



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA LONGITUD DE LOS  
TELÓMEROS Y LA OBESIDAD EN NIÑOS MEXICANOS”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. ROBERTO CARLOS LICEA CEJUDO**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Leonor Pérez Martínez  
Instituto de Biotecnología - UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Viviana Valadez Graham (IBT-UNAM)  
Dr. Alfonso Carreón Rodríguez (INSP)**

**Cuernavaca, Mor. Agosto, 2017**



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.

# COMITÉ JURADO

---

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega (IBT-UNAM)

Dra. Lorena Sofia Orozco Orozco (INMEGEN)

Dra. Mónica Viviana Martínez Martínez (IMSS)

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López (IBT-UNAM)

Dr. Ismael Secundino Velazquez (IBT-UNAM)

---

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213316 Y PAPIIT IN212316) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 155290).

---

# AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez y al Dr. Gustavo Pedraza Alva por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, y por todo su apoyo, asesoría y enseñanza a lo largo de la realización de esta investigación. A la Dra. Viviana Valadez Graham y al Dr. Alfonso Carreón Rodríguez, miembros de mi comité tutorial, por su interés, comentarios y sugerencias, que fueron vitales para la elaboración del proyecto. A la Dra. Mónica Viviana Martínez Martínez y a la Dra. Laura Karina Arenas Sandoval, por su valiosa colaboración y apoyo durante el desarrollo del proyecto en el Hospital General Regional con Medicina Familiar No.1 “Lic. Ignacio García Téllez” de Cuernavaca, Morelos.

A la Dra. Martha Pedraza Escalona por su participación directa, asesoría y apoyo durante la realización de este trabajo y al C. Oswaldo Lopez Gutierrez por su apoyo técnico durante la fase experimental del proyecto. A todos los integrantes, compañeros y colegas del Laboratorio de Neuroinmunobiología (Sol, Rubiceli, Angélica, Cristina, Tonalí, Elisa, Martha, Jimena, Nilda, Carmelita, Edgardo, Tomás, Erick, Jonathan, Alejandro, Eladio, Rafael), quienes crearon un ambiente de trabajo agradable y solidario, necesario para lograr los objetivos de este estudio.

A todos los integrantes de mi familia, por su cariño y apoyo incondicional en todo momento, especialmente a mis padres, Roberto y Juana, por sus enseñanzas, paciencia, confianza y fe a lo largo de toda mi vida, porque todo lo bueno que hay en mi persona es gracias a ustedes. A todos mis amigos, por acompañarme y apoyarme durante tantos años, por la convivencia y los buenos momentos que me han permitido compartir a su lado.

Al financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN213316 Y PAPIIT IN212316) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 155290 y 405406) para la realización de este proyecto.

A todos ellos, muchas gracias.

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
I.1 OBESIDAD, IMPACTO EN LA SALUD Y PROBLEMÁTICA MUNDIAL.....	8
I.2 OBESIDAD INFANTIL EN MÉXICO .....	10
I.3 OBESIDAD, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
I.4 TELÓMEROS Y TELOMERASA .....	13
I.5 ACORTAMIENTO DE TELÓMEROS .....	16
I.6 TELÓMEROS Y SENESCENCIA CELULAR .....	18
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>21</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
VI.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TELÓMEROS (ATs) A PARTIR DE ADN GENÓMICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PUNTO FINAL.....	27
<i>Aislamiento de ADN genómico de células HEK.....</i>	<i>27</i>
<i>Aislamiento de ADN genómico de cerebro de ratón .....</i>	<i>28</i>
<i>Diseño y purificación de oligonucleótidos .....</i>	<i>28</i>
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....</i>	<i>30</i>
<i>Electroforesis en gel de acrilamida para los productos de PCR.....</i>	<i>32</i>
VI.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TELÓMEROS (ATs) A PARTIR DE ADN GENÓMICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (qPCR).....	33
<i>Cultivo celular de la línea de referencia HEK293.....</i>	<i>33</i>
<i>Aislamiento de ADN genómico de células HEK293 .....</i>	<i>33</i>
<i>Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....</i>	<i>34</i>
<i>Curva estándar para la amplificación de telómeros.....</i>	<i>36</i>
<i>Curva estándar para la amplificación del gen de copia única.....</i>	<i>37</i>
<i>Electroforesis en gel de acrilamida para los productos de amplificación de las curvas estándar         .....</i>	<i>38</i>
VI.3 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO qPCR PARA LA MEDICIÓN DE LONGITUD DE TELÓMEROS EN UN MODELO DE SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA IN VITRO .....	38
<i>Estandarización del protocolo de senescencia celular inducida in vitro.....</i>	<i>38</i>
<i>Determinación de la proliferación celular mediante conteos post-tratamiento.....</i>	<i>39</i>

<i>Detección de células senescentes mediante la tinción de <math>\beta</math>-galactosidasa asociada a la senescencia</i> .....	40
<i>Medición de la longitud de telómeros absoluta de células HEK293 utilizadas en el modelo de senescencia inducida in vitro</i> .....	40
<i>Determinación de la longitud de telómeros absoluta de células utilizadas en el modelo de senescencia inducida in vitro</i> .....	41
<i>Procesamiento de datos</i> .....	42
<i>Análisis estadístico</i> .....	42
<b>VI.4 DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS DE ADN GENÓMICO EN LAS CÉLULAS SALIVALES DE NIÑOS MEXICANOS OBESOS Y CON PESO NORMAL</b> .....	43
<i>Selección de la muestra poblacional</i> .....	43
<i>Clasificación de pacientes de acuerdo al peso y al porcentaje de grasa corporal</i> .....	44
<i>Aislamiento de ADN genómico a partir de células salivales</i> .....	44
<i>Procesamiento de datos</i> .....	46
<i>Análisis estadístico</i> .....	46
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	47
VII.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TELÓMEROS (ATs) A PARTIR DE ADN GENÓMICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PUNTO FINAL.....	47
VII.2 OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TELÓMEROS (ATs) A PARTIR DE ADN GENÓMICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA (QPCR) .....	52
<i>Estandarización del protocolo qPCR para la amplificación de telómeros</i> .....	52
VII.3 VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO QPCR PARA LA MEDICIÓN DE LONGITUD DE TELÓMEROS EN UN MODELO DE SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA IN VITRO .....	54
<i>Modelo de senescencia inducida in vitro</i> .....	54
<i>Conteos celulares post-tratamiento</i> .....	55
<i>Tinción de <math>\beta</math>-galactosidasa asociada a la senescencia</i> .....	56
<i>Medición de la longitud de telómeros absoluta de células HEK293 utilizadas en el modelo de senescencia inducida in vitro</i> .....	58
VII.4 MEDICIÓN DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS ABSOLUTA EN LA MUESTRA POBLACIONAL.....	59
<i>Resultados estadísticos de la muestra poblacional</i> .....	59
<i>Medición de la longitud de telómeros absoluta mediante el protocolo qPCR</i> .....	63
<i>No existe relación entre el nivel de peso, género o edad y la longitud de telómeros absoluta</i> 63	
<i>El porcentaje de grasa corporal elevado afecta la longitud de telómeros absoluta solo en el sexo masculino</i> .....	65
<i>La actividad física previene el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños</i> ....	67
<i>En conjunto, la actividad física y el porcentaje de grasa corporal saludable previenen el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños</i> .....	69
<i>Existe una relación entre la longitud de telómeros absoluta y el tipo de escuela al que asisten los niños</i> .....	71
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	72
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	76
<b>X. ANEXOS</b> .....	77
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	88

# RESUMEN

---

La prevalencia de la obesidad infantil en México aumenta aceleradamente, siendo hoy en día el país con mayor número de niños obesos a nivel mundial. Diversos estudios han asociado la obesidad con afecciones no metabólicas y procesos celulares acelerados similares a los del envejecimiento, como es el caso del acortamiento de telómeros. Los telómeros son estructuras especializadas de ADN y proteínas localizadas en los extremos de los cromosomas eucariotas y tienen un papel crucial manteniendo la integridad del genoma. Los telómeros se acortan con cada división celular, y se ha demostrado que el acortamiento de los telómeros es exacerbado por el estrés oxidativo y la inflamación, debido principalmente al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño que estas causan al ADN. El acortamiento de los telómeros es un mecanismo conocido de senescencia celular, un fenotipo en el cual las células normales detienen su proliferación irreversiblemente y adquieren características morfológicas diferentes, así como también cambios en la expresión génica, que resultan en el deterioro de tejidos, órganos y pérdida de longevidad, todas estas, características del envejecimiento.

