



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

“Estandarización de RT-qPCR para la evaluación de niveles de expresión de APOA-V en pacientes diagnosticados con hipertrigliceridemia tratados con electroacupuntura más moxibustión vs los tratados con bezafibrato”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

SERRANO BOLAÑOS CARLA FATIMA

ASESORA EXTERNA:

DRA. VIRGINIA SÁNCHEZ MONROY

ASESORA INTERNA:

DRA. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres porque sin ellos prácticamente quien escribe este trabajo no existiría, a mis hermanas y sobrinos por ser uno de los tantos pilares en mi vida.

A cada uno de los profesores que me alentaron y sembraron la interrogante del ¿Qué pasaría? desde que comencé mi carrera estudiantil.

A las Dras. Maritere Domínguez y Virgilia Sánchez, ya que sin su apoyo y conocimiento este trabajo no se desarrollaría, nuevamente a la Dr. Maritere Domínguez quien es un claro ejemplo de lo que debería ser la docencia en nuestro país, pues sin sus enseñanzas el maravilloso mundo de la Genética Molecular sería desconocido para mí.

A cada uno de mis amigos por el simple pero sumamente importante hecho de estar.

ÍNDICE

1. GLOSARIO	1
2. ABREVIATURAS	4
3. RESUMEN.....	6
4. MARCO TEORICO	8
1. DISLIPIDEMIA E HIPERTRIGLICERIDEMIA	8
1.1. <i>Definición</i>	8
1.2. <i>Clasificación y mecanismo.</i>	8
1.3. <i>Signos y síntomas</i>	9
1.1. <i>Diagnostico</i>	9
1.4. <i>Tratamiento</i>	10
1.1. <i>Prevención y profilaxis</i>	10
1.5. <i>Incidencia a nivel Mundial</i>	11
1.6. <i>Incidencia en México</i>	11
2. LIPOPROTEÍNAS.....	12
2.1. <i>Definición</i>	12
2.2. <i>Clasificación</i>	13
3. METABOLISMO LIPIDICO	15
3.1. <i>Definición</i>	15
3.2. <i>Vía exógena</i>	15
3.2.1. <i>Lipoproteína lipasa (LPL)</i>	18
3.3. <i>Vía endógena</i>	21
3.3.1. <i>Receptor LDL</i>	23
3.3.2. <i>Lipoproteína (a)</i>	24
4. APOLIPROTEINAS	24
4.1. <i>Apolipoproteína AV</i>	25
5. GEN APOAV / APOA5.....	27
6. HIPOLIPEMIANTES	28
6.1. <i>Derivados del ácido fíbrico o fibratos</i>	29
6.2. <i>Farmacocinética</i>	29
6.3. <i>Farmacodinamia</i>	30
6.4. <i>Efectos secundarios</i>	32

7. MEDICINA TRADICIONAL CHINA (MTCH)	32
7.1. <i>Acupuntura</i>	33
7.2. <i>Electro-acupuntura</i>	33
7.3. <i>Moxibustión</i>	34
8. MTCH Y LAS DISLIPIDEMIAS	34
8.1. <i>TRATAMIENTO</i>	36
9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	37
9.1. <i>PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)</i>	39
9.2. <i>qPCR con reverso transcripción (RT-qPCR)</i>	40
5. JUSTIFICACIÓN.....	41
6. OBJETIVOS.....	42
6.1. <i>General</i>	42
6.2. <i>Particulares</i>	42
7. ANTECEDENTES.....	43
8. MATERIAL Y MÉTODOS	44
8.1. <i>Grupo de estudio</i>	44
8.2. <i>Datos antropométricos</i>	45
8.3. <i>Toma de muestra y perfil lipídico</i>	45
9. ANÁLISIS MOLECULAR	46
9.1. <i>Extracción de RNA</i>	46
9.2. <i>Cuantificación de RNA por espectrofotometría</i>	47
9.3. <i>Integridad del RNA</i>	48
9.3.1. <i>Tratamiento de muestras</i>	48
9.3.2. <i>Electroforesis</i>	49
9.4. <i>Síntesis de cDNA para la amplificación en tiempo real</i>	50
9.5. <i>Estandarización de genes endógenos y problema en qPCR</i>	51
9.5.1. <i>Condiciones de ensayo de PCR</i>	51
9.5.2. <i>Reactivos de ensayo</i>	52
9.5.3. <i>Modificación en las concentraciones de cDNA empleada para la estandarización de la amplificación de un fragmento del gen endógeno Actina y GAPDH</i>	53
9.5.4. <i>Modificación en las concentraciones de cebadores y cDNA empleados en la estandarización de APOAV</i>	54

9.6.	<i>Curvas de disociación de los genes amplificados</i>	56
9.7.	<i>Reproducibilidad y especificidad de la técnica</i>	56
9.8.	<i>Método de cuantificación</i>	57
9.9.	<i>Selección del control endógeno</i>	58
9.10.	<i>Eficiencia de la amplificación</i>	58
9.11.	<i>Análisis estadístico</i>	59
10.	RESULTADOS	60
11.	DISCUSIÓN.....	77
12.	CONCLUSIÓN.....	82
13.	RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	83
14.	REFERENCIAS	84

1. GLOSARIO

Acupuntura: Método clínico-terapéutico no medicamentoso, que consiste en la inserción de agujas metálicas esterilizadas de cuerpo sólido en puntos específicos sobre la superficie del cuerpo humano.

Apolipoproteína: Proteína estructural y funcional de las partículas lipoproteicas, encargadas del transporte de lípidos a órganos diana y tejidos del organismo carentes de componentes lipídicos, activan o inhiben enzimas involucradas en el metabolismo lipídico.

Apolipoproteína AV: Apolipoproteína codificada por el gen APOA5, encargada de la regulación de niveles plasmáticos de triacilglicéridos.

APOAV: Gen encargado de la expresión de la apolipoproteína AV, ubicado en el cromosoma 11q23.

Bezafibrato: Fármaco hipolipemiante, derivado del ácido fibríco.

Colesterol: Molécula esteroidea, formada por cuatro anillos hidrocarbonados más una cadena alifática de ocho átomos de carbono.

Colesterol HDL: Concentración de colesterol contenido en las lipoproteínas de alta densidad.

Colesterol LDL: Concentración de colesterol contenido en las lipoproteínas de baja densidad

Dislipidemias: Alteración de la concentración normal de los lípidos en la sangre.

Electroacupuntura: Método de estimulación acupuntural en la cual se aplica una corriente eléctrica a las agujas de acupuntura para estimular un acupunto, con fines biológicos y terapéuticos específicos.

Hipolipemiantes: Medicamentos que reducen los niveles de lípidos en la sangre.

LDH: Lipoproteínas de alta densidad, participan en el transporte reverso del colesterol, es decir, de los tejidos diana hacia el hígado para su excreción o reciclaje.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad, transportan el colesterol a tejidos diana, su elevación favorece la aparición de aterosclerosis y por lo tanto de problemas cardiovasculares.

Moxibustión: Método terapéutico no invasivo que forma parte de la Medicina Tradicional China (MTCH), por medio del cual se tratan y previenen las enfermedades a través de la aplicación de calor sobre puntos específicos de acupuntura, canales, colaterales, áreas o zonas de acupuntura.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, PCR, por sus siglas en inglés, se trata de una técnica molecular, basada en la replicación enzimática del DNA, empelada en laboratorios, cuyo objetivo y función es obtener mediante amplificación “*in vitro*” grandes cantidades de DNA.

qPCR: Variante del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, esto se logra incorporando una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción.

RT-PCR: Técnica de amplificación enzimática *in vitro*, que permite amplificar un fragmento específico de DNA proveniente de RNA a través de la previa síntesis de su cDNA situado entre dos regiones

Síndrome metabólico: Conjunto de anormalidades bioquímicas, fisiológicas y antropométricas, que ocurren simultáneamente y pueden producir o estar ligadas a la resistencia a la insulina y/o sobrepeso u obesidad central, que incrementan el riesgo de desarrollar Diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular o ambas. Sus componentes fundamentales son: obesidad abdominal, prediabetes o Diabetes mellitus tipo 2, hipertensión o presión arteriales fronteriza, dislipidemia

(hipertrigliceridemia y/o HDL bajo).

Triacilglicéridos: Moléculas de glicerol, esterificadas con tres ácidos grasos, es la principal forma de almacenamiento de energía en el organismo.

2. ABREVIATURAS

ACAT: Esterol O-aciltransferasa.

AGL: Ácidos grasos libres

APO A-V: Apolipoproteína A-V.

APO B-48: Apolipoproteína B-48.

APO C-II: Apolipoproteína C-II.

APO E: Apolipoproteína E.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

CETP: Proteínas transportadoras de ésteres de colesterol.

C-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad. **C-LDL:** Colesterol de lipoproteínas de baja densidad.

CT: Colesterol total.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

FL: Fosfolípidos.

FLTP: Proteínas transportadoras de fosfolípidos.

HF: Hipercolestolemia familiar.

HL: Lipasa hepática.

IDL: Lipoproteína de densidad intermedia.

LAL: Lipasa ácida lisosomal.

LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LP(a): Lipoproteína a.

LPL: Lipoproteína lipasa.

MTP: Proteína Microsomal Transferidora de Triglicéridos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCSK9: Proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9.

PPAR α : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa.

QM: Quilomicrones.

QMR: Remanentes de quilomicrones.

RNA: Ácido ribonucleico.

R-LDL: Receptor de LDL.

RT-PCR: Retrotranscripción acoplada a la Reacción en cadena de la Polimerasa.

RT-qPCR: Retrotranscripción acoplada a la Reacción en cadena de lapolimerasa cuantitativa.

ROR: Receptor huérfano tipo tirosina quinasa.

SNP: Polimorfismo de nucleótido único.

SREBP: Proteínas de transcripción reguladas por esteroides.

TAG: Triacilglicéridos.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

VDLDR: Remanentes de lipoproteínas de muy baja densidad.

3. RESUMEN

La dislipidemia se define como un conjunto de enfermedades asintomáticas resultantes de concentraciones anormales de lipoproteínas sanguíneas (colesterol, triacilglicéridos, colesterol de lipoproteínas de alta densidad y colesterol de lipoproteínas de baja densidad), en la actualidad representan un problema de salud pública a nivel mundial. En 2016 la OMS estimaba que el 29.5% de la población adulta padece algún tipo de dislipidemia considerándose un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares las cuales reportan más de 17 millones de muertes al año. Los medicamentos hipolipemiantes tienen diversas reacciones adversas, por lo que múltiples investigaciones en el extranjero y en México demuestran la eficacia del uso de la electroacupuntura y moxibustión para el tratamiento de estos padecimientos, dichas investigaciones estudiaron la modulación de genes asociada a la reducción de lípidos sanguíneos posterior a la aplicación de la terapia con electroacupuntura y moxibustión, observándose un aumento en la expresión de genes de la familia de las apolipoproteínas. Actualmente no existe estudio alguno donde se investigue el efecto de este tipo de terapias sobre la apolipoproteína APO-AV, estrechamente relacionada con la concentración de triacilglicéridos (TAG) y colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) circulantes, por ello es indispensable estudiar su relación con los niveles plasmáticos de triglicéridos posterior a la aplicación de dicho tratamiento. (Saavedra, 2010; OMS, 2016; Zhao, 2020)

El presente estudio demostró que la aplicación de ambas terapias juntas no modula la expresión de la apolipoproteína AV (APOAV) de forma significativa en el grupo electro acupuntura más moxibustión (EAM), de igual forma los niveles de TAG plasmáticos no se ven alterados, sin embargo, las concentraciones de Colesterol plasmático y medias de cintura y cadera disminuyen tras finalizar el tratamiento; si bien la fusión de estas dos terapias no modulan el gen de interés se piensa que su intervención radica en algún otro componente de las vías del metabolismo lipídico. En contraste, el uso de Bezafibrato como fármaco hipolipemiente aumenta hasta dos veces más la expresión de APOAV en comparación con el grupo control, debido a que es un gen diana de PPAR α ; sin embargo, este aumento en su expresión no

modula la concentración de TAG plasmáticos en los pacientes del grupo B, quienes tampoco presentan cambios en concentraciones de colesterol plasmático total ni medidas antropométricas.

Dados anteriores resultados se pueden abrir más líneas de investigación que ayuden a dilucidar el mecanismo por el cual este tipo de terapias intervienen en el organismo, con la finalidad de utilizarlas en el pleno conocimiento de la veracidad y razonamiento lógico, con base en métodos científicos, estandarizaciones y otras herramientas que sirvan como respaldo sustentable. Lo anterior es de suma importancia ya que en una población como la mexicana donde enfermedades que comprometen la vida del paciente como lo son la obesidad y diabetes van al alza, el buscar alternativas de tratamiento y/o prevención debe ser una prioridad.

4. MARCO TEORICO

1. DISLIPIDEMIA E HIPERTRIGLICERIDEMIA

1.1. Definición

La Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias, define a las dislipidemias como la alteración de la concentración normal de lípidos en sangre. Mientras que la Guía de Práctica Clínica del IMSS, actualizada en el 2016, la define como el conjunto de enfermedades asintomáticas resultantes de concentraciones anormales de colesterol, triacilglicéridos (TAG), colesterol de alta densidad (C-HDL) y colesterol de baja densidad (C-LDL) en sangre, los cuales fungen como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, considerada dentro de las primeras causas de mortalidad en México (NOM-037-SSA2, 2012; IMSS-233-09, 2016).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias, la hipertrigliceridemia se define como niveles de TAG en plasma superiores a 150 mg/dL (NOM-037-SSA2-2012, 2012).

1.2. Clasificación y mecanismo.

Anteriormente las dislipidemias se clasificaban de acuerdo con el fenotipo de Fredrickson, el cual se basaba en los patrones de elevación de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas, actualmente, en la etiología de la afección, se considera la influencia de factores genéticos, exógenos y alteraciones en el metabolismo lipídico, dividiéndose así en primarias o asociadas a factores genéticos y secundarias. Las dislipidemias primarias se deben a mutaciones de genes únicos o múltiples los cuales propician defectos enzimáticos, en receptores o metabolitos que participan en la síntesis y eliminación de las lipoproteínas, teniendo como consecuencia la hiperproducción o eliminación defectuosa de TAG y C-LDL y/o la producción deficiente, insuficiente o eliminación excesiva de C-HDL. Algunos

ejemplos de este tipo de dislipidemias son: hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, disbetalipoproteinemia e hipertrigliceridemia familiar (Davidson, 2019).

Las dislipidemias secundarias son aquellas alteraciones lipídicas resultantes de otras enfermedades como diabetes mellitus, hipotiroidismo, síndrome nefrótico o incluso del consumo de algunos fármacos. Este tipo de dislipidemia es la principal en los adultos (Davidson, 2019; NOM-037-SSA-2012, 2012; IMSS-233- 09; 2016).

1.3. Signos y síntomas

La dislipidemia, *per se*, no suele causar síntomas, por ello se describe como una enfermedad asintomática, sin embargo, debido a alteración de las diversas lipoproteínas puede ocasionar enfermedad vascular sintomática, enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y enfermedad arterial periférica. Concentraciones elevadas de TAG (>500 mmol/dL) alteran la función pancreática desencadenando en una pancreatitis aguda, hepatoesplenomegalia, parestesias, disnea y confusión, mientras que concentraciones elevadas de C-LDL pueden causar arcos corneales, xantelasma y xantomas en el tendón de Aquiles, tendones del codo, rodilla y sobre articulaciones metacarpofalángicas (Davidson, 2019).

1.1. Diagnóstico

El uso del perfil lipídico para el cribado de la población general como método diagnóstico, es controversial debido a que la concentración de colesterol plasmático no supera el valor discriminante para riesgo cardiovascular (200mg/dl o 5,2mmol/l). Pese a esto, actualmente la dislipidemia se diagnostica midiendo la lipemia del paciente, (Colesterol, TAG, C-LDL y C-HDL). El C-LDL ha reemplazado al colesterol total, como medición primaria para evaluar el riesgo por lipoproteínas aterogénica y permanece como la medición más usada como objetivo de tratamiento (Davidson, 2019; IMSS-233-09, 2016).

1.4. Tratamiento

Se basa en el uso de 5 fármacos distintos: estatinas, fibratos, secuestradores de ácidos biliares, inhibidores de la absorción de colesterol e inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9). Estudios realizados en diferentes biomodelos tratados con acupuntura y moxibustión reportan efectos positivos para esta patología; demostrando cambios significativos en parámetros bioquímicos evaluados (lipoproteínas y expresión de ciertos genes) después del tratamiento. Lo anterior resulta importante debido a la prevalencia de dicha patología tanto en la población mexicana como mundial y a los riesgos que conlleva su padecimiento, por lo que este tipo de medicina alternativa resulta útil como una terapia efectiva y económica. (Becerril, 2021).

1.1. Prevención y profilaxis

De acuerdo con las guías de la sociedad europea de cardiología para el manejo de las dislipidemias se recomienda modificar los valores de lípidos sanguíneos para disminuir el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, estableciendo las siguientes recomendaciones:

- ❖ Para pacientes que padecen sobrepeso u obesidad se recomienda la pérdida de peso hasta el ideal.
- ❖ Mantener una circunferencia abdominal <90 cm en hombres y <80 en mujeres.
- ❖ Modificación en la alimentación: aumentar el consumo de fibra, disminuir el consumo de azúcares simples, sustituir los ácidos grasos trans y grasas saturadas por ácidos grasos poli y mono insaturados, disminuir el consumo de colesterol malo.
- ❖ Aumentar la actividad física aeróbica de moderada intensidad (caminar, correr, nadar).
- ❖ Reducir el consumo de alcohol y eliminar el consumo de tabaco (Rojas, 2019).

1.5. Incidencia a nivel Mundial

Según la OMS en 2016, a nivel mundial, 32 % de los varones mayores de 45 años y el 27 % de mujeres mayores de 55, presentaban dislipidemia causando más de 17 millones de muertes prematuras por año. La población latinoamericana presenta características socioeconómicas, culturales y étnicas diferentes al resto del mundo, el estilo de vida que lleva esta población se basa en el consumo excesivo de productos procesados, ricos en carbohidratos y grasas, así como la reducción o inexistencia de actividad física, desencadenando un aumento significativo de obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión y dislipidemia (SIAC, 2017).

1.6. Incidencia en México

Las enfermedades crónicas no transmisibles representan un grave problema de salud pública en México, la enfermedad coronaria es la principal causa de muerte en nuestro país, asociada a la dislipidemia. Según la Encuesta Nacional de Salud (ENSANut) del 2016 la prevalencia en la población general de esta enfermedad fue del 26.5 %, siendo mayor en las mujeres (28.8 %) ya que solo el 22.7 % de los hombres resultaba afectado, siendo la hipoalfalipoproteinemia la más prevalente, seguida de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Para los reportes de ENSANut 2018 la prevalencia fue de 19.5 %, siendo más alta en mujeres (21.7 %) respecto a los hombres (17.7 %). La mala alimentación a causa del consumo excesivo de bebidas con alto aporte energético y el abuso de alimentos procesados con elevada densidad energética por su alto contenido en azúcar y grasa, aunada a la reducción en la actividad física, afecta negativamente la salud. Se han detectado cifras elevadas de C-LDL y TAG en niños mexicanos con obesidad, quienes presentan mayor probabilidad de padecer dislipidemias en la edad adulta (Alvirde, 2016; IMSS-233-09, 2016). De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias, la hipertrigliceridemia se define como niveles de TAG en plasma superiores a 150 mg/dL (NOM-037-SSA2- 2012, 2012).

2. LIPOPROTEÍNAS

2.1. Definición

Moléculas esféricas de gran tamaño de núcleo hidrófobo cubierto por una envoltura hidrofílica. Su núcleo está compuesto por TAG y ésteres de colesterol, mientras que la envoltura por fosfolípidos (FL), colesterol no esterificado (libre) y proteínas, denominadas apolipoproteínas, véase *Fig 1*. Se encargan principalmente del transporte de TAG, ésteres de colesterol y vitaminas liposolubles a través del medio acuoso del plasma hacia los tejidos periféricos e hígado (Kasper, 2005; Murphy, 2020).

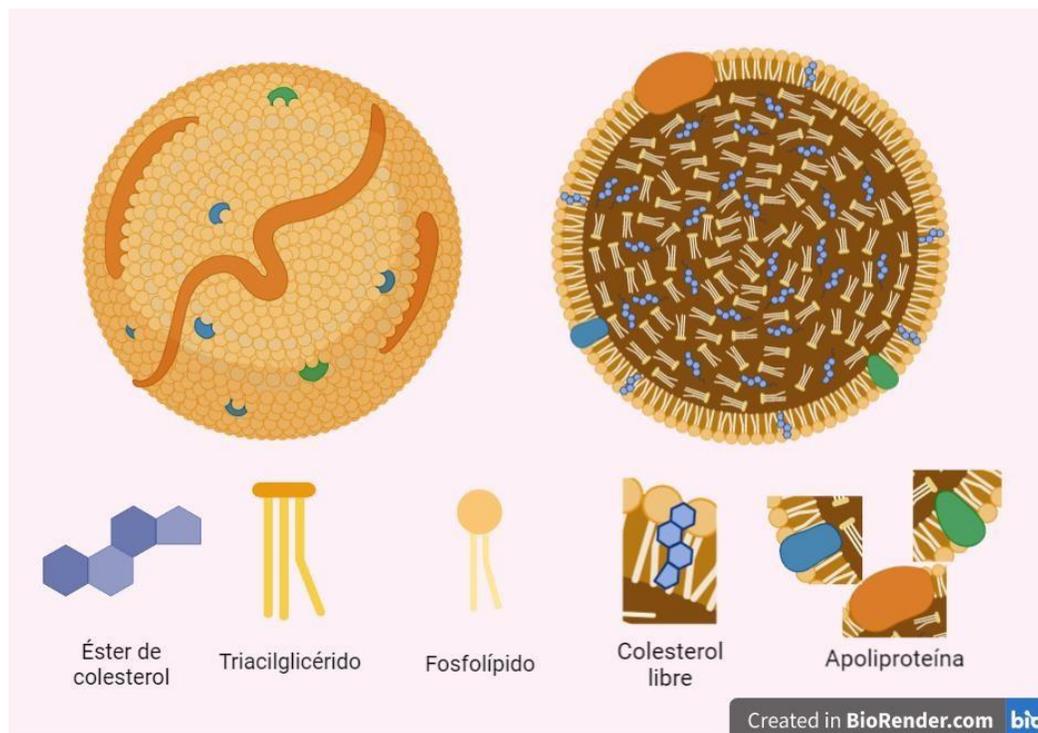


Fig. 1.- Estructura general de las lipoproteínas. Las lipoproteínas son estructuras esféricas de gran tamaño, presentan un núcleo hidrofóbico constituido de TAG y ésteres de colesterol mientras que la envoltura de carácter hidrofílico está compuesta de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas. Modificado de Murphy, 2020.

