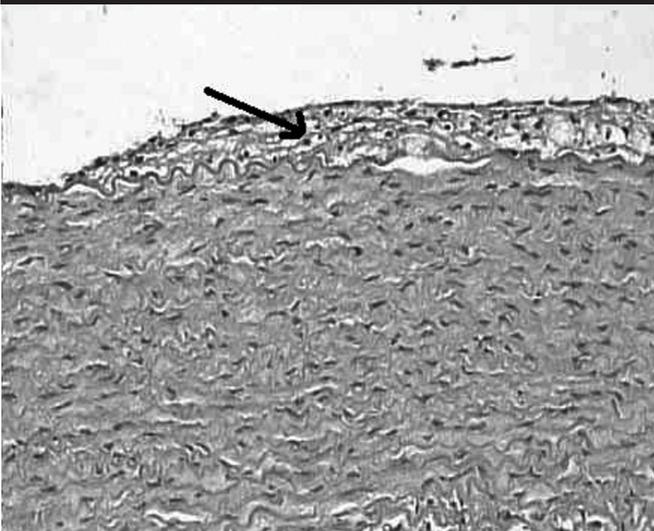
**FOTO 1: Lesión Tipo II en la que se observan células espumosas y estrías lipídicas (Tinción hematoxilina-eosina. 200X)**



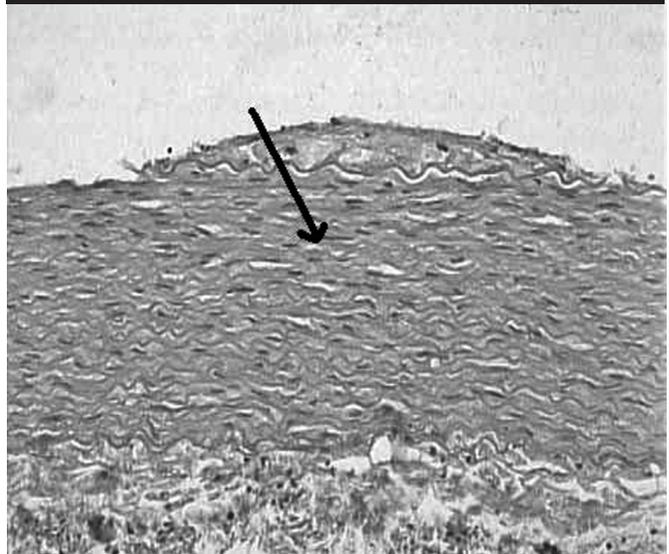
**FOTO 3: Lesión Tipo IV: (Ateroma): donde se aprecia una densa acumulación de lípidos extracelulares y dentro de los macrófagos, que junto con las células del músculo liso proporcionan agregados de células espumosas que se observan como rayos de grasa o focos lipídicos. (Tinción hematoxilina-eosina. 100X)**



**FOTO 2: Lesión Tipo III la cual se caracterizan por células espumosas rodeadas de pequeñas gotas de lípidos intracelulares en escasa cantidad. (Tinción hematoxilina-eosina. 200X)**



**FOTO 4: Lesión Tipo V: (fibroateroma): Se observa una proliferación celular considerable y formación de tejido fibroconectivo, para originar las placas fibrosas o fibroateroma. (Tinción hematoxilina-eosina. 100X)**



El objetivo de esta investigación fue evaluar los posibles efectos hipolipidemiantes y antiaterogénicos del diltiazem a la dosis de 30 mg. diarios. En este estudio, los hallazgos obtenidos indican que la administración de una dieta rica en 0,3% de colesterol incrementó significativamente el CT, LDLc y Tg a las seis, nueve y doce semanas, por otra parte, la incorporación de diltiazem a las dos semanas de estar recibiendo la dieta rica en 0.3% de colesterol disminuyó significativamente el CT, LDLc y Tg a las seis, nueve y doce semanas, lo que indica que el diltiazem administrado junto con una dieta enriquecida en 0.3% de colesterol puede contribuir a disminuir la hipercolesterolemia inducida por esta dieta, estos resultados concuerdan en parte con un estudio<sup>16</sup> realizado en hámsters, a un gru-