En este trabajo nos propusimos determinar si existe una relación directa entre la longitud de los telómeros y la obesidad en un grupo de niños mexicanos en edad escolar. Para responder esta pregunta, se optimizó un protocolo por qPCR para la medición de la longitud de telómeros absoluta, este protocolo se validó en un modelo de senescencia celular inducida *in vitro*, en el cual se demostró que la longitud telomérica disminuye en función del número de divisiones celulares y que las especies reactivas de oxígeno promueven el acortamiento de los telómeros. Finalmente, se seleccionó una muestra poblacional infantil en la cual se aplicó el protocolo para medir la longitud telomérica a partir de células salivales. Se determinó la longitud de telómeros absoluta de 134 niños de ambos sexos entre los 8 y 10 años de edad, de los cuales, un 47% fueron diagnosticados con obesidad, 19% con sobrepeso y el 34% tuvieron peso saludable. Encontramos que telómeros significativamente más cortos se asocian a un porcentaje de grasa corporal alto en niños del sexo masculino, mientras que este fenómeno, no se observó en el sexo femenino. Además, observamos que la actividad física ejerce un efecto protector en la longitud de los telómeros, ya que la longitud telomérica absoluta de niños que realizan actividad física fue significativamente mayor en comparación con aquellos niños que no la realizan. En conjunto nuestros datos indican que la actividad física y un porcentaje de grasa saludable ejercen un efecto protector sinérgico sobre la longitud de los telómeros. Por último y de manera interesante, encontramos que niños que acuden a escuelas públicas tienen telómeros significativamente más cortos en comparación con aquellos que asisten a escuelas privadas.



# I. INTRODUCCIÓN

---

## **I.1 Obesidad, impacto en la salud y problemática mundial**

La obesidad es una enfermedad crónico-degenerativa de origen multifactorial y representa uno de los principales riesgos para la salud en la actualidad. Consiste en una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo (TA) en el cuerpo y está definida según la Organización Mundial de la Salud (OMS) por el índice de masa corporal ( $IMC = \frac{\text{Peso (kg)}}{[\text{Talla (m)}]^2}$ ). Una persona con un IMC igual o superior a  $30 \text{ kg/m}^2$  es considerada obesa y con un IMC igual o superior a  $25 \text{ kg/m}^2$  es considerada con sobrepeso (WHO, 2015). En niños y adolescentes, el crecimiento obliga a tener en cuenta la edad y el sexo. Para ello se precisan percentiles y curvas de referencia, dependiendo de los grupos étnicos y nacionales representados en cada caso, de manera que entre los percentiles 85 y 95 se considera sobrepeso, un percentil de 95 o mayor se tipifica como obesidad y por encima del percentil 99 se clasifica como obesidad severa (Barlow, 2007). Aunque cierto porcentaje de los casos de obesidad se deben a anomalías genéticas, medicamentos, desequilibrios hormonales o enfermedades psiquiátricas (Bleich *et al.*, 2008), desde el punto de vista bioquímico, la principal causa obedece a un desbalance crónico de energía, como consecuencia de una ingesta calórica excesiva, debida al aumento en el consumo de alimentos con alto contenido de grasas y azúcares, y a la disminución o ausencia de actividad física; peor aún, la combinación de ambos (Lau *et al.*, 2007). El aumento de la industrialización, la urbanización y la mecanización que tiene lugar en la mayoría de los países del mundo va asociado a cambios en la dieta y los hábitos; en particular, las dietas contienen cada vez más alimentos hipercalóricos, y los modos de vida son más sedentarios. En muchos países en desarrollo que se encuentran en fase de transición económica, a menudo coexisten en la misma población (o incluso en la misma familia) niveles crecientes de obesidad con desnutrición crónica. El aumento de la incidencia de obesidad a lo largo de los últimos años se ha visto acompañado por un aumento espectacular de la prevalencia de diabetes (WHO, 2002).

La obesidad es un importante factor de riesgo para numerosas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen la diabetes, dislipidemias, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, esto es debido a que induce el aumento de desequilibrios metabólicos, la perturbación de vías homeostáticas, deterioro de la estructura y función de diversos órganos, así como

procesos celulares acelerados similares a los del envejecimiento, asociados al estrés oxidativo y la inflamación (Ahima, 2009; Russell y Kahn, 2007). Se presenta con frecuencia como una enfermedad crónica desde la infancia y representa un factor de riesgo común para el aumento de la morbilidad y la mortalidad en la edad adulta. Las tasas de mortalidad aumentan a medida que lo hacen los grados de exceso de peso medidos en función del IMC. A medida que aumenta el IMC, también lo hace la proporción de personas con una o más afecciones asociadas. En un estudio realizado en los Estados Unidos (Manson *et al.*, 1995), más de la mitad (53%) de las defunciones ocurridas entre mujeres con un IMC superior a 29 kg/m<sup>2</sup> podían atribuirse directamente a su obesidad. Entre los hábitos alimentarios que se han relacionado con el exceso de peso y la obesidad figuran la frecuencia de las comidas y de los tentempiés entre comidas, los episodios de ingestión compulsiva de alimentos, las comidas fuera de casa y la ausencia de lactancia materna exclusiva (efecto de protección, WHO, 2015). Los aspectos ambientales tienen una importancia clara, en especial porque muchos entornos se están haciendo cada vez más “obesogénicos” (favorecedores de la obesidad).

La actividad física es un importante determinante del peso corporal (WHO, 2003). Tanto la actividad física como la buena forma física (entendiendo por tal la capacidad para realizar actividad física), disminuyen el riesgo de mortalidad y morbilidad relacionadas con el exceso de peso y la obesidad. Hay pruebas convincentes de que la actividad física regular protege contra un aumento de peso perjudicial, mientras que los modos de vida sedentarios, en particular las ocupaciones sedentarias y el ocio inactivo, como ver la televisión, lo favorecen. La mayoría de los estudios epidemiológicos muestran un menor riesgo de aumento de peso, sobrepeso y obesidad entre las personas que realizan regularmente ejercicio físico de intensidad moderada a alta (Fogelholm *et al.*, 2000). Niveles moderados a altos de forma física conllevan un riesgo considerablemente menor de enfermedad cardiovascular y mortalidad por todas las causas, y esos beneficios se aplican a todos los grados del IMC. La baja forma cardiovascular es una afección grave y común asociada a la obesidad, y una proporción considerable de las defunciones que se registran entre las personas obesas se debe probablemente a una baja forma cardiorrespiratoria, más que a la obesidad en sí (WHO, 2003).

La epidemia mundial de sobrepeso y obesidad: "globesidad" (WHO, 2015) se ha convertido rápidamente en un importante problema de salud pública en muchas partes del mundo. Casi todos los países (de altos y bajos ingresos por igual) padecen actualmente una epidemia de obesidad, si bien hay grandes variaciones entre países y dentro de un mismo país. En los de bajos ingresos, la obesidad es más común entre las mujeres de mediana edad, las personas de mayor nivel

socioeconómico y las que viven en comunidades urbanas. En los países más prósperos, la obesidad también es común entre las personas de mediana edad, pero además su prevalencia es cada vez mayor entre los adultos jóvenes y los niños. En 2014, más de 1900 millones de personas mayores de 18 años en el mundo tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos, esto representa el 13% de la población adulta mundial (11% de los hombres y 15% de las mujeres). Por otro lado, en 2013, más de 42 millones de niños menores de cinco años de edad tenían sobrepeso a nivel mundial (WHO, 2015).