2.2. Clasificación

Las lipoproteínas se pueden clasificar con base en sus diferentes propiedades fisicoquímicas: densidad de flotación, movilidad electroforética y contenido de apolipoproteínas (Murphy, 2020). De acuerdo con su densidad, determinada por la cantidad de lípidos y apolipoproteínas contenidas, se dividen en seis clases principales: quilomicrones (QM), remanentes de QM (QMR), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), remanentes de VLDL (VLDLR) y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteína (a) [Lp(a)] y lipoproteínas de alta densidad (HDL), véase *Fig. 2*. Siendo los quilomicrones y las VLDL las de mayor tamaño y menor densidad (Barquera, 2009; Kasper, 2005; Real, 2021).

Los QM son partículas de gran diámetro (100-1200 nm), ricas en TAG (más del 90% de su contenido total) y su principal apolipoproteína es la Apo B-48, aunque también poseen otras proteínas (Apo A-I, Apo A-II, Apo C-II, Apo-E y otras menores). Se producen en el intestino y transportan los lípidos absorbidos, principalmente TAG, al resto de órgano, especialmente al músculo esquelético y al tejido adiposo.

Las VLDL son lipoproteínas producidas en el hígado con un diámetro de 45-100 nm, ricas en TAG (aproximadamente 90% de su contenido total) y su principal proteína es la Apo B-100, aunque también presenta Apo C-I, C-II y C-III. Se encargan de transportar los TAG endógenos al resto de los órganos. A partir de la lipólisis de las VLDL se producen lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y a partir de éstas se producen las LDL. Las LDL son partículas ricas en colesterol con un diámetro de 20-25 nm, su principal apolipoproteína es la APO B-100. Son captadas por las células del cuerpo y las proveen del colesterol que requieran (Carvajal, 2014).

La HDL tiene un diámetro entre 25 y 10 nm y los fosfolípidos son su principal lípido. Su principal proteína es la Apo A-I y posee también Apo A-II, Apo C-I, C-II, C-III y Apo-E. Las Apo Cs son libremente transferibles entre varias lipoproteínas y se considera que las HDL constituyen la partícula reservorio no solo de Apo Cs sino también de Apo A. Son producidas por el hígado (30%) y el intestino (70%), se

encargan de extraer el colesterol sobrante de las células y transportarlo al hígado (transporte reverso de colesterol) para su posterior eliminación en forma de ácidos biliares y colesterol en las heces (Carvajal, 2014).

En los QM, VLDL y LDL predominan cuantitativamente los lípidos y únicamente en las HDL las proteínas constituyen un porcentaje que puede llegar al 50% ó más. Cabe indicar que dentro de cada tipo de lipoproteína hay una gran heterogeneidad con respecto al tamaño, composición y porcentaje de proteínas y de lípidos presentes. Entonces se puede hablar de subtipos y por ejemplo la HDL tiene cuatro subtipos de partículas: HDL1, HDL2, HDL3 y pre β -HDL que varían en diámetro, cantidad de apolipoproteínas y de lípidos (Carvajal, 2014).

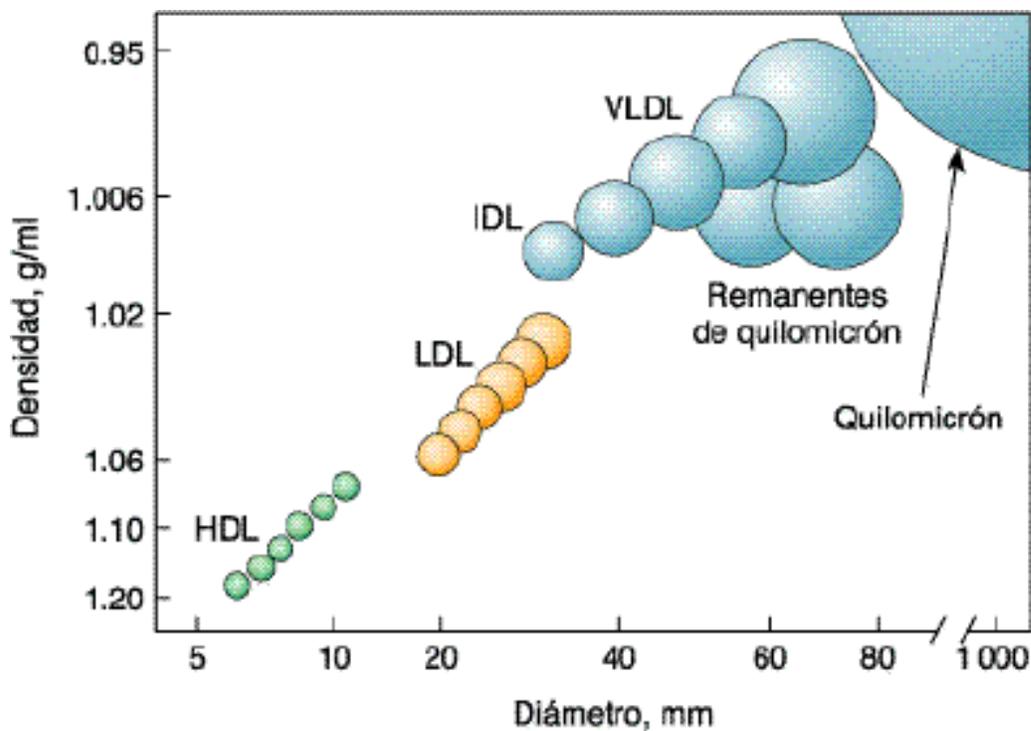


Figura 2.- Densidad y distribución según tamaño de las lipoproteínas. Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a su densidad la cual está determinada por la cantidad de lípidos y proteínas que contengan (Kasper, 2005).

3. METABOLISMO LIPIDICO

3.1. Definición

El metabolismo lipídico, también llamado metabolismo lipoproteico, es de suma importancia pues los lípidos son esenciales para la vida. Tanto el colesterol como los fosfolípidos (FL) son constituyentes esenciales de todas las membranas celulares, necesarios para mantener la función y supervivencia celular. el colesterol *per se*, es precursor en la síntesis de las hormonas esteroideas. Por otra parte, los ácidos grasos contenidos en los TAG son material energético para el organismo, además son el constituyente principal del tejido adiposo, fungen como reserva energética, la cual permite mantener la actividad de nuestro organismo en periodos de ayuno (Real, 2021).

Dicho proceso metabólico se lleva a cabo en el hígado a través de dos vías interconectada: la vía exógena, encargada de degradar los lípidos provenientes de la dieta, y la vía endógena, síntesis y secreción de las VLDL y la transformación en plasma en VLDLR, IDL y LDL. (Laufs, 2020).

3.2. Vía exógena

Esta vía hace referencia al transporte de lípidos provenientes de la dieta y parte de los excretados por vía biliar, que se absorben en intestino delgado y viajan al hígado y a células periféricas, en especial al tejido adiposo.

Los TAG ingeridos se hidrolizan por acción de la lipasa pancreática y colipasa dentro de la luz intestinal y se emulsionan con ácidos biliares formando micelas que son captadas por las células intestinales a través del transportador específico FAT/CD36. El colesterol es captado por la proteína Niemann-PickC1-like 1 (NPC1L1), se esterifica en los eritrocitos, unión de un ácido graso, mediante la acción de la enzima esteroil O-aciltransferasa (ACAT); junto a los TAG sintetizados en la célula intestinal, se unen a ApoB48 mediante la proteína microsomal

transferidora de TAG (MTP) formando los pre-QM, que posteriormente adquirirá más lípidos antes de ser secretado, (el QM es sintetizado durante los períodos posprandiales para transportar los lípidos provenientes de la dieta. El tamaño de la partícula secretada depende de la cantidad de grasa absorbida y la composición de ácidos grasos de los TAG de los QM, lo anterior refleja la composición de la grasa de la dieta que consumimos); posteriormente, las proteínas del grupo coatomere II (COPII), como SAR1a y SAR1b, son esenciales para el transporte de QM al aparato de Golgi (Carvajal, 2014; Real, 2021).

Los QM formados en las células intestinales son secretados hacia la linfa para llegar a torrente sanguíneo, a través del ducto torácico, véase *Fig 3*, donde adquieren Apo-E y Apo C-II a partir de HDL maduro; Apo-E sirve como ligando para la eliminación posterior de remanentes de QM y Apo C-II es un activador de la enzima lipoprotein lipasa (LPL). La mayoría de los TAG presentes en los QM son hidrolizados por acción de la LPL (cerca del 70 a 90%), liberando ácidos grasos libres (AGL) que serán captados por diversos tejidos periféricos, fundamentalmente por el tejido graso y el muscular estriado; gracias al reconocimiento de ApoC-II, en estos tejidos se oxidarán y producirán energía o se almacenarán tras ser esterificados de nuevo, formando TAG, contribuyendo así a mantener los depósitos grasos (Murphy, 2020; Real, 2021; Laufs, 2020).

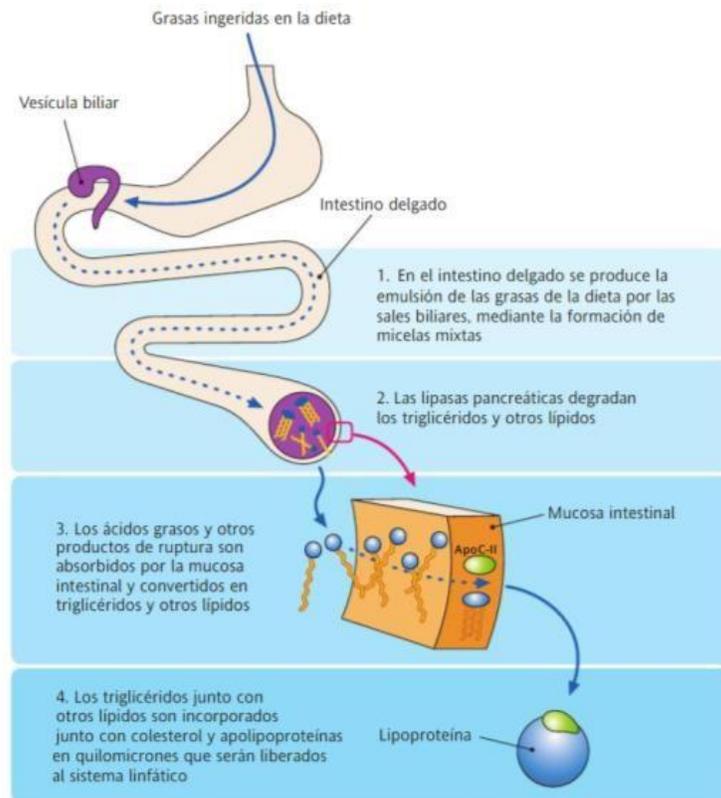


Fig.3.- Digestión y absorción de los triacilglicéridos de la dieta. Feduchi. Bioquímica conceptos esenciales, 2015.

Conforme el QM pierde progresivamente TAG, su tamaño disminuye formándose pliegues en la superficie, a estos QM se les adiciona colesterol y FL de las HDL, por acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (FLTP) y por intercambio de apoproteínas con las HDL, enriqueciendo a los QM en ApoE., a esas partículas de QM ricas en ésteres de colesterol y ApoE pero pobres en TAG, se les denomina remanentes de QM (QMR), las cuales son retiradas rápidamente de torrente sanguíneo tras unirse, en el hígado, a receptores, proceso donde interviene la ApoE10 (Real, 2021).

En el hígado existen diversos receptores hepáticos y moléculas capaces de captar QM, entre estos se encuentran los proteoglicanos que captan QM en el espacio Disse, los receptores de VLDL, de las LDL (R-LDL), LRP1, LPR5, syndecan111. La captación es mediada por la Apo-E y la lipasa hepática (HL), estas podrían actuar como ligando que facilitan la unión de los QMR a los receptores mencionados

Presente en capilares de diversos tejidos (cardiaco, islotes, macrófagos, glándulas mamarias) predominando en tejido adiposo (adipocitos) y musculo esquelético, es transportada a la luz del endotelio capilar por la proteína GPIHBP1. La LPL luminal o endotelial es conocida como reserva de LPL funcional, debido a que representa la porción de LPL tisular que participa activamente en la hidrólisis de TG plasmáticos. Es catalíticamente activa como un dímero compuesto por dos subunidades glicosiladas de 55 kDa conectadas cabeza a cola por interacciones no covalentes, en este proceso y en su posterior inactivación se requiere la acción de múltiples mecanismos, que operan principalmente a nivel transcripcional y postraduccional donde intervienen enzimas, proteínas, apolipoproteínas y hormonas; cualquier alteración en esta regulación producirá una disminución de la LPL activa provocando la falta de catabolismo de los QM, permaneciendo elevados en plasma, véase *Fig 5* (Real, 2021; Wu, 20201).

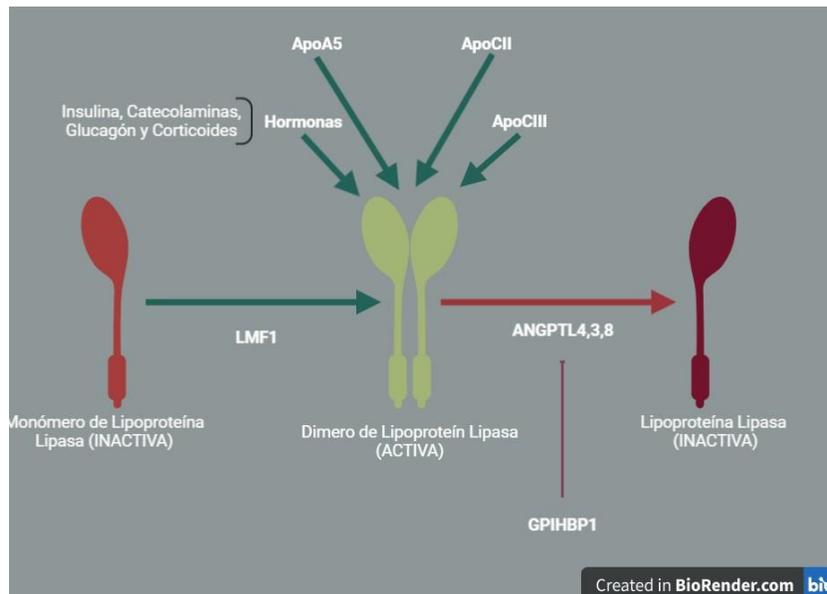


Figura 5.- Regulación de LPL. ANGPTL4, 3, 8: proteína relacionada con la angiopoyetina tipo 4, 3 y 8; ApoA5: apolipoproteína A5; ApoCII: apolipoproteína CII; ApoCIII: apolipoproteína CIII; GPIHBP1: proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad anclada a glucosilfosfatidilinositol tipo1; LMF1: factor de maduración de LPL (ensamblaje en endotelio); LPL: lipoproteína lipasa (Modificado de Real, 2021).

El factor de maduración de la lipasa 1 (LMF1) es una proteína chaperona que garantiza que la LPL alcance su funcionalidad y se secrete correctamente de las células adiposas o los miocitos. La proteína 1 de unión a lipoproteínas de alta densidad anclada con glicosilfosfatidilinositol (GPIHBP1) es necesaria para la transcitosis de la LPL a través del endotelio de los capilares en los tejidos adiposo y muscular, así como para unir la lipoproteína lipasa al endotelio, estabilizándolo. Recientemente se indicó que la porción C-terminal de LPL, media la unión con heparina, es suficiente para unirse a GPIHBP1 por lo que no se requiere la formación de los homodímeros de LPL de longitud completa para las interacciones con GPIHBP1. La Apo C-II activa la lipoproteína lipasa, mientras que la Apo AV es un cofactor estabilizador. La lipólisis se reduce por la Apo C-III y por las proteínas similares a la angiopoyetina 3 y 4 (ANGPTL3 y ANGPTL4), que actúan cerca del endotelio. Volanesorsen y AKCEA-APOCIII-LRx reducen los TAG al actuar sobre Apo C-III, mientras que evinacumab e IONIS-ANGPTL3-LRx los reducen al actuar sobre ANGPTL3. Receptores activados por proliferadores de peroxisomas, particularmente tipos alfa y delta, forman una red reguladora que influye en varias de las moléculas diana anteriores, véase *Fig 6* (Wu, 2021; Laufs, 2021).

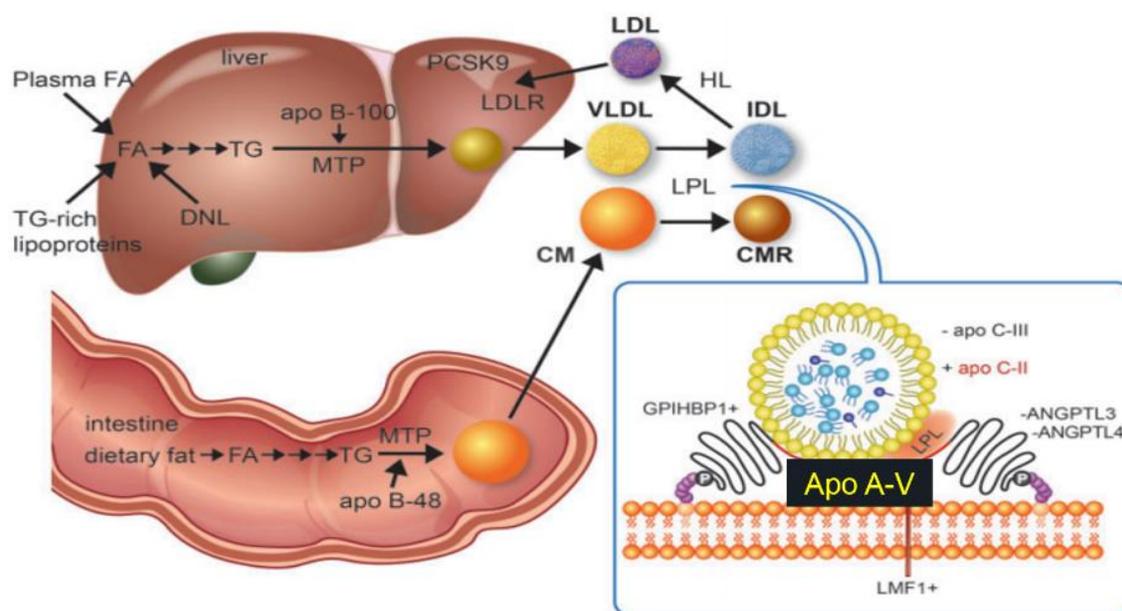


Figura 6.- Mecanismo de acción de LPL (Modificado de Real, 2021).

3.3. Vía endógena

Esta vía, a comparación de la anterior, inicia en el hígado donde se sintetizan, a nivel del retículo endoplásmico y Golgi, y secretan partículas de VLDL y su posterior transformación en plasma en VLDLR, IDL y LDL, véase *Fig 7* (Carvajal, 2014; Real, 2021)

Las partículas VLDL se asemejan a los QM por ser ricas en TAG, contiene Apo B-100, proteína formada por 4.356 aminoácidos, sintetizada en el retículo endoplasmático del hígado y degradada por diversos lípidos. Los TAG presentes en las partículas VLDL derivan de la esterificación hepática de los ácidos grasos de cadena larga provenientes de la lipólisis a nivel de tejido adiposo, captación hepática de remanentes de VLDL y de QM y síntesis hepática de novo (lipogénesis). Cualquier condición que aumente el flujo de ácidos grasos libres aumentará la producción de VLDL, tal y como ocurre en estados de obesidad visceral, de resistencia a la insulina y en la diabetes mellitus (Carvajal, 2014; Real, 2021).

La maduración de la partícula VLDL requiere de numerosos factores proteicos que median la unión de lípidos con Apo B-100, en dicho proceso destaca especialmente la acción de MTP para transferir los lípidos a la partícula naciente de VLDL, en circulación esta partícula adquiere Apo-E y Apo C-II a partir de HDL maduro mediante un mecanismo similar a la formación de QM. Tras su síntesis y liberación en plasma, las VLDL son hidrolizadas por la LPL, fundamentalmente en el endotelio vascular del tejido muscular y adiposo, por un mecanismo similar a la hidrólisis de QM. La hidrólisis de las VLDL libera TAG, que en forma de ácidos grasos irán a tejidos periféricos, especialmente al tejido adiposo y al muscular. Las VLDL que van perdiendo TAG establecen un intercambio con las HDL, enriqueciéndose de colesterol y ApoE, denominándose VLDL residual o VLDLR, conocido como IDL, dichas partículas contienen cantidades elevadas de colesterol y TAG (Carvajal, 2014; Real, 2021).

La IDL tiene dos destinos metabólicos:

- A. Del 40-60 % son captadas rápidamente por el hígado mediante endocitosis mediada por el receptor de LDL a través de la unión a poE y al resto de receptores que captan lipoproteínas ricas en TAG. El receptor de LDL pertenece a una familia de receptores llamada familia LDLR que comprende a un grupo de receptores endocíticos ubicados en la superficie celular. Todos los receptores de esta familia comparten un dominio o motivo estructural en común, entre sus miembros se encuentra: LDLR, LRP1, LRP2, LRP6, ApoER2 y VLDLR.

- B. Las IDL restante permanecen en circulación y son modificadas por LPL junto con la lipasa hepática (HL) (encargada de quitar los TAG) y la Proteína Transferidora de ésteres de colesterol (CETP) (permite captar colesterol esterificado (CE) a partir de HDL) formando LDL, partícula muy rica en colesterol (constituye entre el 60 y el 70% del colesterol plasmático en la mayoría de los individuos con un metabolismo lipídico normal) y ApoB-100 como única apolipoproteína.

El 70 % de las partículas LDL son captadas en hígado a través de la unión al receptor de las LDL (R-LDL), donde ApoB juega un papel fundamental; el 30 % restante es captado por las células periféricas a través del R-LDL, similar al descrito en el hígado, en ambos casos la LDL es endocitada por el LDLR que reconoce a la proteína Apo B-100. El exceso de LDL no captada por su receptor específico, junto a otras partículas lipídicas, especialmente VLDLR e IDL, que permanecen en plasma, con tamaño inferior a 70 nm, pueden atravesar la pared endotelial y ser retenidas por los proteoglicanos del espacio subendotelial y ser captada por los macrófagos (receptor *scavenger* o basurero), iniciando así el proceso ateroscleroso (Carvajal, 2014; Real, 2021)

Tras la endocitosis de las vesículas formadas por el LDL +R-LDL, los endosomas disocian las LDL y R-LDL, y el receptor puede ser reciclado de nuevo a la superficie celular o ser dirigido a los lisosomas para su degradación; en este proceso intervine la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo9 (PCSK9), codificada por el

gen *PCSK9*. Las LDL se dirigen al lisosoma para su destrucción a través de la actividad de la lipasa ácida lisosomal (LAL), codificada por *LIPA* (Real, 2021).