po se les administró concomitantemente una dieta enriquecida con 3% de colesterol y 45 mg/kg de diltiazem + 20 mg/kg de enalapril y otro grupo de hámsters, solo recibió enalapril y encontraron que solo en el grupo en que asoció diltiazem mostró efecto hipocolesterolemico, así mismo, un estudio realizado en 1991<sup>17</sup>, en conejos con igual dosis de diltiazem a la usada por nosotros, reporta disminución de los lípidos séricos y una correlación positiva de estos con los peróxidos lipídicos plasmáticos y el contenido de calcio en la intima media de la aorta, parámetros que no fueron controlados en esta investigación, igualmente, otro trabajo realizado en 1988, reporta disminución de la LDLc y del contenido de calcio de la aorta a las 5 y 10 semanas de tratamiento con diltiazem<sup>18</sup>.

La disminución de los lípidos séricos observada en este estudio podría estar mediada por la hormona paratiroidea, ya que se ha asociado, el bloqueo de los canales de calcio con disminución de los niveles de esta y menos dislipidemia<sup>19</sup>, sin embargo en este estudio no se midieron niveles de la citada hormona.

En contraste con los resultados de esta investigación, dos estudios relativamente recientes, de Tzivoni y Sobal, en el 2001<sup>20,21</sup>, no encontraron que el diltiazem tuviese un efecto hipolipidemiante como el que se mostró en este trabajo de investigación,

En este estudio, es necesario resaltar que si bien se observó una disminución del CT y LDLc en los conejos que recibieron diltiazem concomitante con la dieta hipercolesterolemica (grupo B), esta disminución nunca fue superior a la encontrada en el grupo C (Conejarina + 0.3 % de Colesterol por 2 semanas, y a partir de la tercera semana, suspensión de la dieta hipercolesterolemica y administración de diltiazem hasta la duodécima semana), sin embargo, cuando se comparó el grupo C con el grupo D (dieta hipercolesterolemica por dos semanas y a partir de la tercera semana, suspensión de la dieta hipercolesterolemica y Conejarina hasta la duodécima semana), no se observan diferencias significativas, por lo que los resultados del grupo C no se puede atribuir al diltiazem, sino a la suspensión de la dieta hipercolesterolemica, de ahí, que la puesta en practica de adecuados hábitos dietéticos sigue siendo una muy buena medida para evitar las dislipidemias, las cuales constituyen un importante factor de riesgo para enfermedad cardiovascular.

En el presente estudio, los grupos A (Conejarina + 0,3% de Colesterol por 12 semanas) y el B (Conejarina + 0,3% de Colesterol por 12 semanas y a partir de la tercera semana, administración de diltiazem hasta la duodécima semana) no mostraron diferencias en cuanto a la extensión de las lesiones, por lo que no hubo prevención de la formación de lesiones, por otra parte, los grupos C (Conejarina + 0,3% de Colesterol por 2 semanas y a partir de la tercera semana, suspensión de la dieta hipercolesterolemica y administración de diltiazem hasta la duodécima semana) y D (dieta hipercolesterolemica por 2 semanas y a partir de la tercera semana suspensión de la dieta hipercolesterolemica y Conejarina hasta la duodécima semana) no presentaron diferencias en cuanto a las lesiones ateroscleróticas, lo que evidencia que el efecto de regresión observado en estos grupos, no se debe al diltiazem, sino a la dieta y corrobora que esta es una medida valida para inducir regresión de las lesiones ateroscleróticas

De ahí que, en relación a la actividad antiaterogénica del diltiazem, los resultados arriba mencionados señalan que no hubo ni prevención, ni regresión de la placa aterosclerótica una vez establecida la misma, lo cual concuerda con otros estudios, uno de ellos<sup>22</sup>, concluye que ni en las arterias, ni en órganos afectados de conejos hipercolesterolemicos se evidencia prevención de la acumulación del colesterol por los calcio antagonistas, otro estudio in vitro realizado por, Sobal, Menzel y Sinziger, 2001<sup>21</sup>, acerca la acción del diltiazem en la oxidación de las LDLc concluye que este fármaco no previene la formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y por ende no previene la oxidación de las LDLc, el cual es considerado un estímulo aterogénico.