**1.2 Obesidad infantil en México**

De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS, 2015), México ocupa el primer lugar de prevalencia mundial de obesidad infantil. Para la población en edad escolar (de 5 a 11 años de edad), la prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en 2012, utilizando los criterios de la OMS, fue de 34.4% (19.8 y 14.6%, respectivamente). Para las niñas esta cifra es de 32% (20.2 y 11.8%, respectivamente) y para los niños es casi 5 puntos porcentuales (pp) mayor; 36.9% (19.5 y 17.4%, respectivamente). Estas prevalencias representan alrededor de 5, 664,870 niños con sobrepeso y obesidad en el ámbito nacional (ENSANUT, 2012). El análisis de tendencias indica que estas cifras no han aumentado en los últimos seis años y que la prevalencia se ha mantenido sin cambios de 2006 a 2012 (**Figura 1**), en comparación al periodo comprendido de 1999 a 2006 donde aumentó casi 8 pp (1.1 pp/año o 29.4% en los siete años). Sin embargo, aunque entre los años 2006 y 2012 se observa una ligera disminución en la prevalencia de sobrepeso y obesidad para los sexos combinados, existen algunas variaciones por sexo y en relación con el sobrepeso y la obesidad. El primer lugar en obesidad es Campeche, con el 23.2%, mientras que Chiapas y San Luis Potosí presentan la menor frecuencia de sobrepeso y obesidad.

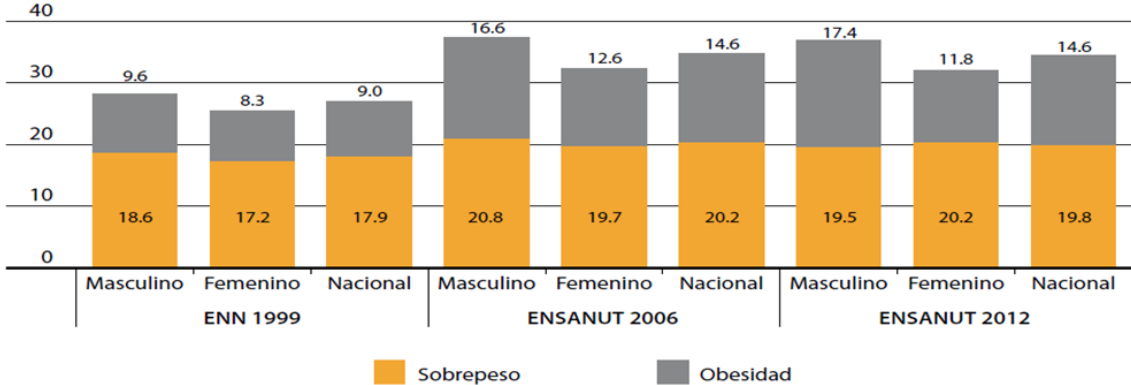


Figura 1. Comparativo de la prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en la población de 5 a 11 años de edad, de la ENN 99, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012, de acuerdo con los criterios propuestos por la OMS. Tomada de ENSANUT 2012.

Por otro lado, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en menores de cinco años ha registrado un ligero ascenso a lo largo del tiempo, casi 2 pp de 1988 a 2012 (de 7.8% a 9.7%, respectivamente). El principal aumento se registra en la región norte del país (**Figura 2**), que alcanza una prevalencia de 12% en 2012, 2.3 pp arriba del promedio nacional.

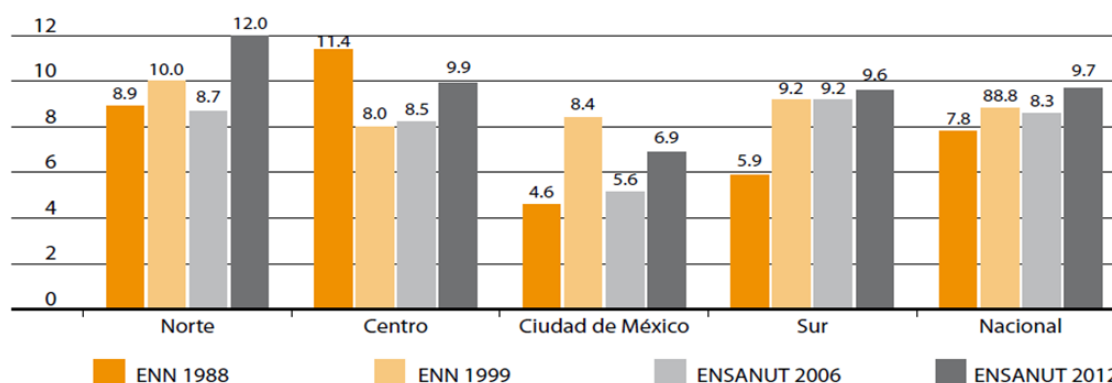


Figura 2. Prevalencia nacional de sobrepeso más obesidad en menores de cinco años de edad, de la ENN 88, ENN 99, ENSANUT 2006 y ENSANUT 2012, por región de residencia. Tomada de ENSANUT 2012.

### ***1.3 Obesidad, inflamación y estrés oxidativo***

La obesidad se caracteriza por un estado de inflamación sistémica de bajo grado inducida por diferentes mediadores de la inflamación. Se ha demostrado que los adipocitos (células del TA) poseen funciones similares a las células inmunitarias, como la activación del complemento y la producción de citocinas pro-inflamatorias (adipocitocinas) entre las que se encuentran: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 8 (IL-8), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), la proteína C reactiva (PCr) y hormonas como la leptina y adiponectina (Ziccardi *et al.*, 2002). Además, los precursores de adipocitos tienen la capacidad de fagocitar y pueden transformarse en células parecidas a los macrófagos en respuesta a diferentes estímulos (Charriere *et al.*, 2003). Uno de los primeros mecanismos implicados en el inicio de la inflamación sistémica de grado bajo es la inflamación del TA. Como consecuencia de la obesidad, los adipocitos acumulan grandes cantidades de ácidos grasos en su interior, lo cual conduce a procesos expansivos del TA como la hiperplasia y la hipertrofia adipocitaria (aumento en número y tamaño, respectivamente). Como resultado de estos procesos, algunos adipocitos quedan aislados en zonas lejanas a los vasos sanguíneos y en consecuencia sufren hipoxia y posteriormente necrosis (León *et al.*, 2015), tras lo cual son rodeados por células fagocíticas como

los macrófagos, formando estructuras parecidas a corona (CLS, por sus siglas en inglés) que inician un proceso inflamatorio orientado a la remoción de esas células (Murano *et al.*, 2008).

Por otro lado, se sabe que los ácidos grasos libres (AGL), sobre todo los saturados como el ácido palmítico, generan por sí solos una respuesta inflamatoria sistémica (Leulier y Lemaitre, 2008), además, la gran cantidad de ácidos grasos almacenados en los adipocitos es capaz de exacerbar procesos oxidativos como la lipoperoxidación, consistente en la oxidación de moléculas lipídicas al interior del adipocito (León *et al.*, 2015). La lipoperoxidación que ocurre durante la hiperplasia/hipertrofia adipocitaria conlleva a un escenario de estrés oxidativo celular caracterizado por un aumento considerable en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) y el nitrógeno, tales como el ión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el óxido nítrico (ON). De hecho, se ha observado que la producción de ERO se incrementa en el TA de ratones obesos, y está acompañada por un aumento en la expresión de la NADPH oxidasa y una disminución de la expresión de enzimas antioxidantes (Furukawa *et al.*, 2004). El aumento de estrés oxidativo en los adipocitos ha sido propuesto como el mecanismo subyacente clave del desarrollo de resistencia a la insulina relacionado con la obesidad. Adicionalmente, en respuesta a este estrés oxidativo, numerosas células inmunes (macrófagos y linfocitos T citotóxicos principalmente) son reclutadas desde la periferia hacia el tejido adiposo (Weisberg *et al.*, 2003; Chatzigeorgiou *et al.*, 2012), iniciando un proceso inflamatorio a nivel local caracterizado por el incremento en los niveles de TNF- $\alpha$  y leptina, y una disminución en los niveles de IL-10 y adiponectina (Murano *et al.*, 2008).