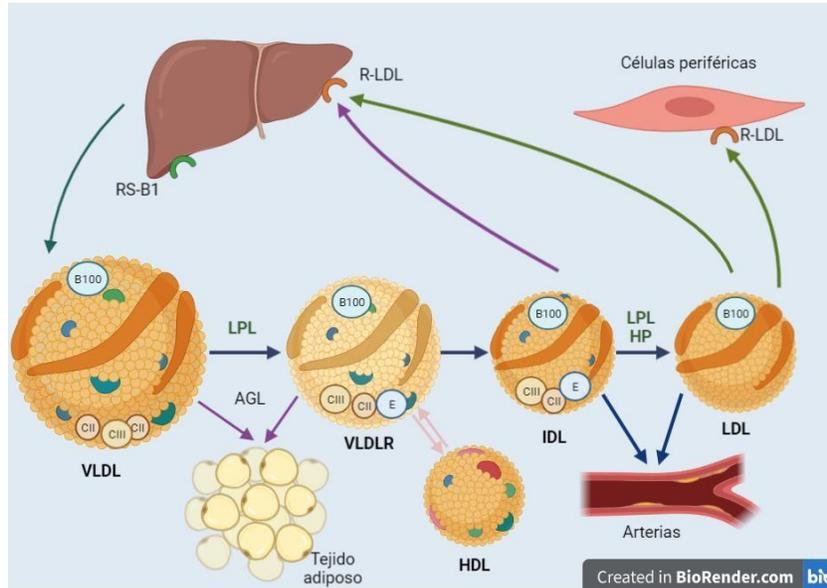


Figura 7.- Metabolismo endógeno de las lipoproteínas. Esta vía comienza en el hígado donde se sintetizan y secretan, a plasma, partículas de VLDL que son hidrolizadas por la LPL, liberando AGL que irán principalmente a tejido adiposo y muscular, las partículas de VLDL que van perdiendo TAG establecen un intercambio con las HDL, enriqueciéndose de colesterol y ApoE. Estas partículas resultantes se les denomina VLDL residual o VLDLR, las VLDLR seguirán hidrolizándose, pasando a lipoproteína de densidad intermedia (IDL) las cuales serán modificadas por LPL, la lipasa hepática (HL) formando LDL, el 70 % de estas serán captada por hígado a través de su unión al receptor de LDL (R-LDL), el 30 % restante es captado por las células periféricas a través del R-LDL. Abreviaturas: B100: apoB100; B48: apoB48; CII: apoCII; CIII: apoCIII; E: apoE; RS-BI: receptor de HDL. Modificado de Murphy, 2020 y Real, 2021.

3.3.1. Receptor LDL

Descubierto en 1982 por Goldstein y Brown, en los mecanismos de endocitosis o internalización de las LDL a través de zonas de la membrana cubiertas de clatrina y que contienen los R-LDL; en este mecanismo interviene la proteína adaptadora del receptor LDL (ARH), codificada por el gen *LDLRAP1*. Se trata de una glicoproteína transmembranal de superficie presente en todas las células, concentrado en lugares especiales de la membrana denominados “depresiones recubiertas” (Muphy, 2020; Real, 2021).

Este receptor (hepático y periférico) es saturable, por lo que, cuando se satura por exceso de LDL en plasma, deja de captar o capta con menor intensidad las LDL

circulantes. En este mecanismo interviene la reducción en la producción de R-LDL, que se produce cuando la célula aumenta su contenido en colesterol; dicho proceso es regulado por una familia de factores de transcripción unidos a la membrana designados como proteínas de transcripción reguladas por esteroides (SREBP); las isoformas predominantes son SREBP-1c y SREBP-2. La función anómala o ausencia hereditaria de receptores LDL provocan hipercolestolemia familiar o HF (Real, 2021).

3.3.2. Lipoproteína (a)

Lipoproteína similar a la LDL en cuanto a su composición lipídico-proteica, contiene una proteína adicional denominada apolipoproteína (a) o apo(a). La apo(a) es sintetizada en el hígado y adherida a la apoB100 mediante un enlace disulfuro. Se desconoce el mecanismo por el cual apo(a) sale de torrente sanguíneo, lo que si sabe es que puede atravesar la barrera endotelial contribuyendo a la arteriosclerosis (Real,2021).

4. APOLIPROTEINAS

Las apolipoproteínas o proteínas APO son el componente proteico de las lipoproteínas, juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de los lípidos. Son proteínas anfipáticas cuya estructura predominante es helicoidal, la cual presenta poca afinidad a partículas lipoproteicas, esta estructura aumenta al incorporarse a las lipoproteínas. La parte hidrófila flota sobre la superficie de los fosfolípidos (FL) de la lipoproteína por lo que interacciona con el medio acuoso, sirviendo como ligandos para receptores celulares, mientras que la parte hidrófoba se orienta hacia el núcleo no polar de la lipoproteína (Basavaraju, 2022; Real, 2021).

Hay seis clases principales de proteínas APO: A, B, C, D, E, H, F G. El genoma humano codifica más de 21 genes APO, de los cuales APOA (APOA1, APOA2, APOA4 y APOA5), APOC (APOC1, APOC2 y APOC3), APOB y APOE (APOE2,

APOE3 y APOE4) contribuyen a la codificación de proteínas que regulan el metabolismo, el transporte y la digestión de los triacilglicéridos (TAG) y el colesterol a nivel celular (Basavaraju, 2022).

Existen dos clases generales de apolipoproteínas: no intercambiables e intercambiables. La apolipoproteína B o apoB es la única apolipoproteína no intercambiable ya que permanece en las lipoproteínas ricas en TAG (QM, VLDL y LDL), debido a que se une fuertemente a los lípidos gracias a la estructura secundaria de su hoja β ; las apolipoproteínas restantes se consideran intercambiables, al mantenerse en equilibrio dinámico ya sea estando unidas o no a lípidos o presentando una baja concentración de estos, esto debido a su principal estructura secundaria como hélice anfipática (Wolska, 2021).

4.1. Apolipoproteína AV

La apolipoproteína AV, APOA5 o APOAV, se expresa principalmente en hígado, véase *Fig. 8*, después de ser secretada a torrente sanguíneo, circula en concentraciones extremadamente bajas en plasma (~150 a 400 ng/mL); estudios realizados en 2008 por Guardiola y colaboradores, demostraron que APOAV también se expresa en intestino delgado, principalmente en duodeno y colon (Guardiola, 2008).

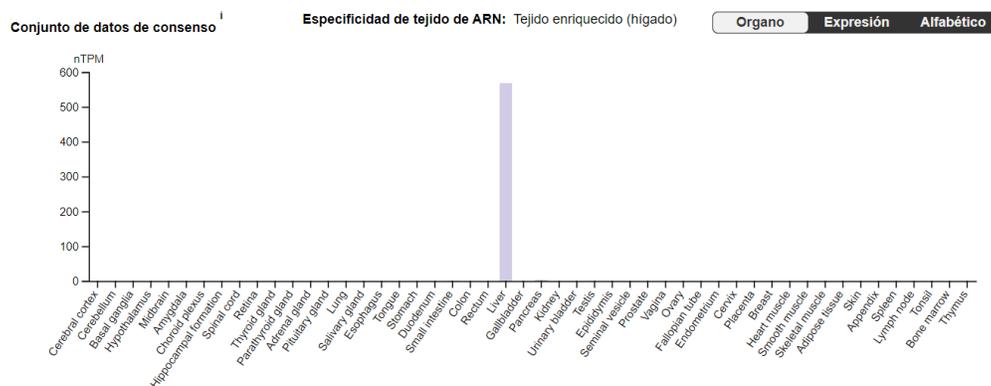


Fig 8. - Expresión de RNA de APOAV en los diferentes órganos humanos. El conjunto de datos de consenso consta de niveles de expresión normalizados (nTPM) para 55 tipos de tejidos, creados mediante la combinación de los conjuntos de datos de transcriptómica HPA y GTEx utilizando la canalización de normalización interna. (The Human Atlas Protein, 2022).

APOAV está fuertemente asociada al metabolismo de los triacilglicéridos pues se ha detectado en VLDL, HDL y quilomicrones; estudios realizados en humanos y ratones transgénicos, establecen una estrecha relación entre APOAV y la concentración de TAG y c-HDL circulantes, la sobreexpresión de APOAV disminuye o aumenta dependiendo de la especie de estudio (Forte, 2016; Saavedra, 2010).

Juega un papel importante en los procesos de resistencia a insulina y metabolismo de lípidos; participa en el metabolismo de los TAG, aumentando su hidrólisis, estimulando la actividad de la LPL o por interacción con proteoglicanos que anclan a la LPL en la superficie celular aumentando la lipólisis de las VLDL, disminuyendo la concentración de TAG en ellas, véase *Fig. 9* (Saavedra, 2010).

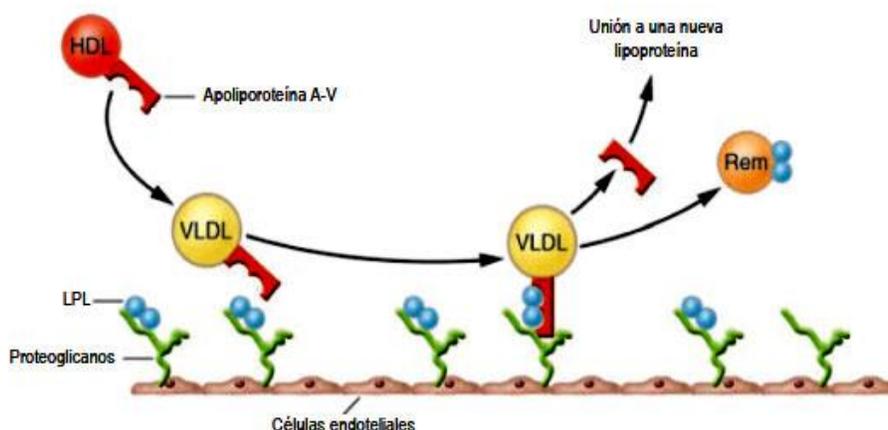


Fig 9.- Mecanismo de acción de APOAV. ApoAV disminuye la concentración de triacilglicéridos estimulando la actividad de LPL o por acción de proteoglicanos (Merckel y Heeren,2006).

Estudios sugieren que APOAV presenta una disminución en su expresión en ratones tratados con insulina y que la expresión de APOAV contribuye a la hipertrigliceridemia. La disminución en la expresión de APOAV está relacionada con la hipertrigliceridemia relacionada con la resistencia a la insulina y la regulación de la síntesis y/o la secreción de lipoproteínas requeridas durante el proceso de regeneración hepática. En un estudio realizado en 2020, se demostró que la vía de digestión y absorción de grasas está relacionada significativamente con genes

regulados a la baja en células HepG2 inducidas por la sobreexpresión de APOAV, por lo que la sobreexpresión de APOAV inhibe la digestión de grasas y la absorción provocando inflamación, y luego reduce el riesgo de desarrollo de resistencia a la insulina. La insulina disminuye la síntesis del ARNm de APOA5, mientras que la glucosa estimula su expresión (Zhao, 2020).

5. GEN APOAV / APOA5

Identificado en 2001 por Pennacchio y colaboradores mediante análisis genómicos comparativos de ratón y humano. Localizado aproximadamente a 30 Kb de distancia del grupo de genes bien caracterizados APOA1/C3/A4 en el cromosoma 11q23.3, véase *Fig 10*. Presenta 4 exones que codifican 366 aá con 71% de identidad a apoa5 de ratón y 27% de identidad al gen APOA4 humano. Su expresión se ve modulada por diversos factores; se sobreexpresa en respuesta a factores de transcripción que afectan al metabolismo de TAG como el Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR), receptor nuclear, receptor huérfano tipo tirosina quinasa (ROR) y los ligandos del receptor X del hígado (T0901317) pueden regular la expresión a través de SREBP-1C (Sotos, 2010).



Fig. 10.- Ubicación del gen APOAV. Fuente propia.

Se conocen tres alelos comunes: alelo APOA5*1, APOA5*2 y APOA5*3. El haplotipo APOA5*2, que consta de 3 SNP (polimorfismos de nucleótido único) no codificantes, está presente en aproximadamente el 16 % de los caucásicos y se asocia con un aumento de las concentraciones de triglicéridos en plasma. El

haplotipo APOA5*3 se define por la rara sustitución Serina por Triptófano en la posición 19. Juntos, los haplotipos APOA5*2 y APOA5*3 se encuentran en 25 a 50% de los afroamericanos, hispanos y caucásicos. La presencia de estos polimorfismos se ha asociado a una disminución de la expresión del gen APOA5, lo que condicionaría un aumento en los niveles de triglicéridos y a una mayor predisposición a padecer diabetes mellitus tipo 2; ambos factores de riesgo reconocidos de enfermedad coronaria. Mutaciones en este gen se han asociado con hipertrigliceridemia e hiperlipoproteinemia tipo 5 (Saavedra, 2010).

La proteína consta de 366 aminoácidos (aá) y madura tras perder 23 aá, correspondientes al péptido señal, véase *Fig 11*. Estructuralmente destaca su componente alfa hélice de predominio hidrofóbico donde el extremo C-terminal juega un papel importante en la unión de la proteína a los lípidos (Sotos, 2010).

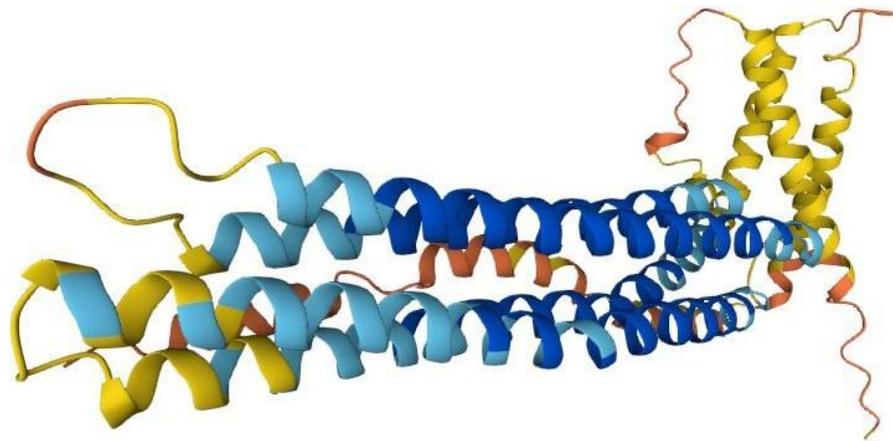


Fig. 11.- Predicción de la estructura proteica de APOAV. AlphaFold, 2021.

6. HIPOLIPEMIANTE

Disminuyen las concentraciones inusualmente altas de lípidos en sangre (colesterol, TAG y FL), se utilizan en combinación con cambios de estilo de vida, como dieta adecuada, pérdida de peso y ejercicio, y tratamiento de cualquier trastorno subyacente. Las clases de fármacos hipolipemiantes son:

- ❖ Secuestrantes biliares
- ❖ Derivados del ácido fíbrico
- ❖ Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa
- ❖ Ácido nicotínico
- ❖ Inhibidores de la absorción de colesterol (Gersch, 2017).

6.1. Derivados del ácido fíbrico o fibratos

Poseen efectos hipolipemiantes reduciendo los niveles de C-LDL, (15 – 20 %), c- VLDL y TAG (30 - 50 %), aumentan los niveles de C-HDL (5 - 20 %). Considerados fármacos de primera elección únicamente en el tratamiento de hipertriacilgliceridemia, en el control de dislipidemias mixtas y en pacientes con diabetes tipo 2 con dislipidemia elevada de TAG-C-HDL bajo. Estudios clínicos han demostrado que el uso de fibratos reduce el riesgo de enfermedad aterosclerótica coronaria (EAC) en pacientes con hipercolesterolemia y también, en sujetos postinfarto de miocardio con niveles bajos de C-LDL, C-HDL y niveles ligeramente altos de TAG (Goldenberg, 2008; Hermes, 2005). Se pueden utilizar solo o en combinación con niacina; la dosis recomendada de fibratos (Bezafibrato) es de 200-400 mg/ día y de niacina es de 0.5 a 2 g/día, hasta lograr que los TAG tengan un valor inferior a 150 mg/dl y la HDL este arriba de 40 mg/dl (IMSS-233-09, 2016).

6.2. Farmacocinética

Poseen una alta biodisponibilidad oral, que oscila entre el 60% para el fenofibrato no micronizado (el 100% en la forma micronizada) y el 100% para el gemfibrozilo y el bezafibrato, presentan una unión a las proteínas plasmáticas superior al 95%. Se metabolizan en mayor o menor proporción por glucuroconjugación hepática y se eliminan, ya sea en forma inalterada o como glucurónido, por vía renal.

Las principales diferencias entre los 3 fibratos más usados radican en la vida media del fármaco en el organismo: mientras que la del bezafibrato y el gemfibrozilo oscila

entre 1 y 3 h, la del fenofibrato suele ser entre 19 y 27 h, y en las enzimas metabólicas afectadas por fenofibrato y gemfibrozilo. Aunque ambos fármacos son glucuroconjugados, lo son por isoformas de glucuronidasas diferentes, con la peculiaridad de que las isoformas que glucuroconjugan el gemfibrozilo, UGT1A1 y UGT1A3, son también las que mayoritariamente glucuroconjugan las estatinas. Además, el gemfibrozilo es un potente inhibidor de los citocromos CYP2C9 y CYP2C8, que también participan activamente en la eliminación metabólica de las estatinas⁴³. Estas características hacen que el gemfibrozilo sea el fibrato con mayor potencial de interacciones farmacocinéticas de trascendencia clínica, con otros fármacos, especialmente las estatinas (Hermes, 2005; Laguna,2006; Vázquez, 2000).

6.3. Farmacodinamia

Los fibratos actúan como ligandos sintéticos para los receptores activados por proliferadores peroxisomales subtipo α (PPAR α), véase *Fig 12 y 13*, se encuentran principalmente en hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco y células de la pared arterial, estos receptores desempeñan un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis.

Los PPAR's (receptores activados por proliferadores peroxisomales) se unen como heterodímeros al receptor nuclear del ácido 9-cis retinoico (RXR) formando un complejo activador PPAR-RXR el cual se une al DNA y reconoce secuencias específicas de nucleótidos conocidas como PPRE (elemento de respuesta a PPAR), constituida por dos semi-dominios repetidos y separados por un solo nucleótido. Cuando el ligando (ácido graso, ácido cisretinoico) se une al complejo activador PPAR-RXR, se reclutan proteínas activadoras y se inicia la transcripción del gen diana. El heterodímero formado puede inhibir la transcripción de genes tras unirse directamente a regiones promotoras y ser activados por sus ligandos, represores proteicos o se pueden unir a ligandos específicos independiente de RXR, formando el complejo ligando-PPAR uniéndose al promotor del gene que codifica para factor

de necrosis tumoral- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), inhibiendo su transcripción. La activación de PPAR α da como resultado un aumento de la lipólisis y la eliminación plasmática de lipoproteínas ricas en TAG aterogénicos a través de la activación de LPL y ApoAV, reduciendo la producción del inhibidor de la LPL- ApoCIII.

Estos mecanismos, que estimulan la lipólisis de TAG, C-VLDL y QM, promueven la β -oxidación de los ácidos grasos en hígado, reduciendo la disponibilidad de ácidos grasos libres para la síntesis de TAG; de igual forma, la síntesis de ácidos grasos de novo se inhibe a través de reducciones en la actividad de Acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintasa. Los niveles de C-HDL se elevan al estimular la producción de Apo AI y al aumentar la lipólisis de los TAG, que también aumenta el aporte de componentes superficiales de las HDL. También tienen acciones antioxidantes, disminuyendo la oxidación de LDL, acciones antitrombóticas y antiinflamatorias, esta última también resultante de la activación de PPAR- α , que inhibe la expresión de interleucinas (IL- 1 e IL-6), de ciclooxigenasa-2 (COX-2), proteína C reactiva (PCR), moléculas de adhesión, factor tisular, fibrinógeno e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI- 1) y en algunos ensayos clínicos, los fibratos disminuyeron la resistencia a la insulina en pacientes diabéticos (Goldenberg, 2008).

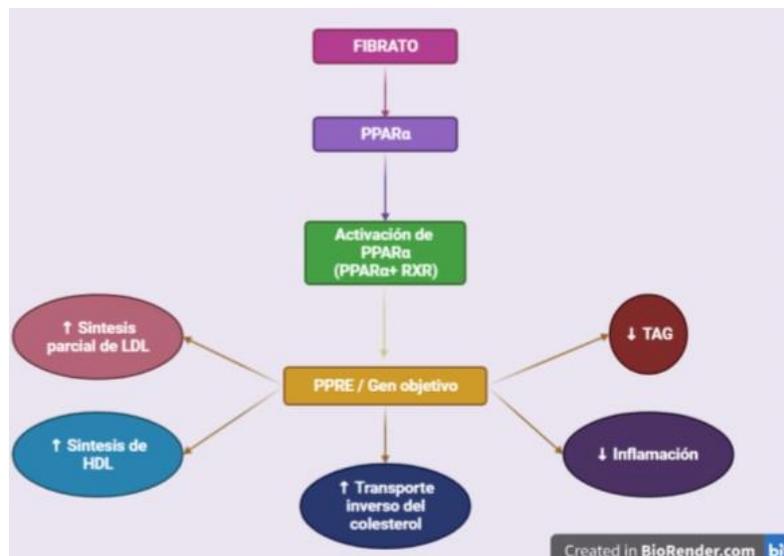


Fig. 12.- Mecanismo de acción de los fibratos. Abreviaturas: HDL, lipoproteína de altadensidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; PPAR α , receptor α activado por el proliferador de peroxisomas; PPRES, elementos de respuesta al proliferador de peroxisomas; RXR, receptor X de retinoides; \uparrow indica aumento; \downarrow indica disminución. Goldenberg, 2008.