Así mismo, un estudio más reciente plantea que las drogas que carecen de carga positiva, tales como el diltiazem, felodipina, nifedipina y verapamil no tienen efecto sobre las propiedades de agregación de las LDL y formación de las células espumosas, mientras que las cargadas positivamente como la amlodipina en cambio, si disminuyen la agregación de las LDL, así, las propiedades electrostáticas de los bloqueantes de los canales de calcio podrían representar un novel mecanismo de su acción antiaterosclerótica<sup>23</sup>.

En contraste, con nuestros resultados, hay autores como Napoli y col., 1992 que defienden el efecto antiaterosclerótico del diltiazem<sup>24</sup>, describen que el diltiazem in vitro inhibe la oxidación de las LDLc, el cual puede ser un mecanismo que contribuya al efecto antiaterogénico in vivo de este fármaco, efecto que no se observo en este estudio. En ese mismo orden de ideas, Atkinson en 1997<sup>25</sup>, indica que el diltiazem presenta un efecto de preservación del endotelio arterial. Mas recientemente<sup>26</sup>, en un estudio planimétrico e histológico con diltiazem en aortas de pollos ateroscleróticos se encontró una reducción significativa de la deposición de lípidos en la aorta y una disminución en la extensión y distribución de las lesiones ateroscleróticas.

De ahí, que si bien estos resultados muestran que el diltiazem administrado concomitante con una dieta hipercolesterolemica disminuye el aumento de los lípidos inducido por dicha dieta, aunque no mostró efecto antiaterosclerótico, por lo que se hace necesario profundizar en este sentido, y considerar valorar otros parámetros: niveles de la hormona paratiroidea, LDL oxidadas, medición de calcio en la aorta, etc, además, se debería planificar estudios con períodos de experimentación y/o dosis de diltiazem mayores, por supuesto, considerando que no induzcan trastornos cardiovasculares en los animales de experimentación, para de esta manera contribuir a esclarecer el mecanismo hipolipidemiante del diltiazem observado en el presente trabajo y porque este efecto no se acompañe de una acción antiaterosclerótica .

#### **Agradecimientos:**

Al CDCH-UC por la subvención para hacer posible este trabajo, al Laboratorio Parke-Davis quien por medio del Señor Carlos Fraile nos proporciono generosamente el diltiazem, a la Técnico Nubia Zurita, quien realizó el procesamiento de las muestras para el estudio histológico, a los señores Robinsón Oviedo y Luis Lara por su valiosa asistencia en el cuidado y mantenimiento de los animales.