La infiltración de células inmunes es *per se* una fuente permanente de citocinas y factores pro-inflamatorios en el TA (León *et al.*, 2015), el cual exhibe concentraciones elevadas de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y leptina, así como una mayor producción de proteínas con actividad quimio-atrayente o quimiocinas (Makki *et al.*, 2013), todas estas con capacidad de atraer más macrófagos y linfocitos periféricos, perpetuando así el proceso de invasión inmune al TA. Como resultado de este proceso, hay un aumento significativo en los niveles de citocinas, quimiocinas y monocitos-macrófagos inflamatorios en la circulación sanguínea (Van Greevenbroek *et al.*, 2013; Suárez *et al.*, 2013), desencadenando un proceso de inflamación sistémica que finalmente afecta otros tejidos insulino-dependientes como el hepático y el muscular, perpetuándose así el estado inflamatorio a nivel adipocitario y un estado de estrés oxidativo a nivel sistémico. Adicionalmente se ha propuesto que las ERO podrían ser detectadas directa o indirectamente por el inflamasoma NLRP3 (Zhou *et al.*, 2010), activándolo y exacerbando la inflamación sistémica. Por último, bajo condiciones de estrés como la hipoxia y la

hiperoxidación de ácidos grasos, los adipocitos muestran alteraciones funcionales caracterizadas por un marcado estrés reticular, asociado a procesos de plegamiento incorrecto de proteínas y autofagia, lo cual es capaz de desencadenar apoptosis en estas células (Yoshizaki *et al.*, 2012). En conjunto, estos datos sugieren que la obesidad es un estado anormal caracterizado por el aumento del estrés oxidativo y la inflamación.

#### ***1.4 Telómeros y telomerasa***

---

Los telómeros fueron descubiertos en la década de 1930, inicialmente en moscas por Herman Muller y más tarde en el maíz por Barbara McClintock (Gall, 1995). Ambos investigadores concluyeron a partir del comportamiento de cromosomas rotos, que los extremos naturales de los cromosomas eran perfectamente distinguibles de roturas inducidas en el ADN y por lo tanto debía tratarse de una estructura especial. Sin embargo, no fue hasta el final de la década de 1970 y principio de 1980, que se logró obtener una descripción molecular de esta estructura gracias a estudios realizados por Elizabeth Blackburn en el protozoo ciliado *Tetrahymena* (Blackburn y Gall, 1978); y por Lawrence Klobutcher en otro grupo de ciliados (Klobutcher, 1981).

Los telómeros son estructuras especializadas de ADN y proteínas, que consisten en secuencias repetidas no codificantes, localizadas en los extremos de los cromosomas de eucariotas (Harley *et al.*, 1990, **Figura 3A**). En contraste con la similitud de su secuencia, la longitud de los telómeros (LT) es altamente variable entre diferentes especies, dentro de un mismo organismo e incluso entre los cromosomas. En humanos, los telómeros están constituidos por repeticiones en tándem del hexámero TTAGGG, cuya longitud varía entre 8 y 15 kilopares de bases (kpb), dependiendo del tipo celular o la edad (Harley *et al.*, 1990; Takubo *et al.*, 2002). Los telómeros tienen un papel crucial en las células eucariotas manteniendo la integridad del genoma, sus principales funciones son: estabilizar el cromosoma durante la mitosis, prevenir que los extremos de los cromosomas se fusionen y evitar que estos sean reconocidos como roturas de doble cadena y procesados por los sistemas de reparación de ADN (De Lange, 2005). En vertebrados, el extremo del cromosoma termina en una secuencia de ADN de cadena sencilla rica en guanina (G), con una extensión de 75 a 200 pares de bases (pb) denominada cola-G. En la fase no mitótica del ciclo celular, la cola-G está protegida por un complejo multiproteico especializado llamado *shelterina*, al cual el telómero se une mediante la formación de dos bucles o asas internos (**Figura 3B**): el *D-loop* y el *T-loop* (Griffith *et al.*, 1999).



El principal mecanismo de mantenimiento de los telómeros implica a la enzima telomerasa (Greider y Blackburn, 1996), aunque también se ha descrito una vía de recombinación específica conocida como “alargamiento alternativo de los telómeros” (Reddel y Bryan, 2003), sin embargo este mecanismo permanece sin comprenderse completamente. La telomerasa es una ribonucleoproteína constituida por un componente de ARN denominado TERC, que sirve como templado para la síntesis de *novoo* de secuencias teloméricas, y un componente proteínico llamado TERT, con actividad de transcriptasa reversa (figura 3D). La telomerasa cataliza la síntesis y extensión del ADN telomérico terminal (Blackburn *et al.*, 2006), reponiendo los pares de bases perdidos que no pudo replicar la ADN polimerasa en el extremo 3' de la cadena retrasada, proceso que se explicará con mayor detalle en el siguiente apartado. En los seres humanos, la actividad de la telomerasa está regulada durante el desarrollo, es variablemente activa en diferentes tipos de células y en diferentes etapas de la vida (Gomes *et al.*, 2011). Su expresión en la mayoría de tejidos se presenta solamente durante las primeras semanas de la embriogénesis, y a partir del periodo neonatal su actividad es reprimida en la mayoría de las células somáticas, con excepción de algunos subconjuntos como los fibroblastos activos, también se encuentra presente en células germinales y en células madre (Zanni y Wick, 2011). En la mayoría de los cánceres, la actividad de la telomerasa se incrementa debido a mutaciones genéticas, o a polimorfismos en TERC y/o TERT, que reactivan la telomerasa a pesar de que exista daño en el ADN o inestabilidad cromosómica dentro de la célula (Zanni y Wick, 2011). Además, el “alargamiento alternativo” puede activarse en ausencia de telomerasa, permitiendo así la proliferación anormal de células (Chen y McLeskey, 2010). Interesantemente, algunos estudios han demostrado que la sobreexpresión de la telomerasa es suficiente para inmortalizar la mayoría de los tipos celulares humanos *in vitro*, y extiende significativamente la esperanza de vida de ratones transgénicos *Tert*, aumentando su resistencia al cáncer (Bodnar *et al.*, 1998; Gonzalez-Suarez *et al.*, 2001; Artandi *et al.*, 2002; Tomas-Loba *et al.*, 2008).

Las mutaciones tanto en los diferentes componentes de la telomerasa (TERT y TERC), así como en alguno de los componentes de la *shelterina* (TRF1 y TIN2, principalmente) se han asociado genéticamente a ciertas enfermedades humanas raras como diskeratosis congénita (Mitchell *et al.*, 1999 y Vulliamy *et al.*, 2001), anemia aplásica y la fibrosis pulmonar (Armanios *et al.*, 2007 y Tsakiri *et al.*, 2007). Estas enfermedades están asociadas a la disfunción telomérica y por lo tanto, se caracterizan por presentar fallos en la capacidad regenerativa tisular (como de la médula ósea) e hiperpigmentación severa de la piel.



La cromatina telomérica está enriquecida con las marcas epigenéticas características de la heterocromatina constitutiva, como son la trimetilación de histonas y la hipermetilación del DNA, que actúan como reguladores negativos de la longitud telomérica. La cromatina telomérica protege de la degradación al extremo 3' protuberante de cadena sencilla de los telómeros y evita que estos extremos sean reconocidos y procesados como daño en el DNA debido a las roturas de doble cadena (Blasco, 2007). Las modificaciones epigenéticas en las regiones teloméricas y subteloméricas, en conjunto con la acción de ARNs teloméricos no codificantes, también influyen de forma drástica en la LT, generando un nivel adicional de control de la longitud y función de los telómeros.

### **I.5 Acortamiento de telómeros**

En las células somáticas, los telómeros se acortan de 30 a 200 pb con cada división celular (Aubert y Lansdorp, 2008) debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para sintetizar completamente la cadena retrasada del ADN durante la replicación (von Zglinicki y Martin, 2005), esto es conocido como el “problema de replicación del extremo del cromosoma”. Mientras que la síntesis de la cadena líder (el nuevo extremo 3' del telómero) se realiza hasta el final del templado de ADN que se está replicando, la síntesis de la cadena retrasada se produce a través de una multitud de fragmentos de Okazaki cebados por RNAs cortos (alrededor de 8 a 12 nucleótidos de longitud). Estos cebadores o *primers* son retirados posteriormente y sustituidos por desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), uniendo de esta forma los fragmentos de Okazaki. Sin embargo, si no se puede sintetizar el fragmento de Okazaki final en la cadena retrasada, ya que la posición natural del sitio del *primer* o cebador de ARN se encuentra más allá del final de la cadena molde de ADN que se está copiando, la ausencia de este fragmento de Okazaki implica que la copia de la cadena retrasada será más corta de lo que debería ser (**Figura 4**). Otro mecanismo implicado en el “problema de replicación del extremo” es que el *primer* para el último fragmento de Okazaki, se ha colocado en el extremo 5' de la cadena retrasada, este cebador de ARN no puede ser convertido a ADN debido a que la ADN polimerasa sólo añade nucleótidos en dirección 5'→3', y su posterior eliminación dejará incompleta la cadena recién sintetizada.