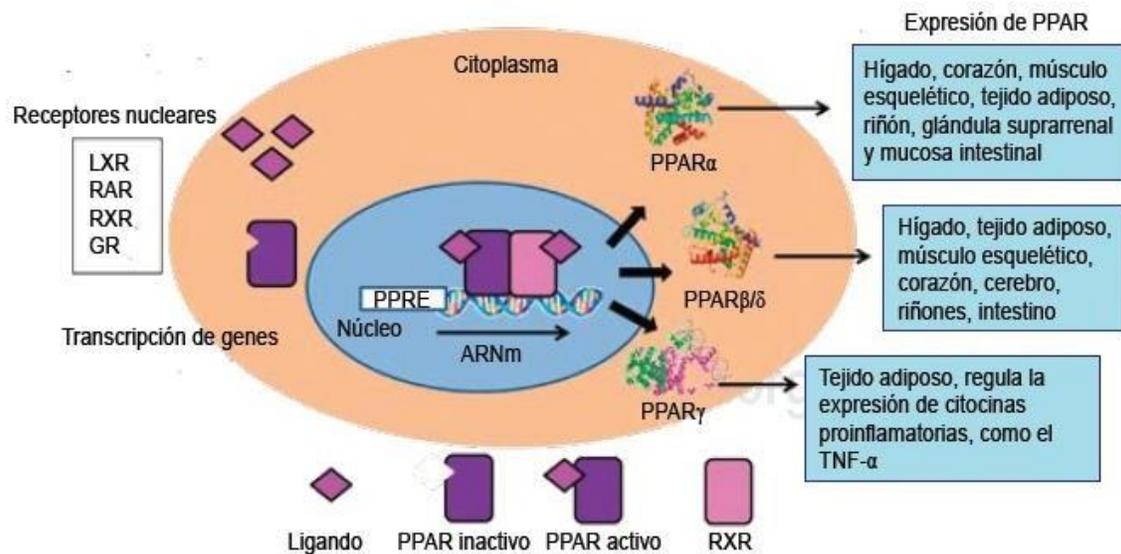


Fig. 13.- Mecanismo de acción y expresión de PPAR. Montilla, 2020.

6.4. Efectos secundarios

Las reacciones adversas más comunes son: malestar epigástrico, flatulencias, náuseas, diarrea, estreñimiento, prurito, urticaria, eritema, debilidad muscular, dolor, calambres, cefalea y mareos. Al inicio de la terapia con Bezafibrato, ocasionalmente, disminuye los niveles de hemoglobina, leucocitos y plaquetas. Alrededor del 0.1 % de los pacientes que consumen fibratos presentan elevación de aminotransferasas (AST y ALT) y creatina quinasa (CPK) y disminución o aumento de fosfatasa alcalina (FA), presentando problemas hepáticos. El uso de fibratos puede aumentar la excreción de bilis llegando a provocar colelitiasis o ictericia. Otros efectos son alteraciones pancreáticas (pancreatitis) y musculoesqueléticas (Goldenberg, 2008; Hermes, 2005).

7. MEDICINA TRADICIONAL CHINA (MTCH)

La Medicina Tradicional China (MTC) se fundamenta en el taoísmo o daoísmo; enseñanza del camino; se trata de la tradición filosófica y religiosa más practicada en China que hace referencia a vivir armónicamente con el tao "camino". Emplea

conceptos como el Qi, Yin/Yang y la teoría de los 5 elementos, considerando al cuerpo humano como un microsistema que debe estar en armonía con el medio ambiente y al proceso de enfermedad como el desequilibrio de las energías o a la existencia de ciclos de control inadecuados en el organismo. La interacción entre Xue – sangre , Qi- energía y Jinye - líquidos corporales, establecen el funcionamiento normal general corporal, los cuales influyen directamente en los Zang fu (órganos y vísceras), así como en la circulación de los canales, por lo tanto el dinamismo vital del cuerpo se basa en el concepto general que los seres humanos están controlados por la energía, creando así un equilibrio entre Yin/Yang y cinco elementos, cuando no hay cambio entre estas constantes el individuo tiene una gran capacidad de autorregulación para mantener una salud adecuada (Ospina R, 2016).

A continuación, se describen 3 métodos medicinales usados como tratamientos basados en esta filosofía.

7.1. Acupuntura

De acuerdo con la NOM-017-SSA3-2012 la acupuntura es un método clínico-terapéutico no medicamentoso, útil en el manejo médico, que consiste en la inserción de agujas metálicas, esterilizadas de cuerpo solido en puntos específicos, sobre la superficie del cuerpo humano (NOM-017-SSA3-2012, 2012).

7.2. Electro-acupuntura

Forma parte de las terapéuticas reconocidos por la OMS, considerada un tipo de medicina alternativa o complementaria, es un método de estimulación acupuntural en el cual se aplica una corriente eléctrica a las agujas de acupuntura (previamente insertadas en el sujeto), para estimular un acupunto, con el fin de desencadenar una respuesta bilógica y terapéutica específica (Becerril, 2020).

7.3. Moxibustión

Método terapéutico no invasivo, por medio del cual se tratan y previenen las enfermedades a través de la aplicación de calor sobre puntos específicos de acupuntura, canales y colaterales, con el objetivo de desencadenar una respuesta biológica en el organismo. De acuerdo con la técnica esta se divide en dos: moxibustión indirecta y directa, donde la diferencia radica en el uso o no de vehículos para emitir el estímulo de calor irradiado sobre la piel del paciente, respectivamente. Dicho vehículo puede ser una rodaja de ajo, jengibre, cebolla, macerados de plantas, sal, galletas de acónito; incluso una aguja (Becerril, 2020).

8. MTCH Y LAS DISLIPIDEMIAS

Las dislipidemias vistas desde la MTC se consideran como un estancamiento de flema (factor patógeno interno por un desorden funcional en el pulmón, bazo y riñón) y humedad (factor patógeno externo o interno generado por alguna disfunción de algún órgano sano) que ocasiona alteraciones en la transformación y transporte de los líquidos corporales en el organismo parte de los cuales se transforma en flema causante de enfermedad (Instituto de Medicina Tradicional de Beijing, 1984)

Los principales factores que influyen en la formación de la flema son: alimentación inadecuada (cantidad y calidad), consumo excesivo de comidas grasas o fritas, así como de alimentos fríos o crudos, desorden en los horarios de alimentación, trabajo excesivo, preocupaciones constantes, exposición prolongada al clima húmedo, enfermedades crónicas, alcoholismo y tabaquismo, todo esto afecta la función de *Bazo* para transformar y transportar los líquidos y alimentos. Según la MTCH la función principal del bazo es ayudar al estómago a transportar y transformar la esencia de los alimentos, extrayendo los nutrientes de estos y separando la parte “clara” la cual sube a Pulmón para ser distribuida a la piel y la parte turbia que envía a los intestinos para ser de nuevo separada. El bazo es el órgano central para la producción de Qi, ya que, extrae de la comida y bebida ingerida el Qi de los alimentos (Gu Qi) que es la base para la formación de sangre y energía (Maciocia, 2015).

Otras causas son el estancamiento energético del hígado por problemas emocionales (colera, frustración, resentimientos, brotes periódicos de coraje, obstrucción de los sentimientos y acciones del individuo, intolerancia y odio), invasión de la energía patógena externa frío-humedad, lesión traumática abierta o cerrada, deficiencia de sangre y de energía (Ospina, 2016).

La principal causa de la formación de flema en el organismo es la deficiencia de *Bazo*, si este es incapaz de transformar y transportar los líquidos orgánicos, la esencia de estos no puede ser distribuida normalmente por lo que se acumulan constituyendo el *Tan-yin* (Flema - Humor). Tanto la flema (*Tan*) como el humor (*Yin*) se consideran agentes patológicos originados por la disfunción del metabolismo de los líquidos orgánicos, ocasionando la acumulación y estancamiento del agua, debido a la falta de distribución y transformación de esta se convierte en *Yin*-humor, su persistencia constituye la formación de Flema – *Tan* (Lozano, 2015). Otra causa de la formación de flema es la deficiencia de Riñón, órgano encargado de controlar el agua, su cierre y apertura, es el fundamento del yin y del yang en todo el cuerpo, por lo que si existe disfunción de sus funciones e inadecuada transformación de la energía puede constituir la flema, la cual puede afectar al *corazón*, invadir a *pulmón* y estancar al *Bazo* provocando que el *Tan-Yin* se vuelva crónico y persistente (Lozano, 2015).

Un estudio realizado en el 2012 por Ling LI y colaboradores, demostró que la aplicación de electroacupuntura (EA) en el punto acupuntural Fenglong (ST40), se encuentra en la cara lateral del musculo extensor largo de los dedos del pie y el musculo peroneo corto, reduce los niveles de colesterol sérico y triacilglicéridos en tejidos hepáticos de ratones macho C57BL/6J con hipercolesterolemia debido a la modulación de la expresión génica de transductores de señal del óxido nítrico (NO). En la experimentación se empleó PCR en tiempo real y Western Blot; los resultados obtenidos demuestran que la aplicación de EA en ST40 induce la expresión de óxido nítrico sintasa (Nnos) y metalotioneína 1 (Mt1), genes implicados en la transducción de señales de NO. Otro de los genes que presentó modulación en el estudio anterior

fue el gen de la apolipoproteína A-II, el cual codifica para la proteína con el mismo nombre, esta proteína es la más abundante en las HDL y su principal función es regular las concentraciones de colesterol, por lo que su deficiencia puede ocasionar alteraciones en su metabolismo y por lo tanto hipercolesterolemia (Ling Li, 2012). El estudio *“Influencia de la temperatura de la moxibustión sobre los lípidos sanguíneos, endotelina-1, y el óxido nítrico en pacientes con hiperlipidemia”*, realizado en 2013 por Xianfeng Ye y Huifang Zhang, en el Departamento de acupuntura-moxibustión del Tercer Hospital Afiliado al Henan Colegio de Medicina Tradicional China, sometió a 21 de 42 pacientes diagnosticados con hiperlipidemia primaria a un tratamiento con moxibustión a diferentes temperaturas durante 12 semanas, realizándose 7 mediciones de lípidos en sangre, endotelina 1 y óxido nítrico. Los resultados obtenidos demostraron que la concentración de colesterol total y TAG fueron inferiores en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo control ($P < 0.05$), la cuantificación de endotelina-1 y endotelina-1/NO en suero fue notablemente más baja en el grupo de tratamiento ($P < 0.001$). La moxibustión reguló el NO y la endotelina-1/NO en el grupo de tratamiento de mejor manera que en el grupo control y aumento la expresión de la apolipoproteína A-I, la cual permite que las HDL realicen un lavado rápido y eficiente del exceso de colesterol a través de su transporte al hígado para ser eliminado por la bilis. (Ye, 2013).

8.1. TRATAMIENTO

Desde el punto de vista de la MTC, el tratamiento aplicado va dirigido a cada síndrome de forma individual presente en el paciente, por lo que se debe jerarquizar de forma racional y coherente teniendo en cuenta la situación actual del paciente, lo anterior obliga al profesional de salud a determinar el objetivo del tratamiento, el método terapéutico y puntos a estimular. Para las dislipidemias y Síndrome metabólico se debe fortalecer el Yang y el Qi de Bazo, el Yang de Riñón, movilizar la energía del Hígado, eliminar la humedad y transformar la flema (Ospina, 2016).

Actualmente el uso del MTC en distintas regiones del mundo como principal vía de tratamiento de diversas enfermedades no es recurrente debido que menudo utiliza

categorías de diagnóstico que no se corresponden con los conocimientos científicos actuales etiología de la enfermedad como la deficiencia general, exceso de yin o yang, flema, sin embargo, la OMS reconoce su utilidad en el tratamiento de algunas enfermedades, promueve su regulación e integración en los sistemas nacionales de salud y recomienda realizar estudios de investigación al respecto (NOM-017-SSA32012 , 2012).

9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, considerada hoy en día como una herramienta imprescindible en el área de Genética Molecular e Ingeniería Genética, se trata de la amplificación o replicación in vitro de miles de millones de copias de forma directa de un gen o fragmento de DNA o indirecta de RNA (mediante cDNA) durante varios ciclos, presentes en mezclas de diversas fuentes, sin necesidad de la purificación previa de la muestra integra inicial (Luke, 2000).

Los elementos principales de esta reacción enzimática son el templado o molde (DNA o cDNA), enzima DNA polimerasa (sintetiza de forma natural el DNA de las células, la más empleada es la Taq DNA polimerasa proveniente de *Thermus aquaticus*), oligonucleótidos o primers (secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco y son complementarios a ésta, su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases (pb) cuyo % G-C no debe mayor al 55% de la secuencia, se trata de dos secuencias diferentes de primers una denominada forward o sentido y otra reverse o antisentido), desoxirribonucleótidos trifosfatados o dNTP's (bases nitrogenadas con las que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN la concentración empleada oscila entre 0.2 a 1.0 μ M), ion magnesio Mg⁺ (cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, la concentración de trabajo oscila entre 0.5 y 2.5 μ M), buffer (solución amortiguadora compuesta generalmente de Tris-HCl con un pH= 8 cuya concentración final debe ser 1X) y H₂O (disolvente en la reacción, debe ser destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.). Todos estos elementos interactúan

en las tres etapas principales de la reacción, que más adelante se detallan. La reacción se lleva a cabo en equipos llamados termocicladores, los cuales establecen un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo permanecen constantes en cada ciclo. Al finalizar la reacción, se corrobora la amplificación de la secuencia blanco o amplicones en geles de agarosa (Luke, 2000; Tamay de Dios, 2013).

Requiere de una sucesión de ciclos, generalmente de 20 a 40 ciclos de 1.5- 5 min de duración por ciclo, con una duración aproximada de 2 h. Consta de tres etapas principales, véase *Fig 14*:

- 1. Desnaturalización:** Calentamiento que provoca la separación de las dos hebras de DNA, mediante una incubación corta (30-120 s) a temperaturas entre los 68 y 97 °C, dicha temperatura debe ser mayor a la T_m de la región que se desea amplificar (región diana).
- 2. Templado o hibridación:** Etapa de enfriamiento rápido que permite la hibridación de las hebras sencillas del DNA de interés con los cebadores, esta temperatura va de los 37 a los 65 °C durante 10-120 s, dicha temperatura debe de estar por debajo de la T_m de la región diana.
- 3. Elongación o replicación:** Se trata propiamente de la etapa de amplificación, cuya temperatura oscila entre los 72-75 °C con una duración de 1-3 min. En esta etapa la DNA polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde las hebras originales. La dirección de la replicación presenta un sentido $5' \rightarrow 3'$ comenzando el $3'-OH$ de cada cebador, los dNTP's y Mg^{+} como sustratos hasta que inicie el siguiente ciclo con la etapa de desnaturalización.

Además de las 3 etapas, mencionadas anteriormente, se añade una etapa previa y una etapa final al conjunto de todos los ciclos, la etapa previa se realiza a una

temperatura elevada superior a la de todas las demás etapas sirve para inactivar proteasas y nucleasas presentes en la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del DNA de partida, especialmente si el DNA que se desea amplificar es de gran tamaño o posee regiones muy compactas, por su parte, la etapa final consiste en una prolongación de la última elongación, por lo que al temperatura de trabajo es de 72 °C, permitiendo que se completen todos los fragmentos (Luke, 2000).

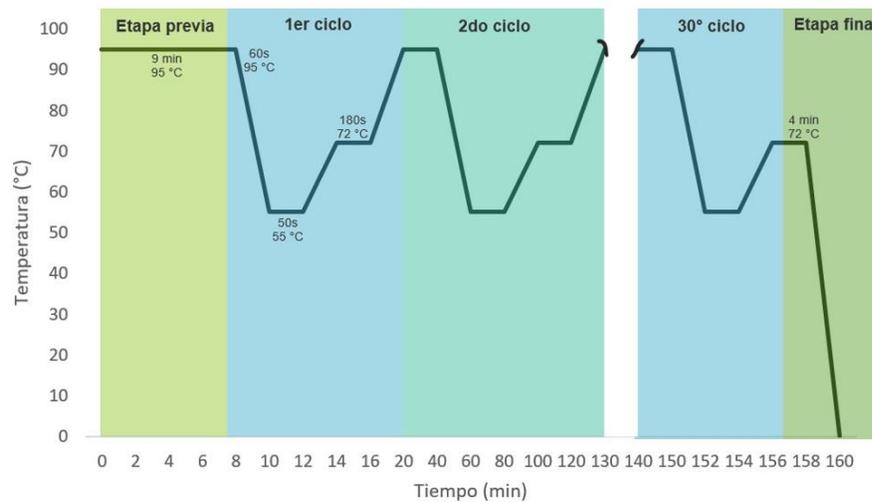


Fig. 14.- Esquema temporal de una PCR. Las temperaturas y tiempos marcados son orientativos estos varían dependiendo la muestra a utilizar. Luke, 2000.

9.1. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

En 1992, Higuchi y colaboradores desarrollaron la PCR en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (qPCR), al videograbar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al DNA durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV. El objetivo de la qPCR es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos en cada ciclo mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción sin que haya la necesidad de correr un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa como en la PCR punto final. Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos, aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar

cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR punto final que necesita una mayor concentración. Los elementos empleados en la qPCR son los mismos utilizados en la PCR punto final, salvo el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados, estos junto con los demás elementos se venden en una solución conocida como “Máster Mix”. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y deben generar amplicones de entre 100-150 pb, si su tamaño es mayor la eficiencia de la reacción disminuye (Herrera, 2021; Tamay de Dios, 2013).

9.2. qPCR con reverso transcripción (RT-qPCR)

Durante la reacción, si usamos como sustrato DNA genómico, hablamos de una qPCR convencional, pero si se utiliza DNA complementario (cDNA) proveniente del RNA mensajero (RNAm) se dice que se realiza una qRT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante la transcripción reversa, catalizada por la enzima transcriptasa reversa, la cual pasa la molécula de RNAm a cDNA. Este método fue copiado de los retro virus que usan la transcriptasa reversa para convertir su genoma de RNA en DNA, duplicándose en millones de partículas virales. El cDNA se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés (Luke,2000; Tamay de Dios, 2013).

5. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) más del 30% de la población mundial adulta padece de algún tipo de dislipidemia, ocasionando 4.4 millones de muertes prematuras por año (OMS, 2016). La hipertriacilgliceridemia en México afecta al 21 % de las mujeres y 17.7% de los hombres, elevando el riesgo para desarrollar alguna enfermedad cardiovascular y morir a causa de ella (ENSANUT, 2018). En 2011 un estudio de tipo descriptivo, retrospectivo de corte transversal realizado en población mexicana demostró que la hipertriacilgliceridemia persiste en la población mexicana pese a recibir un tratamiento de tipo farmacológico, ya que el 45.7 % de los hombres y 40.4% presentaban una concentración plasmática de TAG superior a 150 mg/dL. La prevalencia de estas patologías se encuentra altamente asociada a malos hábitos alimenticios y al sedentarismo. La dieta mexicana se basa mayoritariamente en el alto consumo de carbohidratos y grasas desde edades tempranas, por ello surge la necesidad de plantear alternativas terapéuticas que sean más accesibles y eficaces en el tratamiento de estas patologías, contribuyendo a su vez, en disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares que culminen en la muerte prematura del paciente.

6. OBJETIVOS

6.1. *General*

Evaluar el nivel de expresión del gen APOAV mediante qPCR en pacientes diagnosticados con hipertrigliceridemia tratados con electroacupuntura/moxibustión y pacientes tratados con fibratos

6.2. *Particulares*

6.2.1. Evaluar niveles de expresión de los genes APO-AV y Actina, en pacientes diagnosticados con hipertrigliceridemia antes y después de cada tratamiento, mediante la estandarización de qPCR con la finalidad de determinar un tratamiento óptimo.

6.2.2. Realizar un análisis comparativo de la expresión génica de APOAV antes y después del tratamiento en ambos grupos mediante pruebas estadísticas.

7. ANTECEDENTES

Un estudio realizado en el 2012 por Ling Li y colaboradores, demostró que la aplicación de electroacupuntura (EA) en el punto acupuntural Fenglong (ST40), se encuentra en la cara lateral del musculo extensor largo de los dedos del pie y el musculo peroneo corto, reduce los niveles de colesterol sérico y triacilglicéridos en tejidos hepáticos de ratones macho C57BL/6J con hipercolesterolemia debido a la modulación de la expresión génica de transductores de señal del óxido nítrico (NO). En la experimentación se empleó PCR en tiempo real y Western Blot; los resultados obtenidos demuestran que la aplicación de EA en ST40 induce la expresión de óxido nítrico sintasa (Nnos) y metalotioneína 1 (Mt1), genes implicados en la transducción de señales de NO. Otro de los genes que presentó modulación en el estudio anterior fue el gen de la apolipoproteína A-II, el cual codifica para la proteína con el mismo nombre, esta proteína es la más abundante en las HDL y su principal función es regular las concentraciones de colesterol, por lo que su deficiencia puede ocasionar alteraciones en su metabolismo y por lo tanto hipercolesterolemia (Ling Li, 2012). El estudio *“Influencia de la temperatura de la moxibustión sobre los lípidos sanguíneos, endotelina-1, y el óxido nítrico en pacientes con hiperlipidemia”*, realizado en 2013 por Xlanfeng Ye y Huifang Zhang, en el Departamento de acupuntura-moxibustión del Tercer Hospital Afiliado al Henan Colegio de Medicina Tradicional China, sometió a 21 de 42 pacientes diagnosticados con hiperlipidemia primaria a un tratamiento con moxibustión a diferentes temperaturas durante 12 semanas, realizándose 7 mediciones de lípidos en sangre, endotelina 1 y óxido nítrico. Los resultados obtenidos demostraron que la concentración de colesterol total y TAG fueron inferiores en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo control ($P < 0.05$), la cuantificación de endotelina-1 y endotelina-1/NO en suero fue notablemente más baja en el grupo de tratamiento ($P < 0.001$). La moxibustión reguló el NO y la endotelina-1/NO en el grupo de tratamiento de mejor manera que en el grupo control y aumento la expresión de la apolipoproteína A-I, la cual permite que las HDL realicen un lavado rápido y eficiente del exceso de colesterol a través de su transporte al hígado para ser eliminado por la bilis. (Ye, 2013).

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Grupo de estudio

El estudio se realizó en pacientes que acudieron a consulta en la clínica de Acupuntura de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, ubicada en Av. Guillermo Massieu Helguera 239, La Escalera, Alcaldía Gustavo A. Madero, C.P. 07320, Ciudad de México, en el periodo comprendido de octubre - diciembre de 2021, dichos pacientes fueron evaluados bajo los siguientes criterios (Tabla 1), trabajando únicamente con aquellos que cumplían los criterios de inclusión.