## Referencias

1. Mancini GB. **Antiatherosclerotic effects of calcium channel blockers.** *Prog. Cardiovasc Dis.*2002; 45(1):1-20.
2. Mason RP. **Mechanism of plaque stabilization for the dihydropyridine calcium channel blocker amlodipine: review of the evidence.** *Atherosclerosis* 2002;165(2):191-199.
3. Mason RP. **Mechanism of atherosclerotic plaque stabilization for a lipophilic calcium antagonist amlodipine.** *Am J Cardiol.* 2001, 21:88(10A):2M-6M.
4. Simon A, Levenson J. **Effects of calcium channel blockers on atherosclerotic: new insights.** *Acta Cardiol.* 2002; 57(4):249-255.
5. Zannad F. **Effects of calcium antagonist on atherosclerosis progression and intima media thickness.** *Drugs.* 2000, 59 spec 2: 39-46.
6. Drabkova E, Lazarova Z, Edelsteinova S, Czirfusz A, Gratzlova J, Holub P. **The effect of calcium antagonists on total calcium and magnesium levels in the aorta of rabbits after administration of dietary of cholesterol.** *Cas Lek Cesk.* 1992,13; 131(5):146-148.
7. Raicu M, Pojoga L, Simionescu N, Simionescu M. **Differential effect of two calcium channel blockers-nifedipine and diltiazem-on atherogenesis in hypercholesterolemic hamster.** *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1996, Apr.; 28(2):265-275.
8. Mason RP. **Mechanism of plaque stabilization for a charged calcium channel blocker in coronary artery disease.** *Pharmacotherapy*, 2001a, 21(9Pt2), 209S-215S.
9. Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancina G, Dal Palu C et al. **Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long- term trial.** *Circulation*,2002;106(19),2422-2427.
10. **Guide for the care and use of animals.** Institute of Laboratory Animal Resources. 1996. National Research Council, National Academy Press, Washington DC, USA.
11. Wieland H, Seidel DA. **Simple specific method for precipitation of low density lipoproteins.** *J. Lip.Res.* 1983, Vol. 24: 904-909.
12. Luna, Lee. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.**1968, Editions McGraw Hill. New York. USA. Cap. 1- 4: 1-37
13. Stary HC, Chandler, B., Dinsmorer R., Fuster V. **A definition of advanced types of atherosclerotics lesions and histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association.** *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 1995, Vol 15(9): 1512 – 1531.
14. Kouzuma, R; Tasaki, H; Komura, T; Nakashima, Y; Kuroiwa, A; Tanimoto, A; Koide, O. **Combined treatment of probucol with diltiazem regresses atherosclerosis induced by 196 cholesterol diet in rabbit aorta.** *Artery.* 1995, 21(6):337 –351.
15. Schwenke D C, Barh S. **Vitamin E combined with selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemia rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations.** *Circ. Res.* 1998, 83:366-377.
16. Raicu, M; Pojoga, L; Simionescu, N; Simionescu, M. **The effect of ACE inhibitors on atheroma formation is potentiated by association with a calcium channel blocker. A biochemical and ultrastructural study.** *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1997, 29(3):317- 328.
17. Zhang Y. **The effects of nifedipine,diltiazem and Paeonia lactiflora Pali on atherogenesis in rabbits.***Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*,1991;19(2):100-103.
18. Sugano M.Nakashima Y,Tasaki H, Tagasgi M,Kuroiwa A,Koide O. **Effect of diltiazem on supresión and regresión of experimental atherosclerosis.***Br J Exp Pathol*, 1988;86(9):513-523.
19. Gadallah MF,el-Shahawy M, Andrews G, Ibrahim M, Randeem G, Hanna D, Gorospe W, Morkos A, Abassian M , Moles K. **Factors modulating cytosolic calcium. Role in lipid metabolism and cardiovascular morbidity and mortality in peritoneal dialysis patients.***Adv. Pert Dial*,2001,17:29-36.
20. Tzivoni D. **End organ protection by calcium channel blockers.** *Clin Cardiol*,2001 24(2): 102-106.
21. Sobal G, Menzel EJ, Sinziger H. **Calcium antagonist as inhibitors of in vitro low density lipoprotein oxidation and glycation.** *Biochem Pharmacol.*2001, 61(3): 373-379.
22. Frey, M; Just, H. **Role of calcium antagonists in progression of arteriosclerosis. Evidence from animal experiments and clinical experience. Part I. Preventive effects of calcium antagonist in animal experiments.** *Basic Res Cardiol.*1994 89 Suppl 1:161 – 176.
23. Phillip JE,Preston Mason R.**Inhibition of oxidized LDL aggregation with the calcium channel blocker amlodipine: role of electrostatic interactions.** *Atherosclerosis*,2003;168(2):239-244.
24. Napoli, C.; Ambrosio, G.; Chiariello, P; Chiariello, M. **Calcium channel blockers inhibit human low density lipoprotein peroxidation induced by oxygen free radicals in vitro.** *Cardiologia.* 1992,37(11):801-4.
25. Atkinson JB. **Accelerated arteriosclerosis after transplantation, the possible role of calcium channel blockers.** *Int J Cardiol.*1997, Suppl 2: S125-34.
26. García Perez B, Ayala I, Castells MT, Madrid JF, Ortega MR, Ortega JV, Ballesta J, Fernandez Pardo J, Valdes M. **Planimetric and histological study of the aortae in atherosclerotic chickens treated with nifedipine, verapamil and diltiazem.***Histol Histo Pathol*, 2003, 18(4):1027-1033.