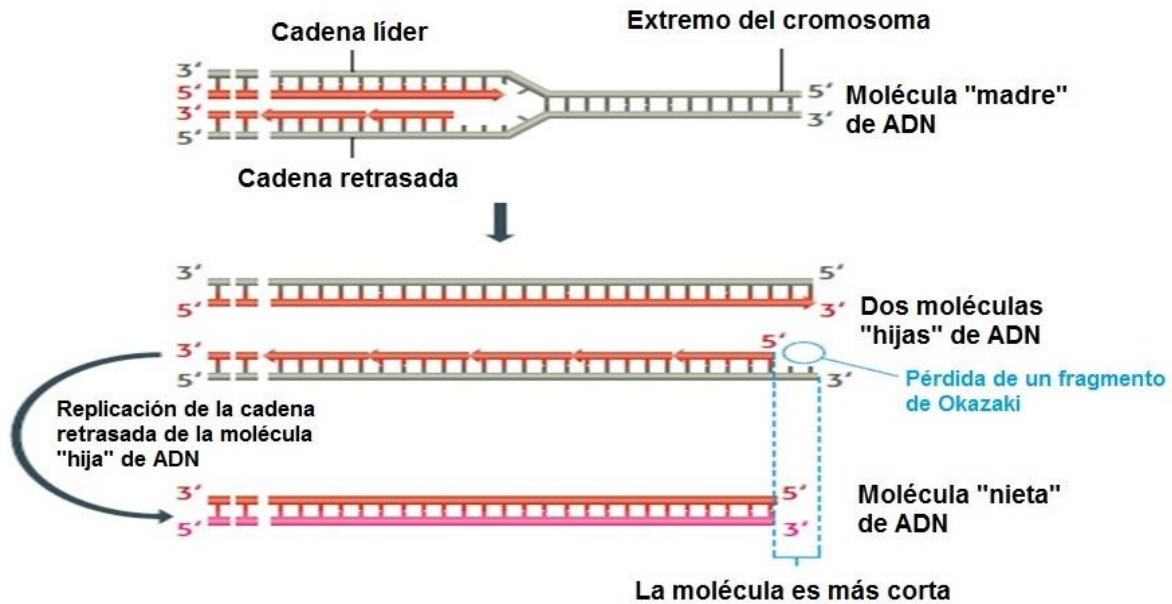


Figura 4. El problema de la replicación del extremo del cromosoma. La pérdida de un fragmento de Okazaki durante la replicación de la cadena retrasada resultará en un telómero más corto. Modificada de Lewin's, 2014.

El acortamiento de los telómeros es un mecanismo conocido de senescencia celular prematura y pérdida de la longevidad (Campisi, 2005); proceso que se acelera aún más por el estrés oxidativo y la inflamación. El estrés oxidativo se origina cuando hay un aumento de la producción de ERO, que supera la capacidad del cuerpo para desintoxicarse de los intermediarios reactivos o reparar el daño que causan a proteínas, lípidos y al ADN, especialmente el de los telómeros, que es particularmente susceptible a roturas de cadena doble y sencilla (von Zglinicki, 2002) por estos intermediarios, debido a su alto contenido de guanina. El estrés oxidativo induce la modificación oxidativa de guaninas, principalmente la formación de 8-oxodG en la secuencia GGG del ADN telomérico (Kawanishi y Oikawa, 2004). La 8-oxodG es una base mutagénica reconocida como daño al ADN por los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos. La enzima encargada de reparar estas bases es la 8-oxoguanina glucosilasa, que es capaz de escindir el enlace glucosídico de la 8-oxodG, generando roturas de cadena doble en el ADN. Además, estas roturas en el ADN telomérico se reparan de manera menos eficiente que las ocasionadas en cualquier otra ubicación del genoma (Shen *et al.*, 2009). El aumento en los niveles de marcadores de la inflamación y adipocitocinas circulantes estimula la renovación de células madre hematopoyéticas, lo que da lugar a la pérdida de secuencias teloméricas en cada ciclo de replicación (Aviv y Valdes, 2006). Con base a lo anterior, se ha sugerido que la inflamación y el estrés oxidativo generados como consecuencia de la obesidad, se pueden asociar a daño celular y telómeros más cortos (Valdes *et al.*, 2005).

El acortamiento de los telómeros se presenta en cada división celular, dando lugar a la disminución de su longitud conforme progresa la edad. En la mayoría de tejidos y células madre de mamíferos adultos, la actividad de la telomerasa es insuficiente para mantener la longitud de los telómeros durante la división celular y la renovación de tejidos (Collins y Mitchell, 2002; Flores *et al*, 2005; Sarin *et al*, 2005). El acortamiento progresivo de los telómeros conduce a la disfunción telomérica y a la activación de la respuesta de daño al ADN dependiente de la proteína supresora de tumores p53, que resulta en el arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis (d'Adda di Fagagna *et al*, 2003; Campisi y di Fagagna, 2007). La disfunción telomérica debida al acortamiento acelerado ha sido reconocida como una causa importante de inestabilidad cromosómica (O'Sullivan y Karlseder, 2010) y se ha asociado con una mayor mortalidad y aumento del riesgo de enfermedades relacionadas con la edad, tales como la insuficiencia cardíaca y el cáncer (Cawthon *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). La LT es determinada genéticamente (Vasa-Nicotera *et al.*, 2005), pero también el medio ambiente y factores en el estilo de vida como el tabaquismo, actividad física disminuida o la obesidad contribuyen significativamente a acelerar la velocidad de desgaste de los telómeros. *In vivo*, telómeros críticamente cortos, producen disfunción de las células madre, pérdida prematura de la regeneración tisular y una reducida esperanza de vida; como se ha demostrado en ratones deficientes de telomerasa (Blasco *et al*, 1997; Herrera *et al*, 1999; Blasco, 2005;).

## **1.6 Telómeros y senescencia celular**

La tasa de acortamiento de los telómeros es muy variable, en los seres humanos se estima que la LT se acorta entre 30-150 pb por ciclo de replicación en fibroblastos y linfocitos (Harley *et al.*, 1990 y Vaziri *et al.*, 1993). La división celular puede ocurrir entre 50 y 70 veces antes de que el telómero alcance una longitud críticamente corta [de 4 a 6 kpb en células germinales, cuyo tamaño máximo es de 10-15 kpb (Campisi, 2000)] conocida como límite de Hayflick, en la cual el extremo del cromosoma se acerca demasiado a la región codificante del ADN (Zakian, 2012). En última instancia, el telómero expuesto se comporta como una rotura de cadena doble del ADN y es reconocido por la proteína supresora de tumores p53, que a su vez activa los puntos de control de daño al ADN e induce la expresión de un fenotipo denominado senescencia celular o replicativa (**Figura 5**), en el cual las células normales detienen su proliferación irreversiblemente y adquieren características morfológicas diferentes, así como también cambios en la expresión génica (Kim *et al.*, 2002; de Lange, 2005; von Zglinicki *et al.*, 2005).