Tabla 1

Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para la población de estudio.

Inclusión	Exclusión	Eliminación
*Pacientes femeninos y masculinos		*Pacientes que decidan abandonar por voluntad propia el proyecto de investigación.
*Rango de edad: 30-50 años		*Pacientes que no acudan a más de dos sesiones de tratamiento.
*Pacientes con previo diagnóstico de hipertrigliceridemia mediante perfil lipídico, (TAG >150 mg/dL)	*Pacientes con enfermedades cardiovasculares o que utilicen marcapaso.	*Pacientes que durante el tratamiento requieran de hospitalización o tratamiento de otra índole.
*Pacientes que acepten el tratamiento por voluntad propia y firmen la carta de consentimiento informado.		

Solo 30 pacientes cumplieron con los criterios anteriormente mencionados, tras su selección, se conformaron dos grupos de forma aleatoria, denominados: Grupo Electroacupuntura/Moxibustión (EAM) y Grupo Bezafibrato (B), las características del tratamiento aplicado a cada grupo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupos de estudio y tratamiento aplicado.

Grupo	Tratamiento
EAM (n=15)	Electroacupuntura más Moxibustión indirecta 2 sesiones por semana (10 sesiones en total) durante 5 semanas
B (n=15)	Bezafibrato 200 mg cada 24 horas durante 5 semanas

8.2. Datos antropométricos

Se registraron: edad, sexo y medidas antropométricas de cada paciente perteneciente al estudio.

8.3. Toma de muestra y perfil lipídico

Se tomó muestra de sangre periférica antes y 5 semanas después del tratamiento a los 15 pacientes pertenecientes a cada grupo de estudio, en la clínica de Acupuntura de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. Las muestras recolectadas antes del inicio del tratamiento correspondiente se etiquetaron según el grupo de estudio como: EAM1 y B1, dicha muestra funcionó como Control. Las muestras tomadas a las 5 semanas de tratamiento fueron etiquetadas como EAM2 y B2. En cada una de las muestras fueron evaluados los niveles de lipoproteínas presentes en plasma mediante un perfil lipídico. A ambos estudios se les realizó un análisis estadístico descriptivo con la finalidad de trabajar con medias poblacionales.

9. ANÁLISIS MOLECULAR

9.1. Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi 1987 y 2006 (Martínez et. al, 2013) a partir del plasma de los pacientes, dicho proceso se describe a continuación y se plasma en la *Figura 15*.

Se colocaron 1.5 mililitros (mL) del paquete leucocitario y 1 mL TRIzol® en un tubo Eppendorf, el tubo se mezcló en vortex por 5 minutos (min). El reactivo TRIzol® contiene una mezcla monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, esta mezcla lisa las células y componentes celulares permitiendo extraer el material genético como RNA y DNA, presenta, además, actividad inhibidora de ribonucleasas (RNAsas), lo cual asegura la integridad del material genético. Pasados los 5 min la muestra se centrifugó a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min a 4 °C, disociando el complejo de nucleoproteínas. Tras la centrifugación se decantó el sobrenadante del lisado, pellet o pastilla (DNA-RNA), este se transfirió a otro tubo Eppendorf limpio al cual se le agregaron 200 microlitros (µL) de Cloroformo, se agitó vigorosamente en vortex durante 15 segundos (s), se incubo a temperatura ambiente (37 °C) durante 3 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Terminado el proceso de centrifugación se forman tres fases en el tubo Eppendorf: de abajo hacia arriba, se encuentra una fase de color rojo correspondiente al fenol cloroformo, también llamada fase fenólica la cual contiene proteínas, la parte central corresponde a la fase tipo gel que cuyo contenido es DNA y por último en la parte superior se encuentra la fase acuosa que contiene al RNA.

La fase acuosa se transfirió cuidadosamente, evitando contaminar la muestra con alguna de las fases inferiores (mismas que pueden almacenarse para extraer DNA o proteínas si fueran necesario) a un tubo Eppendorf limpio. Se agregaron 500 µL de Isopropanol, se incubó a 37 °C durante 10 min, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C formado así en el fondo del tubo un botón o pellet de RNA. Se decantó el sobrenadante (Isopropanol), el botón de RNA se lavó con 1 mL de Etanol (EtOH) al 75% y se centrifugó a 9,500 rpm durante 5 min a 4 °C,

posteriormente se decanta el EtOH y se dejó secar el botón de RNA de 15 a 20 min, evitando secar completamente. Por último, el pellet se re-suspendió en 20 μ L de agua/Dietilpirocarbonato al 0.05% (DEPC) libre de RNAsas y se incubó por 10 minutos a 55-60°C. El RNA obtenido se mantuvo a -20°C durante el tiempo de su almacenamiento.

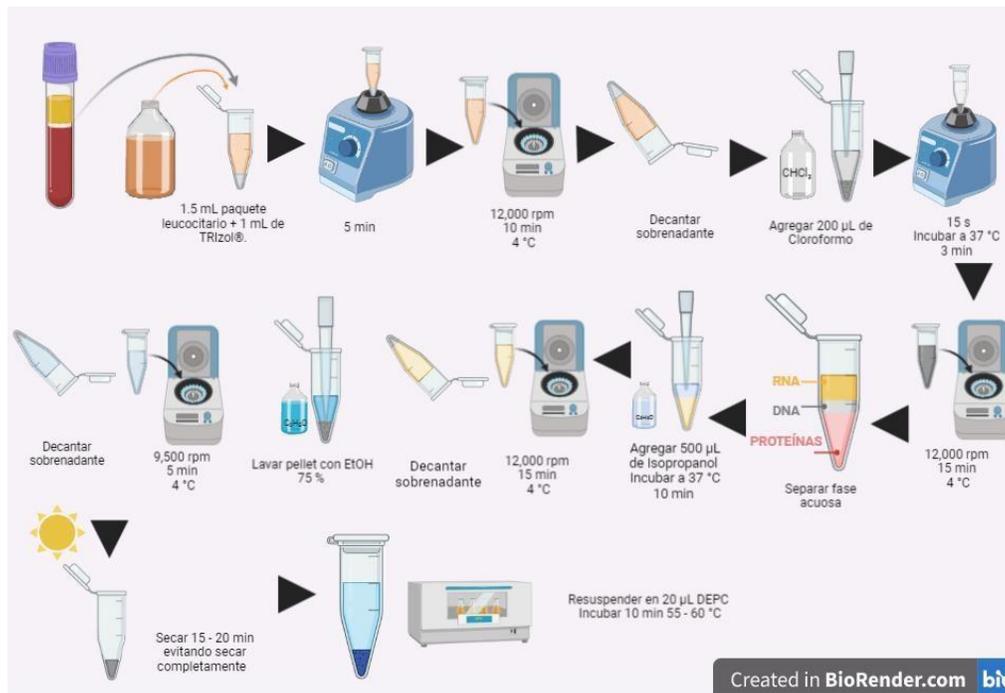


Figura 15. Esquema general de trabajo para la extracción de RNA de muestra periférica. Fuente propia.

9.2. Cuantificación de RNA por espectrofotometría

Se utilizó un espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ de BioTek. Dentro del sistema del equipo el tipo de muestra elegida fue RNA con su respectiva longitud de onda a 260 nanómetros (nm), a dicha longitud de onda únicamente se detecta el contenido de ácidos nucleicos. Previo al uso de las placas se desinfectaron con EtOH al 70% y papel seda especial. En el primer pocillo de la placa se colocaron 2 μ L de agua DEPC (Blanco) y en los pocillos restantes 2 μ L de cada muestra sin diluir, como se muestra en la Fig. 16.

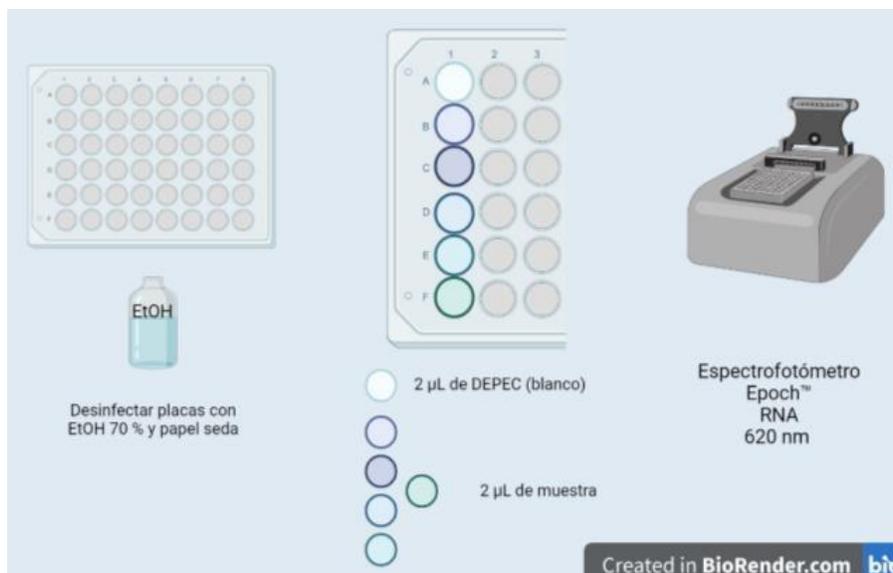


Figura 16. Esquema general de trabajo para la cuantificación de RNA extraído en muestra de sangre venosa de cada paciente. Fuente propia.

9.3. Integridad del RNA

9.3.1. Tratamiento de muestras

Todas las muestras obtenidas de RNA fueron tratadas con desoxirribonucleasas [DNasa] (RQ1 RNase free DNase Promega) para poder eliminar las trazas de DNA existentes, esto garantizaba la integridad del RNA y a su vez daba la certeza de que la expresión génica resultante era fiable. Para realizar el proceso se colocó 1 microgramo (μg) del RNA en un tubo Eppendorf, dependiendo de la concentración de cada muestra el volumen variaba, pero siempre se colocó la misma concentración, al cual se le añadió 1 μL del Buffer de Reacción 10X y 1 μL de la enzima DNasa, ya incorporado se dejó incubar por 30 minutos a una temperatura de 37°C. Posteriormente, para la inactivación de la enzima, se le añadió 1 μL de solución de paro de EDTA y nuevamente se incubó la mezcla durante 10 minutos a una temperatura de 65°C, véase *Fig 17*.

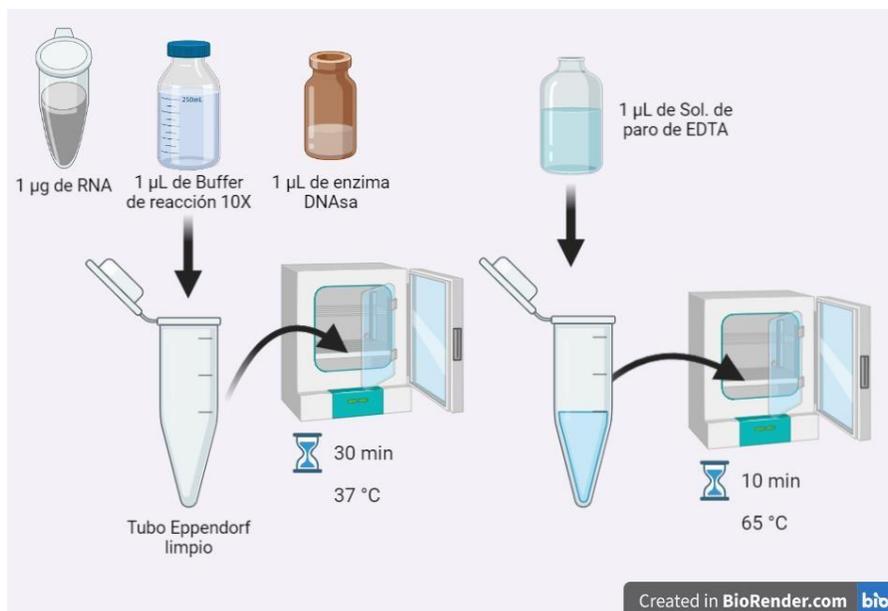


Figura 17. Esquema general de trabajo del tratamiento del RNA extraído y cuantificado decada muestra sanguínea. Fuente propia.

9.3.2. Electroforesis

Para comprobar la integridad del RNA se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5%; para ello se pesaron 0.45 gramos (g) de agarosa que fueron disueltos en 30 mL Tris-Borato-EDTA [Ácido etilendiaminotetraacético] o TBE 1X, la mezcla se calentó poco a poco para tener una mezcla homogénea, seguido a esto se vertió en el molde, se colocó el peine para formar los pozos y se dejó enfriar hasta gelificar. Posteriormente se retiró el gel del molde, evitando romperlo, se llenó la cámara con TBE 1X hasta la marca indicada y se colocó nuevamente el gel. Para cargar los pozos del gel, se mezclaron 4 µL del RNA con 2 µL del buffer de carga, el tiempo de corrida fue de 30 min a una carga de 100 volts. Debido a la carga molecular negativa del RNA durante la electroforesis el material genético migra hacia el ánodo. Al finalizar la corrida el gel se tiñó con Bromuro de Etidio durante 15 min. El Bromuro de Etidio es un agente intercalante que se introduce en las bases nitrogenadas y en presencia de luz ultravioleta (UV) emite fluorescencia lo que permitió identificar el material genético. Tras la tinción del gel este se colocó en una cámara de luz UV para revelar las bandas, véase Fig 18.

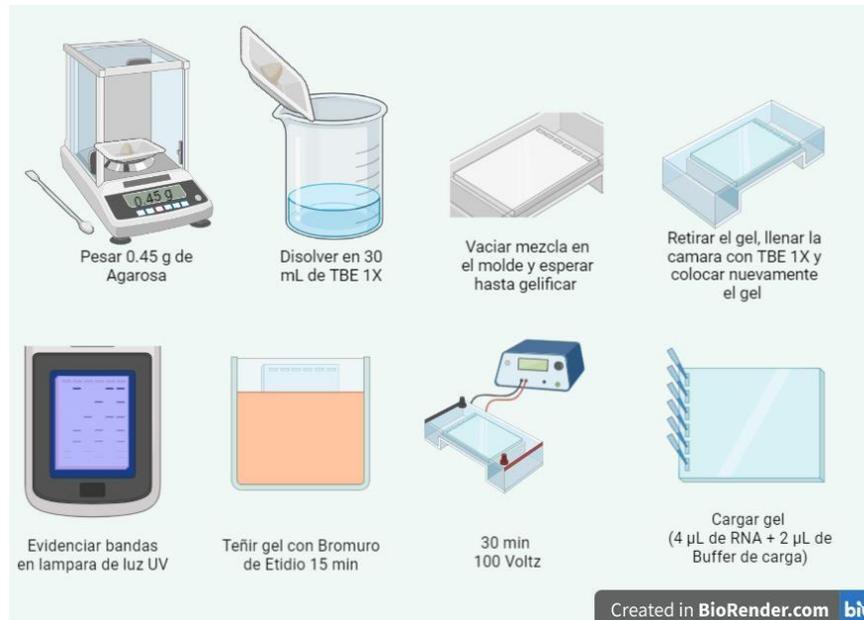


Figura 18.- Esquema general de trabajo de la corrida electroforética del RNA extraído y cuantificado de cada muestra sanguínea. Fuente propia.

9.4. Síntesis de cDNA para la amplificación en tiempo real

Posteriormente, se realizó la síntesis de DNA de cadena simple (cDNA) del RNA total empleando Kit Superscript II reverse transcriptase de Invitrogen. Se colocaron 8 µL de RNA (400 ng/ µL) en un tubo Eppendorf nuevo, a los cuales se le añadió 1 µL de Mix de dNTP's a 10 µM y 1 µL del OligodT (0.5µg/µl), se homogeneizó e incubó durante 5 minutos a 65°C, posteriormente se incubó 1 min a 4 °C. Se agregaron 4 µL de Buffer 5X, 4 µL de Cloruro de Magnesio (MgCl₂ 3 µM), 2 µL de diclorodifeniltricloroetano (DTT 0.1M), y 1 µL de RNasaOut o inhibidor de RNasa (40U/µl), se homogeneizó e incubó durante 2 minutos a 42°C en el termociclador, inmediatamente al terminar la incubación se añadió 1 µL de la enzima Superscript II RT (200U/µl) y se dejó en el termociclador en dos fases: la primera a 42°C durante 50 minutos y la segunda a 72°C durante 15 minutos, posteriormente se conservó a -20°C hasta su uso, véase Fig 19.

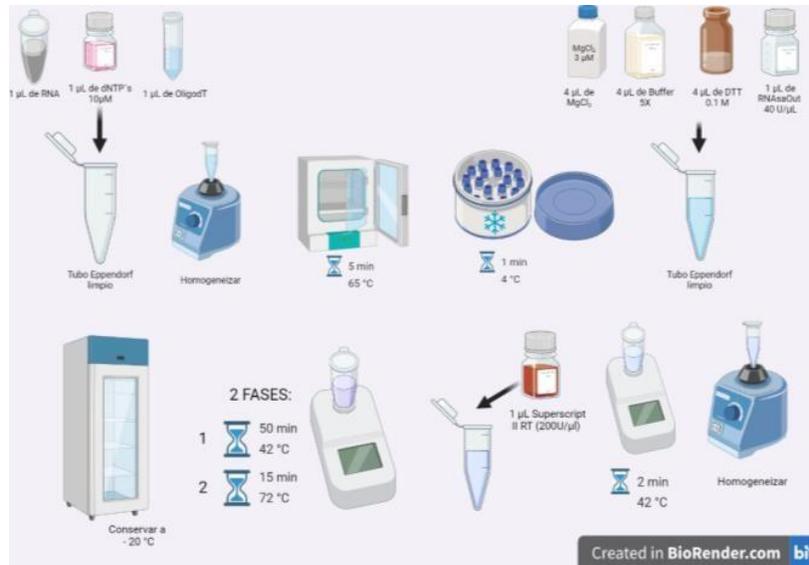


Figura 19.- Esquema general de trabajo de la síntesis de cDNA. Fuente propia.

9.5. Estandarización de genes endógenos y problema en qPCR

9.5.1. Condiciones de ensayo de PCR

La reacción de amplificación consistió en un primer paso o desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos consecutivos, 10 segundos a 95°C, 45 segundos a 52°C y 30 segundos a 72°C. Finalmente se realizó una Melting Curve a 95°C por 15 segundos. La amplificación, detección de la señal y análisis de datos se realizaron en el equipo Techne Sistema de qPCR en tiempo real Prime Pro-48, véase Fig 20.

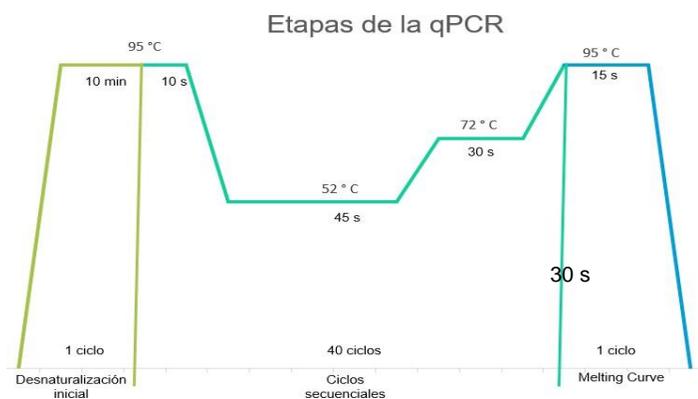


Figura 20.-. Esquema de condiciones de reacción de amplificación utilizadas para el pool demuestras. Fuente propia.

9.5.2. Reactivos de ensayo

Se emplearon cebadores marca IDT para cada uno de los genes a evaluar; las características de cada par de cebadores empleados en la técnica se describen en la *Tabla 3*.

Tabla 3
Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación de genes.

Gen	Secuencia	T _m °C	Tamaño de amplicón
Actina	Forward: 5'- GGA AGC GTT CAT TCC CAA TG-3'	54.48	150 pb
	Reverse: 5'- CGG GAG ATT GTG CGA GAT GT-3'	57.3	
GAPDH	Forward: 5'- ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	64.5	150 pb
	Reverse: 5'- TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	65.4	
APOAV	Forward: 5'- TCC GCC AGG ACA CCT ACC T-3'	60.6	150 pb
	Reverse: 5'- TCA GAA CTT TGC CAC TGT CTG T-3'	56.6	

Para la optimización de las condiciones de q-PCR se utilizó un sistema convencional comercial con Taq Polimerasa, dinucleótidos trifosfatos (dNTP's) y cloruro de magnesio (MgCl₂) marca Promega, las cantidades empleadas en la experimentación se describen en la *Tabla 4*.

Tabla 4.
Cantidades de reactivo utilizadas en la amplificación de genes.

Reactivo	Cantidad (µL)
SYBR Green PCR Máster Mix	6.25
Primer Forward	1.25
Primer Reverse	1.25
H ₂ O grado biología molecular	1.75
cDNA muestra	2
Volumen final por reacción	12.5

Nota: Los volúmenes presentes anteriormente se emplean para realizar una sola reacción, en la experimentación se realizaron cocteles con el volumen correspondiente al número de reacciones a realizar.

9.5.3. Modificación en las concentraciones de cDNA empleada para la estandarización de la amplificación de un fragmento del gen endógeno Actina y GAPDH

Previamente en otro estudio se estandarizó la concentración de cebadores para el gen de Actina, donde la concentración óptima fue equimolar a 3 μ M, sin embargo, dicha estandarización fue realizada en un equipo de trabajo diferente, por lo que dicha concentración se evaluó nuevamente en el equipo *Techne Sistema de qPCR en tiempo real Prime Pro-48*, véase *Fig 21*, con el fin de corroborar que dicha concentración fuera la óptima. Por su parte se evaluaron tres diferentes diluciones de muestra de cDNA, las cantidades de reactivo utilizado para dicha amplificación se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5
Cantidades de reactivo utilizadas en la amplificación de genes endógenos.

<i>Reactivo</i>	<i>Volumen (μL)</i>
SYBR Green PCR Máster Mix	6.25
Primer Forward (3 μ M)	1.25
Primer Reverse (3 μ M)	1.25
H ₂ O grado biología molecular	1.75
cDNA muestra (d1:5, 1:10 y 1:20)	2
Volumen final por reacción	12.5

Nota: Los volúmenes presentes anteriormente se emplean para realizar una sola reacción, en la experimentación se realizaron cocteles con el volumen correspondiente al número de reacciones a realizar.