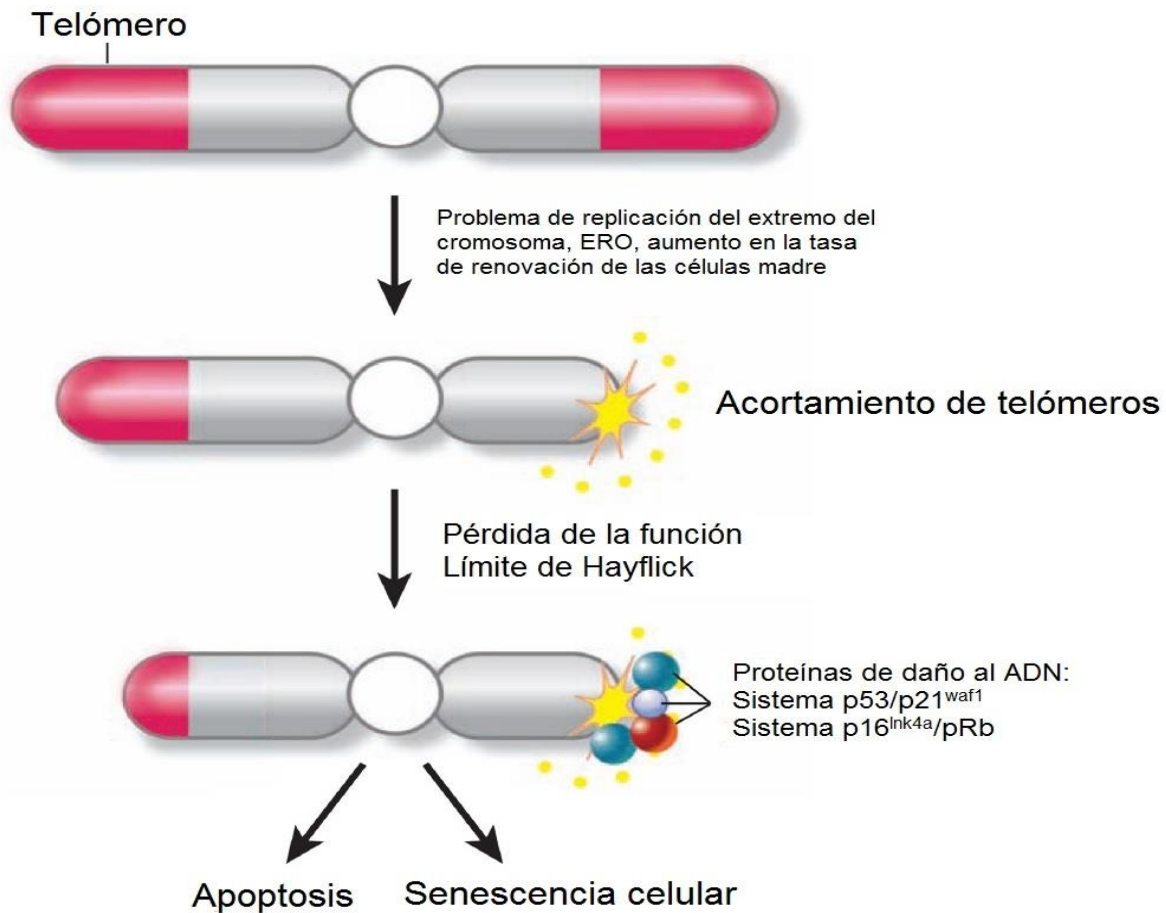


Figura 5. Acortamiento de telómeros y senescencia celular. Modificado de Armanios, 2009.

La senescencia celular se caracteriza morfológicamente por un ensanchamiento y aplanamiento de las células, además de cambios en la expresión génica, algunos de los cuales contribuyen a la inducción de la senescencia, mientras que otros son la consecuencia. El primer grupo comprende la inducción de genes que codifican para las proteínas p21, p53 y p16, así como inhibidores de la proliferación celular (Beausejour *et al.*, 2003 y Oeseburg *et al.*, 2009), mientras que para el segundo grupo se incluye un aumento en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase), un marcador que permite la detección de células senescentes (Dimri *et al.*, 1995). Dos sistemas de proteínas supresoras de tumores, el p16<sup>Ink4a</sup>/pRb y el p53/p21<sup>waf1</sup> están involucrados en el proceso de la senescencia y sus efectos bloquean el ciclo celular. El sistema el p16<sup>Ink4a</sup>/pRb, induce la expresión del gen que codifica para la proteína p16<sup>Ink4a</sup>, esta proteína inhibe las cinasas CDK4 y CDK6, las cuales controlan los puntos de transición entre cada una de las diferentes fases del ciclo celular, las fases G1, S, G2 y M (Le Peuch y Dorée, 2000). La proteína pRb bloquea la transición de G1 a S y su actividad es inhibida cuando es fosforilada por las cinasas CDK4 y CDK6; la inducción de p16<sup>Ink4a</sup> inmoviliza el ciclo celular inhibiendo la fosforilación de pRb.

El sistema p53/p21<sup>waf1</sup> actúa cuando la senescencia es independiente del primer sistema y su acción sobre la proliferación celular es más global. La activación del factor de transcripción p53 estimula la transcripción de numerosos genes entre los cuales se encuentra el que codifica para la proteína p21<sup>WAF1</sup> (El-Deiry, 1998) Esta proteína bloquea el ciclo celular a dos niveles: por un lado inhibe al antígeno PCNA (proliferation cell nuclear antigen), que es un factor esencial en la replicación del ADN; por otro lado bloquea el conjunto de las cinasas CDK. En las células senescentes, la proteína p53 es activa y los niveles de expresión de p21 y p16 son elevados, por otra parte la proteína pRb es hipofosforilada (Alcorta *et al.*, 1996 y Stein *et al.*, 1990). En células humanas, la división celular se bloquea por estos dos sistemas cuando se activan los sistemas de reparación de ADN, en respuesta por ejemplo, al daño causado por las ERO, las cuales, como mencionamos anteriormente también dañan el ADN telomérico con relativa facilidad. En condiciones normales, el complejo de la *shelterina* protege los telómeros de los sistemas de reparación de ADN, sin embargo, algunos modelos proponen que si los telómeros se acortan demasiado, el complejo de la *shelterina* podría disociarse de ellos, exponiendo sus extremos a estos sistemas de reparación y en consecuencia el bloqueo de la división celular y la subsecuente entrada de las células al fenotipo senescente (de Lange T. 2005).

Con base en lo anterior, los telómeros han sido denominados como los biomarcadores clave del envejecimiento celular, sin embargo, los telómeros limitan no solo la proliferación de células normales, sino también la proliferación de aquellas células que se encuentren en proceso de transformación neoplásica. Esto ha sido ilustrado por el hecho de que esencialmente todos los cánceres humanos han adquirido mecanismos para el mantenimiento de los telómeros, generalmente a través de la expresión de altos niveles de telomerasa (Stewart y Weinberg, 2006) o mediante la activación del “alargamiento alternativo de los telómeros”, en ausencia de esta enzima (Chen y McLeskey, 2010). En contraste, ratones deficientes en actividad de la telomerasa son significativamente más resistentes al cáncer inducido por una gran variedad de defectos genéticos o tratamientos con agentes cancerígenos (Blasco, 2005). Por lo tanto, la senescencia celular inducida por el acortamiento de los telómeros, desempeña un papel protector limitando la capacidad proliferativa de las células que han sufrido daños en el ADN y son vulnerables a la transformación oncogénica.

## II. ANTECEDENTES

---

Diversos estudios realizados en sujetos adultos, han mostrado evidencias de una relación directa entre el acortamiento de telómeros de leucocitos con la obesidad (Kim, *et al.*, 2009 y Valdes *et al.*, 2005), con enfermedades cardiovasculares (Fitzpatrick *et al.*, 2007), diabetes tipo 2 (Salpea *et al.*, 2010), con la resistencia a la insulina (Gardner *et al.*, 2005) y la hipertensión (Yang *et al.*, 2009), así como al estrés psicológico crónico (Epel *et al.*, 2004). El acortamiento de telómeros también se ha correlacionado con dislipidemias e inflamación crónica en personas con Síndrome de Cushing, siendo más significativo si estas afecciones coexisten con obesidad y/o hipertensión. Dicho acortamiento también correlaciona con un aumento de la morbilidad y envejecimiento prematuro en estos pacientes (Aulinas *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* en células humanas han establecido una relación causal entre el acortamiento de telómeros y la senescencia celular, dando lugar a la detención de su crecimiento (Bodnar *et al.* 1998). En ratones, se ha demostrado que la inflamación crónica sistémica puede acelerar el envejecimiento, a través de la exacerbación de la disfunción de los telómeros y la senescencia celular mediada por las ERO, en ausencia de cualquier otro factor genético o ambiental (Jurk *et al.*, 2014). Adicionalmente, en experimentos llevados a cabo en diversos tipos de células cultivadas *in vitro*, se ha observado que el daño al ADN causado por la acumulación de ERO, especialmente peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), resulta en senescencia prematura inducida por el estrés, así como también senescencia replicativa prematura; a través del desgaste acelerado de los telómeros (Herbert *et al.*, 2008).