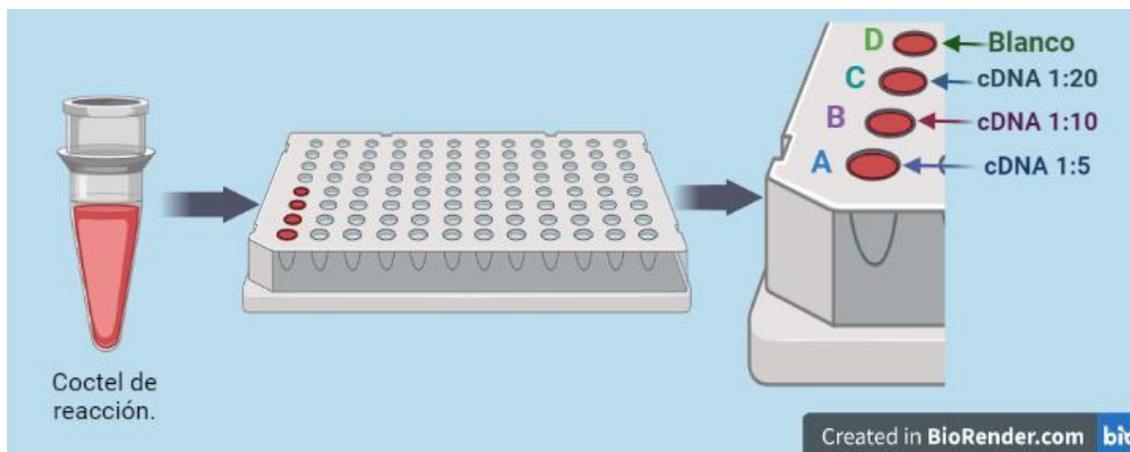


Figura 21.- Esquema general de trabajo para la estandarización de la amplificación de un fragmento del gen Actina y GAPDH. Se preparó un coctel para 5 reacciones, adecuando los volúmenes a utilizar basándose en los marcados en la *Tabla 5* y se evaluaron 3 diferentes concentraciones de cDNA (1:20, 1:10 y 1:5). En el pozo de reacción de la placa para qPCR se colocaron 10 μ L de coctel de reacción y 2 μ L de cDNA de la concentración a evaluar. acto seguido se realizó la amplificación. Fuente propia.

9.5.4. Modificación en las concentraciones de cebadores y cDNA empleados en la estandarización de APOAV

Se realizó un coctel de Primer forward para cada concentración a evaluar, 0.5 μ M, 3 μ M y 9 μ M respectivamente, cada concentración se evaluó por separado en una columna de la placa de reacción con concentraciones distintas de Primer Reverse (0.5 μ M, 3 μ M y 9 μ M). Por su parte en cada una de las filas presentes en la placa de reacción se evaluó la cantidad de cDNA a emplear (dilución 1:5, 1:10 y 1:20). Las cantidades de reactivos para la preparación de cocteles de Primer forward de cada concentración y concentraciones de Primer Reverse y muestra de cDNA empleadas en para la amplificación se describen en la *Tabla 6* y *Tabla 7* respectivamente. A continuación, se presenta un diagrama ilustrativo de la realización de la técnica, véase *Fig 22*.

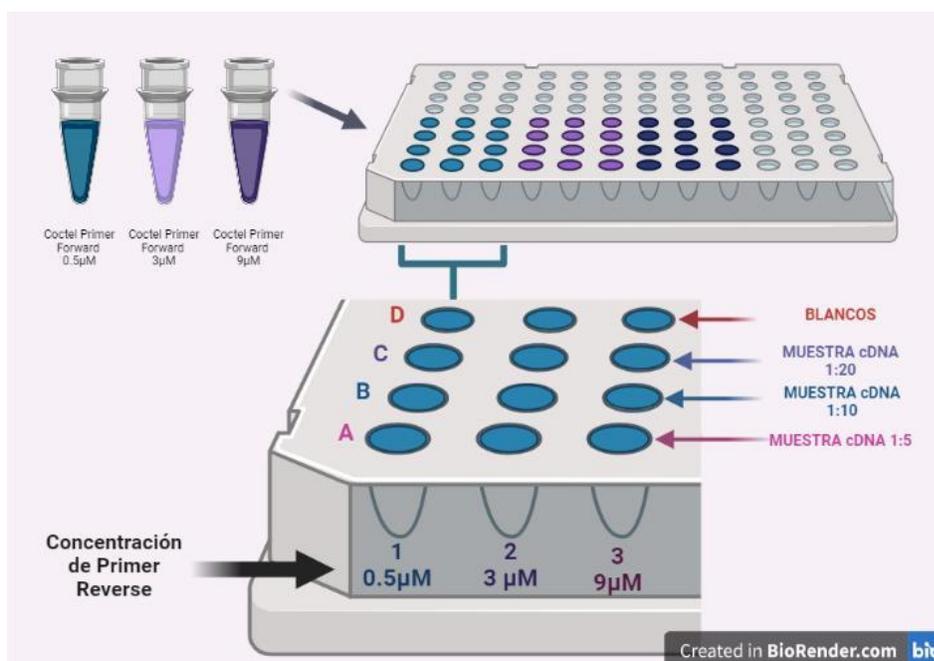


Figura 22.- Esquema general de trabajo para la estandarización de gen APOAV. Se trabajaron 3 concentraciones distintas tanto de primers como de cDNA. Para el caso de primers se realizó un coctel tomando como referencia el Primer Forward de cada una de las concentraciones 0.5µM, 3 µM y 9µM respectivamente, posteriormente se colocó 9.5 µL de coctel en cada uno de los pozos de reacción contenidos en la placa para qPCR, se agregó 1.25 µL de primer reverse y 2 µL de cDNA de la concentración marcada en la Tabla 6, acto seguido se realizó la amplificación. Fuente propia.

Tabla 6

Cantidades de reactivo utilizadas para la preparación del coctel de Primer Forward para la amplificación del fragmento del gen APOAV.

Reactivo	Cantidad (µL)
SYBR Green PCR Máster Mix	6.25
Primer Forward	1.25
H ₂ O grado biología molecular	1.75
Volumen final por reacción	9.25

Nota: Los volúmenes presentes anteriormente se emplean para realizar una sola reacción, en la experimentación se prepararon cocteles con el volumen correspondiente al número de reacciones a realizar.

Tabla 7

Concentraciones de Primer Reverse y cDNA utilizadas en la amplificación de genes.

Columna	Concentración de Primer Reverse		Muestra			
	(μM)	Fila A-D	FILA A	FILA B	FILA C	FILA D
1	0.5 μM					
2	3 μM		cDNA1:5	cDN	cDN	H ₂ O
3	9 μM			A	A	
				1:1	1:2	
				0	0	

9.6. Curvas de disociación de los genes amplificados

Tras la finalización de la PCR, las reacciones se sometieron a un incremento de temperatura de 72 °C a 95 °C con la finalidad de construir una curva de disociación del fragmento del gen amplificado. Dicha curva se basa en un gradiente de temperatura creciente tras la PCR para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados, es decir, permitir la apertura de la doble cadena del producto amplificado lo cual provoca que el SYBR Green intercalado se disocie de la cadena y la señal de fluorescencia dada disminuya. Lo anterior permite determinar la T_m de las amplificaciones y comprobar su especificidad, es decir, verificar que el producto final sea único.

9.7. Reproducibilidad y especificidad de la técnica

Para comprobar la reproducibilidad de la técnica, se realizaron por triplicado las reacciones de amplificación con cDNA obtenido de sangre periférica realizando 6 corridas en total. La especificidad de la técnica se comprobó analizando por triplicado las muestras de cDNA obtenidas.

9.8. Método de cuantificación

En la PCR en tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos cada ciclo, estos representan la cantidad de producto de amplificación en la reacción, por lo tanto, entre mayor templado presente una reacción al comienzo de la PCR el número de ciclos necesarios para alcanzar un punto en que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de reacción (C_T) será menor. El presente estudio empleó la cuantificación relativa, por lo que en dicho método se compara la C_T de la muestra antes (control) y después del tratamiento con electroacupuntura más moxibustión y Bezafibrato. Las cuantificaciones realizadas se normalizaron con un control endógeno (gen que no se modula tras el tratamiento) para considerar la variación en la concentración inicial, calidad de RNA y la eficiencia de la reacción de transcripción inversa.

El método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y cols, 2001) permite analizar cambios de expresión relativa. dicho método es similar al de cuantificación absoluta por curva estándar, excepto que en este método se emplean fórmulas aritméticas para alcanzar el mismo resultado, además de ser sencillo, de fácil manejo y el análisis es rápido. En primer lugar, se determinó el C_T del producto amplificado del gen problema antes del tratamiento (C_T APOV ANT) y del control endógeno GAPDH (C_T ACT ANT) del *pool* de muestras en las 6 diferentes corridas. Con estos datos se calculó ΔC_T , que es igual a la diferencia del C_T del gen problema y el C_T del gen endógeno, este fue calculado para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y en la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA. Posteriormente se calculó el $\Delta\Delta C_T$, de cada *pool* de muestras, este se obtuvo de la diferencia del ΔC_T menos el promedio de esta. Por último, la expresión del gen APOA, normalizada con el control endógeno Actina, se calculó por $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Así la diferencia en la expresión de APOA-V se expresó como *n*-veces relativa al control. Las ecuaciones consideradas para calcular $\Delta\Delta C_T$ para el método de cuantificación relativa fueron:

$$C_T \text{ gen APOAV} - C_T \text{ GAPDH} = \Delta C_T$$

$$\Delta C_T - X\Delta C_T = \Delta\Delta C_T$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

9.9. Selección del control endógeno

El análisis del control endógeno se determinó para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA. Los genes utilizados frecuentemente son *actina*, *β2-microglobulina*, *GAPDH* y *rRNA*. El gen endógeno seleccionado debe ser validado para determinar que su expresión no se ve afectada por el tratamiento experimental. Para seleccionar el control endógeno, se determinó la cantidad relativa de los genes *actina* y *GAPDH* en el pool de cDNA correspondiente al RNA extraído de sangre periférica de los pacientes antes y después de cada tratamiento. La determinación se realizó por amplificación con PCR en tiempo real, como se detalló anteriormente y la cantidad relativa del gen se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\Delta C_T - \Delta C_T \text{ antes del tratamiento} = \Delta\Delta C_T \text{ después del tratamiento}$$

Finalmente, se eligió como gen endógeno a aquel que no muestra relación estadísticamente significativa según el análisis ANOVA entre el tratamiento a lo largo del tiempo y la cantidad relativa.

9.10. Eficiencia de la amplificación

Para validar el método de cuantificación relativa, la eficiencia en la amplificación del gen problema y gen endógeno, previamente seleccionado, deben ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia se realizaron tres diluciones decuples seriadas al cDNA puro, posteriormente estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones descritas anteriormente para obtener los valores de CT. Estos se graficaron contra el logaritmo de la concentración total del fragmento de PCR y se calculó la regresión lineal. El valor de la pendiente fue utilizado para calcular la eficiencia (Rasmussen, 2001) con la siguiente fórmula:

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{pendiente}}\right)} - 1$$

9.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos y los gráficos se realizaron en el programa Sigma STAT 2.03 y Sigma Plot versión 10.0. Se empleó un análisis de ANOVA y Tukey para comparar los cambios de expresión antes y después de los diferentes tratamientos (Electroacupuntura más Moxibustión y Bezafibrato).

10. RESULTADOS

En el presente trabajo se analizó la expresión de APO-AV en plasma de pacientes diagnosticados con hipertrigliceridemia bajo dos tipos de tratamiento: farmacológico administrando Bezafibrato de 200 mg cada 24 h y Medicina Tradicional China fusionando dos técnicas orientales: Moxibustión – Electroacupuntura 2 sesiones a la semana, ambos tratamientos se administraron durante 5 semanas continuas.

Dado que APOAV participa en el metabolismo de los TAG, se decidió analizar la modulación de este metabolito conforme al tratamiento administrado. Como se observa en la *Tabla 8* la concentración de TAG en ambos grupos no presenta diferencia significativa, basándose en el análisis ANOVA ($p=0.157$), antes de iniciar el tratamiento por lo que teniendo la certeza de que el metabolito de interés era homogéneo en ambas poblaciones se inicia el tratamiento correspondiente para cada grupo de estudio.

Tabla 8
Análisis descriptivo inicial de la población de estudio.

Variable	Grupo EAM (n=15)	Grupo B (n=15)	p
Edad (años)	51.19 ± 8.71	47.63 ± 10.8	0.313
Sexo (F/M)	10/6	10/6	1
Triacilglicéridos (mg/dL)	440.25 ± 282.68	311.44 ± 214.73	0.157
Colesterol (mg/dL)	202.75 ± 38.22	188.68 ± 33.51	0.277
c-HDL (mg/dL)	37.31 ± 5.89	45 ± 11.30	0.22
c-LDL (mg/dL)	90.65 ± 47.09	79.78 ± 31.61	0.449
c-VLDL (mg/dL)	88.07 ± 56.53	62.48 ± 42.92	0.160
Lípidos totales (mg/dL)	974.21 ± 448.77	757.66 ± 361.15	0.143
Fosfolípidos (mg/dL)	331.21 ± 152.57	257.61 ± 122.78	0.143
Peso (Kg)	75.80 ± 12.64	80.31 ± 10.52	0.301
Talla (cm)	1.60 ± 0.95	1.61 ± 0.54	0.701
IMC (kg/m²)	29.62 ± 4.26	30.99 ± 4.02	0.374
Cintura (cm)	93.88 ± 9.76	94.50 ± 7.68	0.848
Cadera (cm)	101.56 ± 8.19	102.86 ± 8.09	0.667
Índice cintura/cadera	0.93 ± 0.070	0.95 ± 0.077	0.477

Para evaluar los cambios en la expresión génica resultante del tratamiento se amplificaron fragmentos de DNA del gen APOAV mediante RT-PCR antes y después de 5 semanas de tratamiento. Para este análisis se partió de la obtención de la capa leucocitaria de muestra sanguínea de los pacientes, se extrajo, purificó y cuantificó RNA. El RNA fue extraído utilizando el método descrito por Chomczynski y colaboradores (1978) empleando TRIzol®, se trató con DNAsas para su posterior corrida en gel de agarosa al 1.5 % para verificar su integridad, sin embargo, tanto las fotografías del gel como los datos de pureza y cuantificación del RNA no fueron proporcionados por las doctoras encargadas de dicha parte de la experimentación.

Posteriormente se sintetizó el cDNA complementario a la secuencia de RNA extraída empleando *Kit Superscript II Reverse Transcriptase*, de *Invitrogen*; la eficiencia de la síntesis se verificó al observar los productos de amplificación de un fragmento del gen de Actina en varias muestras.

Una vez comprobada la correcta síntesis del cDNA de doble cadena se realizó la RT-qPCR, empleando primers comerciales marca *IDT*. Para la estandarización de la técnica se analizaron diferentes concentraciones de primers (0.5 μ M, 3 μ M y 9 μ M) y cDNA (diluciones 1:5, 1:10 y 1:20) como se muestra en la Fig.23, donde la concentración de cebadores óptima es equimolar 9 μ M:9 μ M para el par de cebadores de APOA y GAPDH y equimolar 3 μ M:3 μ M para Actina, mientras que para el cDNA se pueden emplear diluciones 1:5 y 1:10. La reproducibilidad de la técnica se comprobó al realizar independientemente las reacciones de amplificación por triplicado con las concentraciones marcadas anteriormente.

Una vez estandarizada la técnica RT-qPCR, se empleó cDNA puro del pool de muestras antes y después de 5 semanas de tratamiento, teniendo como control de cada grupo la muestra inicial. De igual forma se utilizaron cebadores para *gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)* y actina empleados como genes endógenos.

Para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA, se amplificó en tiempo real el gen analizado en paralelo con un gen endógeno que se validó para determinar que su expresión no se viera afectada por los tratamientos experimentales.

Para seleccionar el control endógeno se analizaron los dos genes más empleados: *actina* y *GAPDH*, para los cuales se determinó la cantidad relativa correspondiente de RNA extraído de la capa leucocitaria antes y tras 5 semanas de tratamiento. La cantidad relativa de cada de estos genes se determinó aplicando el método del $2^{-\Delta CT}$ en el cual se aplica la formula siguiente: $2^{-\Delta CT}$ donde $\Delta CT =$

$$\Delta CT \text{ antes del tratamieto} - \Delta CT \text{ despues del tratamieto.}$$

Posteriormente, se seleccionó como gen endógeno aquel que no mostraba una relación estadísticamente significativa entre los dos tratamientos. La Tabla 9 resume los resultados de los CT obtenidos de la amplificación de los genes probados para ser utilizados como endógenos y los cálculos realizados para la determinación de la cantidad relativa aplicando el método del $2^{-\Delta CT}$.

La *tabla 9* muestra gráficamente los resultados obtenidos, se observa que GADPH no muestra diferencias significativas, según el ANOVA con una $p=0.225$, en la cantidad relativa de amplificado tras la condición de tratamiento, a diferencia de Actina que incrementa su cantidad relativa 3.7506 veces más tras las 5 semanas de tratamiento en el grupo EAM y disminuye hasta 0.0142 en el grupo B; por lo que este gen se descartó como gen endógeno

Tabla 9

Resumen del análisis de CTs para la selección del control endógeno.

C_T		\bar{x} del control	ΔC τ	$2(-C_T)$
GAPDH				
EAM antes	18.1504		0.190671641	0.876197716
	17.7690		-0.190671641	1.141294918
	17.9597	17.95973203	0	1
EAM después	17.5831	17.95973203	-0.376539954	1.298224559
	17.8008	17.95973203	-0.158850946	1.116397614
	17.4481		-0.511617101	1.425647293
B antes	18.1504		0.190671641	0.876197716
	17.7690		-0.190671641	1.141294918
	17.9597	17.95973203	0	1
		17.95973203		
B después	18.1621	17.95973203	0.202417942	0.869092751
	18.3307		0.371039964	0.773224918
	18.2913		0.331636707	0.794634476
ACTINA				
EAM antes	23.1481		-0.142466667	1.10379072
	23.3349	23.2905667	0.044333333	0.96973783
	23.3887	23.2905667	0.098133333	0.934241
EAM después	21.2906	23.2905667	-1.999966667	3.999907581
	21.8356		-1.454966667	2.741502267
	21.1173		-2.173266667	4.510435277
B antes	23.1481		-0.142466667	1.103790724
	23.3349		0.044333333	0.969737827
	23.3887		0.098133333	0.934241001
		23.29056667		
B después	29.3122	23.29056667	6.021633333	0.01539245
	29.2772	23.29056667	5.986633333	0.015770439
	29.7249		6.434333333	0.011563057

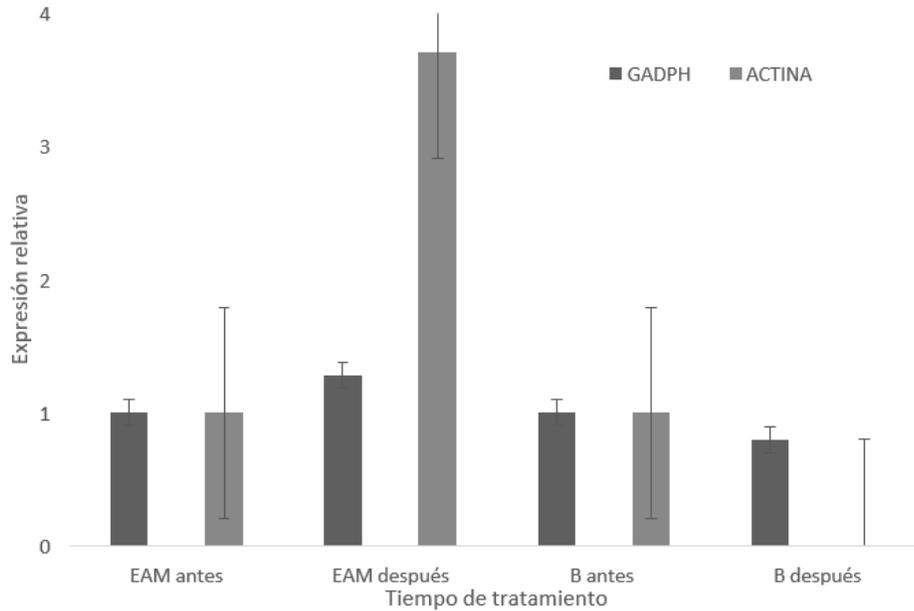


Fig. 23 Aplicación del método $2^{-\Delta C_T}$ para la selección del control endógeno. Para validar el efecto del tratamiento en la expresión de los genes candidatos a ser utilizados como endógeno, se determinó la cantidad relativa de los genes *GAPDH* y *actina*, correspondientes al RNA extraído de leucocitos de paciente antes y después de 5 semanas de cada tratamiento correspondiente. La cantidad relativa se determinó usando la ecuación $2^{-\Delta C_T}$ donde $\Delta C_T = \Delta C_T \text{ antes del tratamiento} - \Delta C_T \text{ después del tratamiento}$.

Para que el método de cuantificación sea válido, las eficiencias de amplificación correspondientes a un ciclo de la fase exponencial del gen problema y el gen endógeno interno (previamente seleccionado), deben ser aproximadamente iguales. Para determinar esta eficiencia, se realizaron cinco diluciones decuples seriadas del cDNA directo, el cual previamente fue cuantificado a 260 nm, posteriormente estas diluciones se amplificaron por triplicado bajo las condiciones antes descritas para obtener los valores de CT los cuales se graficaron contra el logaritmo de la concentración expresado en ng del cDNA utilizado para la amplificación. El valor de la pendiente de las gráficas obtenidas se utilizó para calcular la eficiencia con la siguiente fórmula: $E = 10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}}\right)} - 1$. (Rasmussen, 2001).

La *Tabla 10* resume los datos obtenidos para el cálculo de la eficiencia y la *Fig 25* muestra la gráfica de los genes analizados. En dicha figura se observa que las amplificaciones analizadas mostraron alta eficiencia en el rango de 0.01 a 100 ng de cDNA con alta linealidad. En cada uno de los gráficos se presentan las

ecuaciones de la recta y los valores de la pendiente, con los que se calcularon las eficiencias 4.95 para APOAV y 6.34 para GADPH, permitiendo validar los resultados de la expresión relativa.

Tabla 10

Resumen de CTs obtenidos para el cálculo de la eficiencia de reacción.

[cDNA ng]	log [cDNA ng]	CT GADPH	CT APO-AV
100	4.60	19.1401	7.28518106
100	4.60	19.1642	7.28518101
100	4.60	19.5907	7.28518210
10	2.30	21.8183	10.65261503
10	2.30	21.6429	10.65261608
10	2.30	21.8342	10.65261458
1	0	24.7586	13.92537227
1	0	25.6195	13.92537358
1	0	26.6195	13.92537315
0.1	-2.30	28.8108	16.69598516
0.1	-2.30	28.2399	16.69598525
0.1	-2.30	28.847	16.69598568
0.01	-4.60	30.7495	19.18049684
0.01	-4.60	31.6752	19.18049758
0.01	-4.60	32.1155	19.18052084

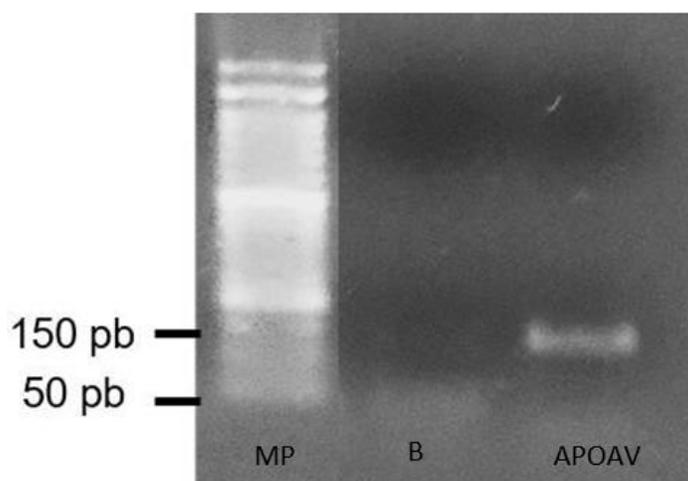


Fig.24.- Gel APOAV. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1% del amplicón de APOAV obtenido tras realizar qPCR-RT: carril 1: marcador de peso molecular (MP), carril 2: Blanco (B), carril 3: Amplicón de APOAV de 150 pb (APOAV).

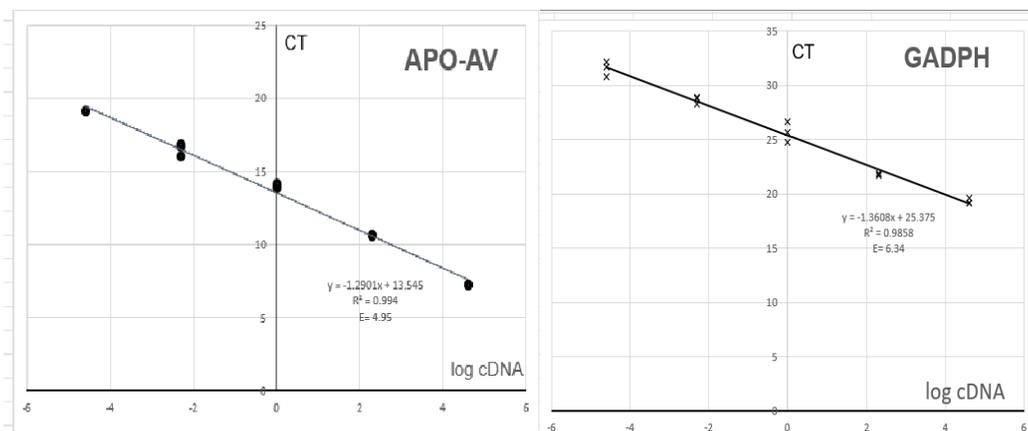


Fig.25.- Determinación de la eficiencia de amplificación para APOAV y GAPDH. Los valores de CT obtenidos de en la amplificación por qPCR de cada gen analizado se graficó contra el logaritmo de la concentración de cDNA utilizado para la amplificación. La ecuación y pendiente de la recta se obtiene para calcular la eficiencia de acuerdo con la fórmula: $E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{pendiente}}\right)} - 1$. La figura muestra las gráficas obtenidas para el control endógeno GAPDH y el gen APOAV, encada una de ellas se aprecia la ecuación de la recta, el valor de R² y la eficiencia (E).

El SYBR Green se intercala en cualquiera de las cadenas del ácido nucleico aun sin que la secuencia específica de interés se encuentre presente, por lo tanto, se decidió realizar un análisis de la curva de disociación para identificar los productos generados durante la PCR en presencia de SYBR Green. Este tipo de análisis permite caracterizar los productos de PCR de los dímeros de primers según su conducta de disociación.

Durante la PCR, la fluorescencia inicial es baja e incrementa conforme los ciclos pasan, en cambio, en una curva de disociación al principio de la reacción la temperatura es baja por lo que la fluorescencia es alta, dado el incremento de temperatura la fluorescencia caerá súbitamente hasta alcanzar el punto de disociación característico (T_m) para cada fragmento de DNA. La porción en el cambio de fluorescencia en función de la temperatura es graficada y en esta se observará un producto homogéneo y puro de PCR con una curva de disociación sencilla, bien definida, con un solo pico estrecho, mientras que los dímeros de primers, que se disocian a temperaturas bajas, mostrarán picos anchos en curvas sencillas.

La Fig 26 muestra la curva de disociación para APOAV y GAPDH con su respectivo blanco (mezcla que contiene todos los elementos de reacción de la PCR a excepción del cDNA, el cual es sustituido por agua grado biología molecular). En esta se aprecia un solo producto o pico cuya temperatura de disociación es 76.3 °C y 73.6 °C respectivamente; por su parte, el blanco no muestra amplificación inespecífica, confirmando que las reacciones presentaron productos puros y únicos.

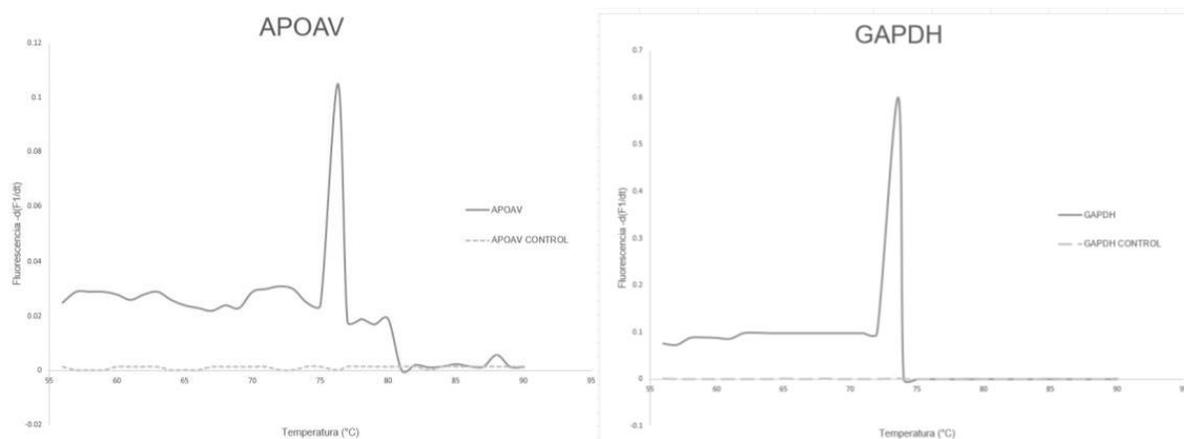


Fig.26.- Curva de disociación para APOAV y GAPDH. La valoración de la especificidad de los cebadores, primers o iniciadores en la PCR para GAPDH y APOAV se muestra en las curvas dedisociación que se obtienen para graficar la derivada negativa de la fluorescencia contra la temperatura para los genes en la qPCR con SYBR Green.

Una vez estandarizado y validado el procedimiento de qPCR-RT, se evaluaron los cambios en la expresión del gen *APOAV* que codifica para la proteína con el mismo nombre. La *Tabla 11* resume los valores de la expresión relativa y el error estándar calculado con las réplicas antes y tras 5 semanas para cada tratamiento (Electroacupuntura+Moxibustión y Bezafibrato), así como su valor de “p”

Tabla 11

Expresión relativa de APOA-V.

	<i>EAM antes</i>	<i>EAM después</i>	<i>B antes</i>	<i>B después</i>
<i>Promedio</i>	1	1.0183	1	2
<i>Error</i>	0.10109	0.0735	0.09755	0.0791
<i>Valor de “p” según ANOVA</i>	0.916		< 0.001	

La Fig 27, muestra el nivel de expresión relativa antes (control) y tras 5 semanas de tratamiento con Electroacupuntura+Moxibustión (EAM) y Bezafibrato (B). La expresión relativa en el grupo B incrementó 2 veces en relación con el control, sin embargo el grupo EAM no presentó incremento en la expresión tras el tiempo de tratamiento.

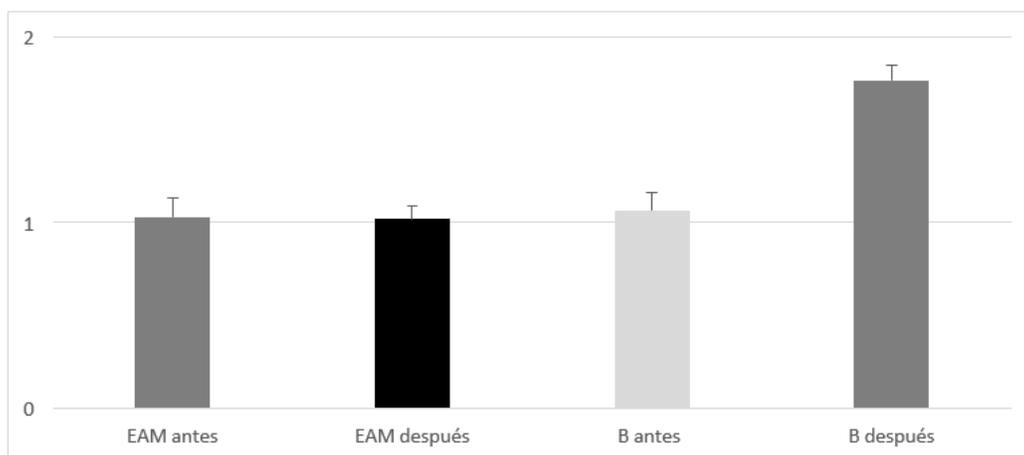


Fig.27.- Expresión relativa de APOAV. La gráfica muestra la expresión relativa de APOAV antes y tras cinco semanas para cada tratamiento aplicado. EAM: Electroacupuntura + Moxibustión, B: Bezafibrato.

Finalizado el análisis molecular, se realizó el análisis estadístico de cada variable medida antes y concluido el tratamiento, los resultados obtenidos se plasman en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12

Análisis descriptivo inicial y final del grupo EAM.

# par	Variable	\bar{x}	σ	σ_x
1	TAG I	398.53	236.191	60.984
	TAG F	296.63	169.080	43.656
2	COL T I	203.53	39.433	10.182
	COLT F	181.40	40.481	10.452
3	c-HDL I	37.73	5.849	1.510
	c-HDL F	36.80	7.785	2.010
4	c-LDL I	86.09	44.952	11.607
	c-LDL F	85.34	41.519	10.720
5	c-VLDL I	79.73	47.241	12.197

	c-VLDL F	59.33	33.816	8.731
6	LIP T I	912.19	387.097	99.948
	LIP T F	724.36	275.943	71.248
7	FL I	310.12	131.605	33.980
	FL F	246.27	93.814	24.223
8	Peso I	76.35	12.884	3.327
	Peso F	75.87	13.046	3.368
9	Talla I	1.60	0.097	0.025
	Talla F	1.61	0.097	0.025
10	IMC I	29.69	4.407	1.138
	IMC F	29.30	4.374	1.129
11	Cintura I	93.93	10.101	2.608
	Cintura F	90.07	10.938	2.824
12	Cadera I	101.93	8.345	2155
	Cadera F	99.13	7.060	1.823
13	ICC I	0.92	0.071	0.018
	ICC F	0.91	0.084	0.022

Abreviaturas: F, final; I, inicial; TAG, triacilglicéridos; COLT, colesterol total; c-HDL, lipoproteína de alta densidad; c-LDL, lipoproteína de baja densidad; c-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LIPT, lípidos totales; FL, fosfolípidos; ICC, Índice cintura/cadera.

Tabla 13

Análisis descriptivo inicial y final del grupo B.

# par	Variable	\bar{x}	σ	σ_x
1	TAG I	309.53	222.134	57.355
	TAG F	230.80	123.634	31.922
2	COL T I	187.20	34.139	8.815
	COLT F	176.00	39.713	10.254
3	c-HDL I	45.40	11.587	2.992
	c-HDL F	42.20	12.143	3.135
4	c-LDL I	78.16	32.038	8.272
	c-LDL F	88.31	36.455	9.413
5	c-VLDL I	62.11	44.405	11.465
	c-VLDL F	46.16	24.727	6.384
6	LIP T I	752.51	373.221	96.365
	LIP T F	616.34	209.499	54.092
7	FL I	259.76	130.751	34.945
	FL F	214.98	70.578	18.863
8	Talla I	1.62	0.057	0.015
	Talla F	1.63	0.088	0.023
9	IMC I	31.75	3.812	0.984
	IMC F	31.07	4.051	1.046
10	Cintura I	94.27	7.630	1.970

	Cintura F	92.27	8.388	2.166
11	Cadera I	102.93	7.905	2.041
	Cadera F	100.20	5.710	1.474
12	ICC I	0.94	0.076	0.020
	ICC F	0.93	0.053	0.014

Abreviaturas: F, final; I, inicial; TAG, triacilglicéridos; COLT, colesterol total; c-HDL, lipoproteína de alta densidad; c-LDL, lipoproteína de baja densidad; c-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LIPT, lípidos totales; FL, fosfolípidos; ICC, Índice cintura/cadera.

Posteriormente se analizó si dichas variables presentaban un comportamiento paramétrico o no paramétrico; esto se evaluó utilizando la Pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Prueba de Shapiro-Wilk para muestras <30, respectivamente. Como se observa en la *Tabla 14 y 15*, únicamente 4 de las 13 variables analizadas se comportaron como variables no paramétricas en ambos grupos (EAM y B), siendo estas los siguientes metabolitos: TAG, c-VLDL, LP y FL.

Tabla 14
Pruebas de normalidad grupo EAM.

Variable	Tiempo	Kolmogorov-Smirnov^a			Prueba de Shapiro-Wilk		
		Est.	gl	Sig.	Est.	gl	Sig.
TAG	Inicial	0.248	15	0.014	0.790	15	0.003
	Final	0.273	15	0.004	0.744	15	0.001
CT	Inicial	0.143	15	0.200*	0.932	15	0.293
	Final	0.187	15	0.168	0.877	15	0.042
c-HDL	Inicial	0.149	15	0.200*	0.939	15	0.373
	Final	0.125	15	0.200*	0.975	15	0.926
c-LDL	Inicial	0.109	15	0.200*	0.964	15	0.766
	Final	0.164	15	0.200*	0.942	15	0.414
c-VLDL	Inicial	0.248	15	0.014	0.790	15	0.003
	Final	0.273	15	0.004	0.744	15	0.001
LT	Inicial	0.275	15	0.003	0.830	15	0.009
	Final	0.259	15	0.008	0.825	15	0.008
FL	Inicial	0.275	15	0.003	0.830	15	0.009
	Final	0.259	15	0.008	0.825	15	0.008
Peso	Inicial	0.192	15	0.143	0.904	15	0.108
	Final	0.179	15	0.200*	0.923	15	0.217
Talla	Inicial	0.145	15	0.200*	0.906	15	0.117

IMC	Final	0.141	15	0.200*	0.934	15	0.310
	Inicial	0.119	15	0.200*	0.927	15	0.243
Cintura	Final	0.123	15	0.200*	0.941	15	0.392
	Inicial	0.119	15	0.200*	0.972	15	0.882
Cadera	Final	0.163	15	0.200*	0.953	15	0.576
	Inicial	0.130	15	0.200*	0.974	15	0.915
ICC	Final	0.142	15	0.200*	0.921	15	0.200
	Inicial	0.170	15	0.200*	0.955	15	0.602
	Final	0.119	15	0.200*	0.976	15	0.936

Abreviaturas: F, final; I, inicial; TAG, triacilglicéridos; COLT, colesterol total; c-HDL, lipoproteína de alta densidad; c-LDL, lipoproteína de baja densidad; c-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LIPT, lípidos totales; FL, fosfolípidos; ICC, Índice cintura/cadera; Est., estadístico; Sig. Significancia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Tabla 15

Pruebas de normalidad grupo B.

Variable	Tiempo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Prueba de Shapiro-Wilk		
		Est.	gl	Sig.	Est.	gl	Sig.
TAG	Inicial	0.351	15	0.000	0.597	15	0.000
	Final	0.241	15	0.019	0.865	15	0.028
CT	Inicial	0.154	15	0.200*	0.937	15	0.343
	Final	0.142	15	0.200*	0.979	15	0.960
c-HDL	Inicial	0.146	15	0.200*	0.973	15	0.894
	Final	0.207	15	0.083	0.884	15	0.054
c-LDL	Inicial	0.090	15	0.200*	0.974	15	0.916
	Final	0.121	15	0.200*	0.951	15	0.538
c-VLDL	Inicial	0.353	15	0.000	0.603	15	0.000
	Final	0.241	15	0.019	0.865	15	0.028
LT	Inicial	0.343	15	0.000	0.596	15	0.000
	Final	0.249	15	0.013	0.843	15	0.014
FL	Inicial	0.343	15	0.000	0.596	15	0.000
	Final	0.248	15	0.013	0.843	15	0.014
Peso	Inicial	0.165	15	0.200*	0.927	15	0.249
	Final	0.138	15	0.200*	0.945	15	0.455
Talla	Inicial	0.242	15	0.018	0.931	15	0.281
	Final	0.225	15	0.039	0.846	15	0.015
IMC	Inicial	0.183	15	0.188	0.947	15	0.485
	Final	0.132	15	0.200*	0.982	15	0.981
Cintura	Inicial	0.117	15	0.200*	0.968	15	0.831

Cadera	Final	0.128	15	0.200*	0.917	15	0.172
	Inicial	0.130	15	0.200*	0.919	15	0.186
ICC	Final	0.102	15	0.200*	0.979	15	0.961
	Inicial	0.166	15	0.200*	0.925	15	0.232
	Final	0.168	15	0.200*	0.940	15	0.387

Abreviaturas: F, final; I, inicial; TAG, triacilglicéridos; COLT, colesterol total; c-HDL, lipoproteína de alta densidad; c-LDL, lipoproteína de baja densidad; c-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LIPT, lípidos totales; FL, fosfolípidos; ICC, Índice cintura/cadera; Est., estadístico; Sig. Significancia.

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Dado que los resultados obtenidos en el análisis de comportamiento de variables arrojaron que 4 metabolitos (TAG, c-VLDL, LP y FL) tienen un comportamiento no paramétrico se decidió realizar un contraste de hipótesis utilizando la Prueba de rangos con signo de Wilcoxon; las 13 variables restantes se evaluarán con la *Prueba t de Student*; esto se realizó con los datos obtenidos en ambos grupos de tratamiento, los resultados obtenidos y los contrastes de hipótesis de la Prueba de rangos con signo de Wilcoxon se muestran en las *Tablas 16,17 y Figuras 28 – 35*, respectivamente.

Las pruebas anteriores permitieron determinar si existe diferencia significativa en las variables antes y tras concluir el tratamiento al cual fue sometido cada grupo, se observó que el metabolito colesterol total y dos medidas antropométricas (cintura y cadera) presentaban una diferencia únicamente en el grupo tratado con Electroacupuntura + Moxibustión.

Tabla 16

Prueba T para muestras relacionadas, grupo EAM.

Diferencia entre variable (VI – VF)	\bar{x}	σ	σx	IC 95 % de la diferencia		t	gl	p
				Inferior	Superior			
TAG	101.907	236.453	61.052	-29.037	232.850	1.669	14	0.182
COL T	22.133	38.202	9.864	0.978	43.289	2.244	14	0.042
c-HDL	0.933	5.574	1.439	-2.153	4.020	0.649	14	0.527
c-LDL	0.752	38.540	9.951	-20.591	22.095	0.076	14	0.941
c-VLDL	20.408	47.275	12.206	-5.772	46.588	1.672	14	0.182
LIP T	187.833	393.188	101.521	-29.907	405.573	1.850	14	0.100
FL	63.859	133.674	34.515	-10.167	137.886	1.850	14	0.100
Peso	0.487	1.215	0.314	-0.186	1.160	1,551	14	0.143
Talla	- 0.005	0.034	0.009	-0.024	0.013	-,615	14	0.548
IMC	0.392	1.685	0.435	-0.541	1.325	,901	14	0.383
Cintura	3.876	4.915	1.269	1.145	6.589	3,047	14	0.009
Cadera	2.800	4.678	1.208	0.209	5.391	2,318	14	0.036
ICC	0.012	0.033	0.009	-0.006	0.030	1,409	14	0.181

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; VF, valor final; VI, valor inicial; TAG, triacilglicéridos; COLT, colesterol total; c-HDL, lipoproteína de alta densidad; c-LDL, lipoproteína de baja densidad; c-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LIP T, lípidos totales; FL, fosfolípidos; ICC, Índice cintura/cadera.

Tabla 17

Prueba T para muestras relacionadas del grupo B.