Estudios recientes también han investigado el impacto de los factores dietéticos en la LT, sondeando la hipótesis de que una nutrición inadecuada y a través del aumento del estrés oxidativo puede influir en el mantenimiento de los telómeros. En particular, un análisis transversal demostró una asociación positiva entre el uso de multivitaminas y la LT en leucocitos, que apunta a la contribución de los antioxidantes de la dieta al mantenimiento de los telómeros (Xu *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha descrito un efecto adverso de niveles elevados de homocisteína en plasma en combinación con estrés oxidativo sobre la LT (Bull *et al.*, 2009). En un estudio epidemiológico se encontró que la ingesta de fibra dietética también se asocia positivamente con la LT (Cassidy *et al.*, 2010), apoyando la hipótesis de que los factores dietéticos pueden influir en la LT de leucocitos. La modulación de la LT por hábitos dietéticos es razonable en vista del papel reconocido de algunos micronutrientes en la síntesis, reparación y mantenimiento de la metilación del ADN, así como en la protección contra el estrés oxidativo (Bull y Fenech, 2008).

En niños, y de manera interesante, un análisis previo mostró que la exposición a entornos desfavorables en la infancia se asocia con acortamiento en la LT, tomando en cuenta factores como el estatus socioeconómico, nivel de escolaridad de la madre, estructura y estabilidad familiar, así como el trato rudo en la infancia (Mitchell et al., 2014). La hipótesis de que la exposición infantil a la violencia aceleraría la erosión de los telómeros fue recientemente probada en el primer estudio longitudinal prospectivo realizado en niños (Shalev, *et al.* 2012). Con base en la evidencia de que los efectos del estrés son acumulativos (Danese y McEwen, 2011), la hipótesis fue que la exposición acumulativa a violencia estaría asociada con una erosión acelerada de los telómeros. De hecho, sólo los niños que experimentaron dos o más tipos de violencia (la exposición a violencia maternal doméstica, intimidación frecuente, o maltrato físico por un adulto), mostraron un acortamiento significativamente mayor de los telómeros en células bucales, entre las mediciones a los 5 (línea base) y 10 años de edad (seguimiento), incluso después de ajustar por factores de confusión (Shalev, *et al.* 2012). Este hallazgo ha proporcionado la primera evidencia, de que el estrés se relaciona con la erosión acelerada de los telómeros en células bucales y que puede ser observado a una edad temprana, en la que los niños están experimentando el estrés. Sin embargo, las preguntas permanecen alrededor de los mecanismos biológicos que conducen de la erosión de los telómeros durante la infancia, a un potencial riesgo de enfermedad en la edad adulta.

En contraste con los adultos, los estudios iniciales a pequeña escala de la LT y la obesidad infantil son escasos y sus resultados han sido contrastantes; mientras que en un estudio se encontró que niñas y niños franceses con obesidad, tienen telómeros de leucocitos significativamente más cortos que aquellos con peso normal (Buxton *et al.*, 2011), en otro análisis, no se encontraron diferencias entre la LT de niños italianos obesos y con peso normal (Zannolli *et al.*, 2008). Un tercer estudio que involucró población árabe, concluyó que la obesidad infantil en el sexo masculino, correlaciona con acortamiento de telómeros de leucocitos, que no es evidente en las niñas. En este mismo estudio además, se observó una asociación de acortamiento de telómeros con la presión arterial y la circunferencia de la cintura en niños (Al-Attas *et al.*, 2010). Es posible que la disparidad entre estos hallazgos sea debida a diferencias genéticas o no genéticas (factores biológicos, ambientales y sociales) que aún no han sido determinadas (Buxton *et al.*, 2011).

En la mayoría de las investigaciones publicadas en las que se mide la LT, se utilizan células mononucleares de sangre periférica (PMBCs por sus siglas en inglés), principalmente leucocitos, como fuente de ADN; incluidos los tres estudios mencionados anteriormente. Diferentes tipos de células tienen diferentes tasas de división y por lo tanto diferentes tasas de acortamiento de los telómeros. La línea

celular de leucocitos incluye principalmente a los linfocitos, que son un grupo muy heterogéneo de células, de rápida proliferación en respuesta a su estimulación por antígenos y que resulta en la expresión de la telomerasa (Weng 2001), lo que puede influir en la LT y por lo tanto aportar resultados que no representen la edad celular real. Además, la recolección de muestras de sangre, generalmente bien aceptada en adultos, es relativamente invasiva para los niños, lo que implica otra complicación para el diseño de protocolos destinados a la población infantil. Para superar este obstáculo es necesario encontrar fuentes alternativas de ADN y a favor de este punto, se ha comprobado la utilidad de usar saliva para la evaluación de la LT, cuya recolección es considerablemente más sencilla. De hecho, se demostró que, aunque las LTs medidas a partir de ADN de leucocitos y saliva muestran una alta correlación, las longitudes obtenidas a partir de saliva fueron significativamente mayores con respecto a las obtenidas de leucocitos (Mitchell *et al.*, 2014). Estos resultados no son sorprendentes, ya que el ADN de la saliva se deriva de varios tipos de tejidos diferentes, por lo que es plausible que sea más representativo del desgaste celular que aquellas medidas realizadas sobre el ADN de una única fuente, como las células mononucleares de sangre periférica circulantes. En conclusión, el ADN de saliva es un indicador válido de la LT, más fácil de obtener y menos costoso para los investigadores.

Con respecto al protocolo de medición de la LT, se han planteado cuestiones importantes con respecto a la consistencia y la calidad de los métodos aplicados. El método TRF (*Telomere Restriction Fragment Assay*), desarrollado hace más de 20 años, continúa siendo considerado como el método "estándar de oro" para la medición de la LT ya que suministra una distribución fácilmente cuantificable de LT en unidades de kilobases y es ampliamente utilizado para validar y optimizar nuevos métodos, pero tiene las desventajas de ser técnicamente exigente, requiere concentraciones relativamente altas de ADN, y es de bajo rendimiento. En contraparte el qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*), es el método actualmente disponible más eficiente, en lo que a tiempo y alto rendimiento se refiere, además requiere de una menor cantidad de ADN que el método TRF, lo cual representa otra ventaja. Sin embargo, el qPCR brinda una estimación de la cantidad de secuencias del telómero presentes en la muestra en relación con la cantidad de una secuencia de referencia no telomérica especificada, que es autosomal y no variable en el número de copias (Nussey *et al.*, 2014). La optimización y validación del qPCR, que resulte en una LT más precisa, se basa principalmente en la selección adecuada del *primer* de secuencia telomérica que se va a amplificar.



### III. JUSTIFICACIÓN

---

El acelerado incremento en la prevalencia de la obesidad infantil en los últimos años, atribuible al sedentarismo y la dieta alta en calorías adoptada hoy en día como estilo de vida por muchas poblaciones, debe ser una preocupación prioritaria para la sociedad. El acortamiento de los telómeros es un mecanismo conocido de senescencia celular prematura y pérdida de la longevidad. La disfunción telomérica debida al acortamiento acelerado ha sido reconocida como una causa importante de inestabilidad cromosómica y se ha asociado con una mayor mortalidad y aumento del riesgo de enfermedades como la insuficiencia cardíaca y el cáncer. Dilucidar la relación entre la longitud de los telómeros y la obesidad a temprana edad, así como determinar si dicha relación tiene un impacto potencialmente nocivo sobre el futuro de la salud, puede proporcionar pruebas que nos ayuden a crear conciencia para combatir este grave problema de dimensión mundial y de esta manera prevenir los diversos padecimientos asociados a ella en la edad adulta, así como el posible envejecimiento celular prematuro desarrollado desde la infancia. Para lograr estos objetivos, es necesaria la optimización de un protocolo para la medición de LT, que funcione como una herramienta de diagnóstico útil, precisa, de fácil realización y reproducción, y económicamente más accesible.



## IV. HIPÓTESIS

---

Existe una relación directa entre el acortamiento de los telómeros y la obesidad en niños mexicanos en edad escolar.

## V. OBJETIVOS

---

### ***Objetivo general***

---

Determinar si la obesidad conlleva al acortamiento de telómeros en niños en edad escolar.