Diferencia entre variable (VI – VF)	\bar{x}	σ	σx	IC 95 % de la diferencia		t	gl	p
				Inferior	Superior			
TAG	78.733	199.181	51.428	-31.570	189.036	1.531	14	0.140
COL T	11.200	34.051	8.792	-7.657	30.057	1.274	14	0.223
c-HDL	3.200	11.384	2.939	-3.104	9.504	1.089	14	0.295
c-LDL	-10.147	36.038	9.305	-30.104	9.811	-1.090	14	0.294
c-VLDL	15.947	39.563	10.215	-5.963	37.856	1.561	14	0.140
LIP T	136.168	329.318	85.029	-46.202	318.538	1.601	14	0.191
FL	44.774	116.000	31.002	-22.202	111.751	1.444	13	0.245
Talla	-0.007	0.044	0.011	-0.032	0.017	-,643	14	0.530
IMC	0.681	3.240	0.837	-1.113	2.475	,814	14	0.429
Cintura	2.000	4.721	1.219	-,614	4.614	1.641	14	0.123
Cadera	2.733	7.235	1.868	-1.274	6.740	1.463	14	0.166
ICC	0.009	0.051	0.013	-0.020	0.037	0.659	14	0.521

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; VF, valor final; VI, valor inicial; TAG, triacilglicéridos; COLT, colesterol total; c-HDL, lipoproteína de alta densidad; c-LDL, lipoproteína de baja densidad; c-VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LIP T, lípidos totales; FL, fosfolípidos; ICC, Índice cintura/cadera.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre tg y tgelefinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	,182	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 28.- Hipótesis para TAG grupo EAM. Contraste de hipótesis para el metabolito TAG antes y después del tratamiento con Electro-acupuntura + Moxibustión, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre vldl y vldlefinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	,182	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 29- Hipótesis para c-VLDL grupo EAM. Contraste de hipótesis para el metabolito c-VLDL antes y después del tratamiento con Electro-acupuntura + Moxibustión, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre lptotales y lptotalefinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	,100	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 30.- Hipótesis para Lípidos totales grupo EAM. Contraste de hipótesis para el metabolito TAG antes y después del tratamiento con Electro-acupuntura + Moxibustión, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre fosfolípidos y fosfolípidos final es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	,100	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 31.- Hipótesis para Fosfolípidos grupo EAM. Contraste de hipótesis para el metabolito Fosfolípidos antes y después del tratamiento con Electro-acupuntura + Moxibustión, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre tgbinicial y tgbfinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	,140	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 32.- Hipótesis para TAG grupo B. Contraste de hipótesis para el metabolito TAG antes y después del tratamiento con Bezafibrato, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre vldbinicial y vldbfinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	,140	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 33.- Hipótesis para c-VLDL grupo B. Contraste de hipótesis para el metabolito c-VLDL antes y después del tratamiento con Bezafibrato, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre liptotalbinicial y liptotalbfinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	.191	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 34.- Hipótesis para Lípidos Totales grupo B. Contraste de hipótesis para el metabolito Lípidos Totales antes y después del tratamiento con Bezafibrato, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La mediana de las diferencias entre fosfolipbinicial y fosfolipbfinal es igual a 0.	Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas	.245	Conserve la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es ,05.

Fig. 35.- Hipótesis para Fosfolípidos grupo B. Contraste de hipótesis para el metabolito Fosfolípidos antes y después del tratamiento con Bezafibrato, se observa que no hay significancia entre los datos obtenidos.

11. DISCUSIÓN

Dada la importancia de los lípidos para la supervivencia humana; ya que forman parte de la estructura celular, son precursores hormonales y representan la reserva energética del organismo (Real, 2021), resulta relevante estudiar y monitorear su metabolismo, pues anomalías en el mismo desencadenan enfermedades que comprometen la salud del individuo llevándolo a la muerte.

APOAV está estrechamente relacionada con las concentraciones de TAG y C-HDL circulantes, ya que participa en procesos de resistencia a la insulina y metabolismo de TAG, este último resulta del aumento en la hidrólisis de los TAG mediante el estímulo de LPL o mediante la interacción con proteoglicanos, los cuales anclan LPL a la superficie celular; a su vez, inhibe la producción de VLDL- TG en hígado, reduciendo la producción de lipoproteínas y facilita la eliminación de lipoproteínas ricas en TAG. Estudios previos sugieren que la disminución en la expresión de APOAV está relacionada con la hipertrigliceridemia relacionada con la resistencia a la insulina y la regulación de la síntesis y/o secreción de lipoproteínas requeridas durante el proceso de regeneración hepática (Forte, 2016; Saavedra, 2010; Zhao, 2020).

En 2012 Ling Li y colaboradores demostraron que el uso de electroacupuntura reduce los niveles de colesterol sérico y TAG en tejidos hepáticos de ratones macho C57BL/6J con hipercolesterolemia debido a la modulación de la expresión génica de transductores de señal del óxido nítrico (NO). Para 2013 Xianfeng Ye y Huifang Zhang reportan que la moxibustión a diferentes temperaturas reduce la concentración de colesterol total y TAG en pacientes diagnosticados con hiperlipidemia, a su vez la moxibustión reguló al NO y endotelina-1/NO y aumentó la expresión de la apolipoproteína A-I (Ling Li, 2012; Ye, 2013).

Dado que los estudios mencionados anteriormente emplearon dos de las terapias más usadas e importantes de la Medicina Tradicional China (MTCH) y que los

resultados obtenidos son bastante similares, en este estudio se investigó si la fusión de ambas terapias modula la expresión de APOAV, por ende, la concentración de TAG plasmáticos en pacientes previamente diagnosticados con hipertrigliceridemia, de igual forma se investigó si dicha modulación en dado caso de haberla es mayor o menor en contraste con el uso de Bezafibrato como terapia medicamentosa.

Pese a que la literatura reporta que APOAV circula en torrente sanguíneo en concentraciones sumamente bajas (~150 a 400 ng/mL) en comparación a las presentes en tejido hepático (Guardiola, 2008), se decidió emplear muestra sanguínea para evaluar su expresión ya que dos tomas de muestra periférica resultan menos invasivas para los pacientes en comparación con la biopsia de hígado. Para realizar este estudio se dividió la población de estudio en dos grupos de trabajo, el primero de ellos fue tratado con Electro-acupuntura + Moxibustión (grupo EAM) mientras que el segundo fue tratado con Bezafibrato (grupo B).

Tras dicha distribución se evaluó la concentración de TAG plasmáticos antes del tratamiento verificando que esta fuera superior a 150 mg/dL en ambos grupos, aprobado este criterio, se procedió a separar el paquete leucocitario de la muestra periférica para la posterior extracción, purificación y cuantificación de RNA. Después de la cuantificación se sintetizó el cDNA correspondiente, este se empleó para la realización de PCR en tiempo real con la cual se evaluó el patrón de expresión del gen APOAV, dicho procedimiento se repitió tras 5 semanas de tratamiento.

Transcurrido dicho tiempo se observó que APOAV aumenta hasta casi 2 veces más su expresión en el grupo B con relación al control, sin embargo, el grupo EAM no presenta incremento en la expresión del gen. Por otra parte, se observa una disminución en la concentración de colesterol total, media de cintura y cadera, únicamente en los pacientes que integran el grupo EAM.

Se sabe que los fibratos son agonistas de receptores PPAR α (receptor activado por proliferadores peroxisómicos alfa), los PPAR α son factores de transcripción nuclear activado por ácidos grasos que regula la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, por lo que la activación farmacológica del receptor- α activado por el proliferador de peroxisomas reduce notablemente los niveles plasmáticos de lipoproteínas ricas en triglicéridos. PPAR α se heterodimeriza con el receptor nuclear del 9-cis-retinoico X o RXR, formando un complejo activador PPAR-RXR, el cual se une a elementos específicos de la secuencia de ADN, denominados PPRE (elementos de respuesta a PPAR), que consisten en una repetición directa del motivo central del hexanucleótido 5'-AGGTCA-3' separados por 1 o 2 nucleótidos. PPAR α media el efecto hipotriacilgliceridémico de los fibratos al regular la transcripción de genes clave asociados con diferentes vías metabólicas intra y extracelulares. Los fibratos aumentan el transporte y la captación de ácidos grasos celulares, la conversión a derivados de acil-CoA y el catabolismo por β -oxidación, resultando en una menor disponibilidad de sustrato para la síntesis de triglicéridos y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado. Además, el PPAR α activado promueve la lipólisis y la eliminación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, lo que reduce los niveles plasmáticos de triglicéridos. Estos efectos extracelulares se han atribuido a un aumento de la actividad de la LPL mediante la inducción de su expresión en el hígado y la reducción de la expresión hepática (y, posteriormente, de los niveles séricos) de la apolipoproteína CIII (ApoCIII), un inhibidor establecido de la actividad de la LPL y del catabolismo de partículas remanentes (Prieur, 2003).

En 2003 Xavier Prieur y colaboradores publicaron un análisis completo de la regulación de la expresión del gen apoAV humano, donde se demuestra que apoAV es un gen objetivo de PPAR α , determinando así un mecanismo por el cual los agonistas de PPAR α reducen los niveles de triglicéridos en plasma. Dada la información anterior y los resultados plasmados en la *Fig. 27* comprueban que efectivamente el uso de fibratos modula positivamente la expresión de APOAV, por ende, se esperaba que la concentración de TAG tras la terapia disminuyera; sin embargo, en los resultados obtenidos no se observa modulación alguna en la

concentración de lípidos, no hay significancia antes y después del tratamiento en la concentración de lípidos plasmáticos. Lo anterior desata un aspecto contradictorio ya que el bezafibrato es uno de los hipolipemiantes perteneciente al grupo de fibratos más usados dentro del tratamiento de la dislipidemia dada su alta biodisponibilidad oral (100 %) así como su vida media (1-3 horas) (Laguna, 2006; Sotos, 2010; Vázquez, 2000). Se tiene pleno conocimiento de la interrupción del proyecto de investigación de las Dras a cargo por motivos de pandemia y personales por lo que se sospecha de la interrupción del tratamiento durante este periodo por lo que los resultados obtenidos no se consideran totalmente fiables, uno de las alternativas para solucionar esta incertidumbre sería repetir el ensayo y monitorear que el tratamiento tanto farmacológico como alternativo sea seguido al pie de la letra sin suspensión alguna a menos que el médico lo indique o que la salud del paciente se vea comprometida.

En cuanto a las terapias pertenecientes a la MTCH, se observa que no hay incidencia alguna sobre la expresión de APOAV, *Fig. 29*, sin embargo, la *Tabla 16* muestra la existencia de diferencia significativa en los niveles de colesterol total ($p=0.042$), media cintura ($p=0.009$) y medida cadera ($p=0.036$) tras finalizar el tratamiento con este tipo de terapias. Según Barrueta y colaboradores en una revisión literaria publicada en el presente año el uso de electroacupuntura puede actuar favorablemente sobre los lípidos sanguíneos, disminuyendo sus concentraciones al modular parámetros relacionados con las vías metabólicas de síntesis y degradación de los lípidos. Como se menciona anteriormente otras publicaciones que emplean ratas como biomodelos reportan que el uso de EA y Moxibustión regulan a la baja la concentración de colesterol total, c-LDL y TAG en plasma, así como la cantidad de macrófagos proinflamatorios en casos de hiperlipidemia; sin embargo, el mecanismo por el cual se produce esta modulación aún no se esclarece. Pese que no se observó modulación de APOAV, se podría indagar su efecto sobre las LDL y sus receptores, debido a su rol en el transporte del colesterol en el plasma sanguíneo; yendo en esta dirección se podría estudiar la regulación en la expresión de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa deduciendo que la EAM + Moxibustión intervienen en la biosíntesis del

colesterol, o la expresión de proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREPB) puesto que al ser factores transcripcionales que favorecen la expresión de genes de varias de las enzimas implicadas en la síntesis de colesterol y ácidos grasos podría estar modulado por este tipo de terapias.

La antropometría es una técnica utilizada en la valoración de la composición corporal. Su objetivo es evaluar una serie de parámetros que ayudan a establecer el estado nutricional de un individuo o población, entre ellas se encuentra el peso, talla, longitud de extremidades, perímetros o circunferencias corporales entre otras, a partir de ellas se calculan índices que permiten estimar la masa libre de grasa y la grasa corporal, actualmente los más usados son el Índice de Masa Corporal o IMC por sus siglas y la relación circunferencia de cadera/circunferencia de cintura (Carvajal, 2014), en el presente estudio se midieron ambas. Se sabe que la distribución del tejido graso varía dependiendo del género, éste se deposita mayormente en las zonas centrales (abdomen y espalda) en los hombres mientras que, en el caso de las mujeres en zonas periféricas, cadera y muslos (Carvajal, 2014).

Al haber una disminución en la concentración de colesterol total, las zonas con mayor depósito de grasa se ven afectadas, disminuyendo su medida, por ello estas circunferencias disminuyen al finalizar el tratamiento.

Pese a que el gen y metabolito de interés no presentaron la modulación esperada con el uso de terapias pertenecientes a la MTCH, se confirmaron datos publicados anteriormente, (disminución de colesterol total), proponiendo así nuevas líneas de investigación sobre su mecanismo de acción, además de poder considerarse como un método terapéutico “eficaz” para disminuir el hipercolesterolemia.

12. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el uso técnicas moleculares como la RT-qPCR permite evaluar de forma confiable la expresión de genes como APOAV de igual forma al lograr detectarlo en una muestra donde la literatura reporta concentraciones sumamente bajas del gen se establece que el procedimiento realizado en el estudio garantiza una sensibilidad y repetitividad confiable. En cuanto a las terapias aplicadas en los grupos de estudios se establece que el uso de fibratos modula positivamente la expresión del gen APOA5; sin embargo, dicha modulación no influye en la concentración de TAG plasmáticos, en contraste con el uso de terapias alternativas como único tratamiento se determina que la fusión de terapias alternativas no posee impacto alguno en la expresión de APOA5 ni en la concentración de TAG, no obstante, disminuye la concentración de colesterol total y medidas de cintura y cadera, por lo que su mecanismo de acción podría estar implicado en la regulación de las LDL o alguna otra enzima del metabolismo lipídico, como la LCAT.

13. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

El trabajo anterior permite recomendar la aplicación de RT-qPCR para evaluar la expresión génica de APOAV en plasma humano.

A partir de los resultados obtenidos se sugieren los siguientes puntos:

1. Medir niveles de expresión de otras enzimas que intervengan en el metabolismo del colesterol como la LCAT o lipoproteínas de alta densidad, ya que este metabolito resultó modificado benéficamente tras la terapia con EAM.
2. Indagar sobre polimorfismos de APOAV presentes en la población de estudio debido a que la literatura reporta que los polimorfismos S19W y -1131T>C están asociados a una disminución de la expresión del gen APOA5, esto nos ayudaría a profundizar más en el análisis de resultados.
3. Evaluar conjuntamente la expresión de APOAV y LPL, pues se sabe que uno de los mecanismos de acción de APOAV es modular positivamente la expresión de esta enzima.
4. Estandarizar la técnica de las terapias alternativas, pues al no contar con este proceso no hay garantía de que la terapia sea homogénea en la población de estudio.

14. REFERENCIAS

1. Alvirde-García, U. (2016). Dislipidemias e hipertensión arterial. *Gac Med Mex.*152 (1:56-62.). [En línea] recuperado de https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_056-062.pdf
2. Barquera C. S., & Campos N, I. (2009). Dislipidemias: epidemiología, evaluación, adherencia y tratamiento. [En línea] recuperado de https://www.insp.mx/resources/images/stories/Produccion/pdf/110311_cp1.pdf
3. Basavaraju, Preethi., Balasubramani, Rubadevi., Kathiresan, S. Divya., et al. (2022). Genetic Regulatory Networks of Apolipoproteins and Associated Medical Risks. *Rev. Cardiovasc. Med*;8(788852):1-16. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.788852>
4. Becerril, F. (2020). *Antología de Terapéutica Acupuntural*. México: Especialidad de Acupuntura Humana. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional.
5. Becerril, F., Barrueta-Flores, L.M., Jaimes-Esquivel, J.I. & Sánchez-Monrroy, V. (2021). Revisión sistemática del efecto de la moxibustión en el tratamiento de dislipidemias. *Rev Int Acupuntura*;15(1):24–29. Estrategia para el diagnóstico de las dislipidemias. Recomendación 2018 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acu.2021.01.001>
6. Davidson. H.M. (2019). Dyslipidemia (Hyperlipidemia)). [En línea] recuperado de <https://www.msdmanuals.com/home/hormonal-and-metabolic-disorders/cholesterol-disorders/dyslipidemia?query=hyperlipidemia>
7. Forte, T. M., Sharma, V., & Ryan, R. O. (2016). Apolipoprotein A-V gene therapy for disease prevention / treatment: a critical analysis. *Journal of biomedical research*, 30(2), 88–93. [En línea] recuperado de <https://doi.org/10.7555/JBR.30.20150059>
8. Gersch, C., Heimgartner, N. M., Rebar, C. R., Willis, L., Méndez Álvarez, L. M., & Reyes Mondragón, A. (2017). *Farmacología* (4ª edición). Wolters Kluwer.

9. Goldenberg, I., Benderly, M., & Goldbourt, U. (2008). Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vascular health and risk management*, 4(1), 131–141. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2008.04.01.131>
10. Guardiola, M., Álvaro, A., Vallvé, C.J., & ed. al. (2008). The apolipoprotein A5 gene is expressed in the human intestine. *Clin Invest Arterioscl.* 20(4):129-34. [En línea] recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0214916808725981?via%3Dihub>
11. Hermes. T. X. (2005). Farmacología do fibratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiología.* 85 (5): 15-16. En línea] recuperado de <https://www.scielo.br/j/abc/a/XBpJRDW9xsJyJnJnCvdbXdz/?lang=pt#>
12. Herrera-Díaz, J. (2021). PCR en tiempo real. [En línea] recuperado de [PCR en tiempo real - Facultad de Química \(unam.mx\)](https://www.unam.mx/quimica/PCR-en-tiempo-real)
13. IMSS-233-09. (2016). Guía de práctica clínica sobre Diagnóstico y tratamiento de dislipidemias (Hipercolesterolemia en el adulto). Ciudad de México: Coordinación técnica de excelencia médica. En línea] recuperado de <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/233GER.pdf>
14. Instituto de Medicina Tradicional China de Beijing. Fundamentos de acupuntura y moxibustión de china. Beijing: Ediciones en lenguas extranjeras;1985
15. Kasper, F. H. (2005). Harrison. Principios de Medicina Interna. España: McGraw-Hill Interamericana de España.
16. Laguna, E. J. C. (2006). Fibratos, accidentes cardiovasculares y estudio FIELD: el día después. *Rev. Iberoamericana de lipidología y riesgo vascular*; 18 (4): 145-155. [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-fibratos-accidentes-cardiovasculares-estudio-field-13092108>
17. Laufs, U., Parhofer, K. G., Ginsberg, H. N., & Hegele, R. A. (2020). Clinical review on triglycerides. *European heart journal*, 41(1), 99–109c. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz785>

18. Li, L., Tan, G. H., & Zhang, Y. Z. (2012). Modulated expression of genes associated with NO signal transduction contributes to the cholesterol-lowering effect of electro-acupuncture. *Biotechnology letters*, 34(7), 1175–1182. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0892-9>
19. Lozano, F. (2015). *Etiología y Fisiopatología de la Medicina Tradicional China*. México: Especialidad de Acupuntura Humana. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional.
20. Luke, J., & Herráez, Á. (2000). *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnica y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. España: Elsevier/science.
21. Maciocia, G. (2015). *Los Fundamentos de la Medicina China. Texto de referencia para Acupunturistas y Fitoterapeutas*. Girona, España: Gaia Ediciones.
22. Murphy, M., Srivastava, R., & Deans, K. (2020). *Bioquímica clínica: texto y atlas en color*. Barcelona, España: Elsevier.
23. NOM-017-SSA3-2012. (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA3-2012, Regulación de servicios de salud. Para la práctica de la acupuntura humana y métodos relacionados. Secretaría de Salud. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación. [En línea] recuperado de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5268976&fecha=18/09/2012
24. OMS. (2016). *Obesidad y sobrepeso*. [En línea] recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
25. Ospina R, A. D. (2016). Abordaje terapéutico de los síndromes equivalentes al trastorno metabólico desde la cosmovisión de la Medicina Tradicional China. *Rev Int Acupunt*, 10(2), 49-55. [En línea] recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1887836916300321>

26. Ponte. N. (2017). Dislipidemia Aterogénica en Latinoamérica. [En línea] recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982017000200057&lng=es&tlng=.
27. Prieur, X., Coste, H., & Rodriguez, J. C. (2003). The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. The Journal of biological chemistry, 278(28), 25468–25480. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301302200>
28. Real, T. J. & Ascaso, F.A. (2021). Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias. [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-articulo-metabolismo-lipidico-clasificacion-hiperlipemias-S0214916821000097>
29. Rojas-Pardo, A. (2019). Lo nuevo y más importante de las Guías 2019 de la Sociedad Europea de cardiología para el manejo de las dislipidemias: La modificación de los lípidos para reducir riesgo cardiovascular. [En línea] recuperado de <https://scc.org.co/wp-content/uploads/2019/10/PUESTA-AL-DIA-130-Volumen-2-GUIA-LIPIDOS-2019-ESC.pdf>
30. Saavedra, N., Cuevas, A., Hernández, A., & et al. (2010). Polimorfismos genéticos de APOA5 se asocian a hipertrigliceridemia e hiperglicemia en individuos chilenos con enfermedad coronaria y controles. Rev Chil Cardiol;29(1): 19-27. [En línea] recuperado de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-85602010000100002
31. SIAC. (2017). Dislipidemia aterogénica en Latinoamérica. Recuperado de <http://www.siacardio.com/editoriales/prevencion-cardiovascular/dislipidemia-aterogénica-en-latino-america-prevalencia-causas-y-tratamiento/>

32. Sotos-Prieto, M., Francés, F., & Corella, D. (2010). Impacto de la apolipoproteína A5 en el riesgo cardiovascular. Modulaciones genéticas y ambientales. *Rev Med Chile*;7(138): 868-88. [En línea] recuperado de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010000700013
33. Tamay de Dios L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Inv. En Discap*;2(2): 70-78. [En línea] recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiscap/ir-2013/ir132d.pdf>
34. The Human Protein Atlas. APOAV (2023). Recuperado de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110243-APOA5/tissue>
35. Valenzuela, B. A. & Morgado, T. N. (2006). BREVE HISTORIA DE LA RELACIÓN ENTRE EL COLESTEROL Y LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. *Rev Chil Nutr.* 33(2): 130-134. [En línea] recuperado de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182006000200001
36. Vázquez, M. & Laguna, J.C. (2000). Receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR), metabolismo energético y aterosclerosis. *Rev. Endocrinología y Nutrición*; 63 (10): 301-310. [En línea] recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-receptores-activados-por-proliferadores-peroxisomicos-13075>
37. Wolska, A., Reimund, M., Sviridov, D. O., Amar, M. J., & Remaley, A. T. (2021). Apolipoprotein Mimetic Peptides: Potential New Therapies for Cardiovascular Diseases. *Cells*, 10(3), 597. <https://doi.org/10.3390/cells10030597>
38. Wu, S. A., Kersten, S., & Qi, L. (2021). Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 32(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.11.005>

39. Ye, X., & Zhang, H. (2013). Influence of moxibustion temperatures on blood lipids, endothelin-1, and nitric oxide in hyperlipidemia patients. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan*, 33(5), 592–596. [https://doi.org/10.1016/s0254-6272\(14\)60026-1](https://doi.org/10.1016/s0254-6272(14)60026-1)
40. Zhao, W., Liu, Y., Liao, X., & Zhao, S. (2020). The Role of Overexpressed Apolipoprotein AV in Insulin-Resistant Hepatocytes. *BioMed research international*, 2020, 3268505. <https://doi.org/10.1155/2020/3268505>