### ***Objetivos específicos***

---

- Optimizar un protocolo para la medición de la longitud de los telómeros a partir de ADN de células salivales
- Validar el protocolo de medición de longitud de telómeros en un modelo de senescencia celular inducida *in vitro*
- Determinar y comparar la longitud de los telómeros de ADN genómico en las células salivales de niños mexicanos obesos y con peso normal

# VI. MATERIALES Y MÉTODOS

---

## ***VI.1 Estandarización del protocolo para la amplificación de telómeros (ATs) a partir de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final***

---

### **Aislamiento de ADN genómico de células HEK**

El ADN se obtuvo de células HEK293 congeladas contenidas en una placa de petri. En primer lugar, se prepararon 100 mL de una solución *buffer* de lisis que contenía proteinasa K (20 mg/mL). Se añadieron 250  $\mu$ L de este *buffer* a la placa de células HEK previamente descongeladas y se incubaron en baño de agua a 60 °C por 60 min. Transcurrido este tiempo, el contenido se dividió en dos tubos Eppendorf de 1.5 mL etiquetados como tubo 1 y 2. Posteriormente se adicionaron 250  $\mu$ L del *buffer* de lisis a cada tubo y se incubaron por otros 120 min a 60 °C. Como siguiente paso, se agregaron 250  $\mu$ L de fenolcloroformo a cada tubo y el contenido se mezcló por agitación manual hasta la formación de una emulsión. La emulsión se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y la extracción con cloroformo se repitió hasta que no había proteína visible en la interfase de la emulsión. Posterior a esto, se llevaron a cabo dos lavados con 250  $\mu$ L de cloroformo por cada tubo para eliminar las trazas de fenol, realizado lo anterior, se adicionaron 10  $\mu$ L de NaCl 5 M y 20  $\mu$ L de etanol frío, se mezcló por inversión y esta solución etanólica se colocó en hielo durante 30 min para precipitar el ADN. Al término de este tiempo, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min a 0 °C, el sobrenadante se decantó, el *pellet* se cubrió con etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm, por 2 min a 4 °C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó nuevamente y el tubo con el *pellet* se mantuvo abierto a temperatura ambiente para que las trazas de etanol pudieran evaporarse. Posteriormente el *pellet* se disolvió en 130  $\mu$ L de Tris 10 mM pH 8.5 y se incubó a 37 °C por 60 min. Por último, el ADN genómico contenido en cada tubo se cuantificó en Nanodrop® y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.





## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

La estandarización del protocolo para la ATs se realizó utilizando ADN genómico de tres líneas celulares diferentes: i) cerebro de ratón, ii) células HEK293, iii) linfocitos T de humano (LTh). Para cada línea celular se evaluó la eficiencia de ATs de los dos pares de oligonucleótidos descritos anteriormente [Cawthon (C): Tel1, Tel2 y O'Callaghan y Fenech (O): TeloF, TeloR], utilizando como base dos diferentes mezclas de reacción maestras (**Tabla 1**), denominadas *Master mix A* y *Master mix B*, en las cuales se varió la concentración de ADN, concentración de oligonucleótidos y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's), mientras que los volúmenes y concentraciones de los demás reactivos se mantuvieron constantes, a excepción del agua, cuyo volumen cambió en cada experimento dependiendo de las modificaciones realizadas a las variables anteriormente mencionadas.

<b>Tabla 1. Mezclas de reacción maestras utilizadas para la estandarización del protocolo PCR punto final para la amplificación de telómeros</b>		
Reactivo	<i>Master mix A</i> (µL)	<i>Master mix B</i> (µL)
Agua Mq	cbp 25 µL	cbp 25 µL
Amortiguador de reacción 10X	2.5	2.5
MgCl <sub>2</sub> 30 mM	1.2	1.2
dNTP's 10 mM	x*	x*
Oligonucleótido 5' (10 µM)	x*	x*
Oligonucleótido 3' (10 µM)	x*	x*
DTT 100 mM	-	1.25
DMSO 1%	-	0.25
DNA Taq polimerasa	0.25	0.25
DNA genómico (xng*)	1	1
Volumen final de reacción	25 µL	25 µL
*Nota: x indica variación en el volumen de los reactivos y concentración de ADN durante la estandarización.		

La estandarización de cada *Master mix* se realizó inicialmente en el ADN genómico extraído de cerebro de ratón, utilizando un volumen de reacción de 25 µL y las concentraciones finales de oligonucleótidos reportadas por cada autor; Tel1: 270 nM, Tel2 900 nM (Cawthon, 2002); TeloF: 100 nM, TeloR: 100 nM (O'Callaghan y Fenech, 2011). Posteriormente se utilizaron para ambos pares de oligonucleótidos, y de manera uniforme, las siguientes concentraciones finales: 50 nM, 100 nM, 200 nM y 400 nM. El siguiente paso de estandarización se llevo a cabo utilizando ADN genómico de células HEK y LTh, las concentraciones finales de cada oligonucleótido utilizadas para estas líneas celulares fueron 200 nM, 270 nM, 400 nM, 800 nM y 900 nM, además, se realizó un gradiente de concentración de ADN genómico utilizando 20 ng, 40 ng, 50 ng, 100 ng y 150 ng. Cada alícuota de ADN se incubo a 95 °C durante 15 min en un termociclador Veriti® de 96 pozos

(Applied Biosystems [AB] Foster City, CA) antes de adicionarse al *Master mix*. Por otra parte, se utilizaron tres diferentes enzimas polimerasa: i) ADN *Taq* polimerasa “casera” 5U/ $\mu$ L (hecha en el laboratorio de Neuroinmunobiología del IBT), ii) Amplificasa® 5U/ $\mu$ L (Biotecmol) y iii) Platinum® *Taq* High Fidelity 5U/ $\mu$ L (Invitrogen™). La polimerasa casera y la Amplificasa® se usaron con los reactivos descritos en la Tabla 1, mientras que para la Platinum® se emplearon los reactivos específicos contenidos en el *kit*, y las mezclas de reacción con esta enzima se prepararon en campana de flujo laminar. Los volúmenes y concentraciones óptimos de cada reactivo y para cada *Master mix* por reacción de PCR (para preparar más de una reacción, se multiplica el número de reacciones a realizarse por el volumen especificado de cada reactivo), así como también la enzima con mejor eficiencia se especifican en la **Tabla 2**. Cada muestra se preparó por duplicado y se elaboraron también mezclas de reacción que no contenían ADN ó enzima polimerasa u oligonucleótidos, para ser utilizadas como control negativo de la amplificación, compensando la ausencia de estos reactivos con un volumen equivalente de agua mQ para respetar siempre el volumen final de 25  $\mu$ L.

<b>Tabla 2. Mezclas de reacción maestras para la amplificación de telómeros mediante PCR punto final. Concentraciones y volúmenes por reacción de PCR para un volumen final de 25 <math>\mu</math>L</b>				
Reactivo	<i>Master mix</i> CA	<i>Master mix</i> CB	<i>Master mix</i> OA	<i>Master mix</i> OB
Agua mQ	16,6 $\mu$ L	15,1 $\mu$ L	17,5 $\mu$ L	16,0 $\mu$ L
Buffer PCR de alta fidelidad 10X	2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub> 50 mM	1,2 $\mu$ L	1,2 $\mu$ L	1,2 $\mu$ L	1,2 $\mu$ L
dNTP's 10 mM	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Oligonucleotido 5' (10 $\mu$ M)	tel 1: 0,68 $\mu$ L (concentración final: 270 nM)	tel 1: 0,68 $\mu$ L (concentración final: 270 nM)	telo F: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 400 nM)	telo F: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 400 nM)
Oligonucleotido 3' (10 $\mu$ M)	tel 2: 2,25 $\mu$ L (concentración final: 900 nM)	tel 2: 2,25 $\mu$ L (concentración final: 900 nM)	telo R: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 400 nM)	telo R: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 400 nM)
DTT 100 mM	---	1,25 $\mu$ L	---	1,25 $\mu$ L
DMSO 1%	---	0,25 $\mu$ L	---	0,25 $\mu$ L
Platinum® <i>Taq</i> High Fidelity 5U/ $\mu$ L	0,25 $\mu$ L	0,25 $\mu$ L	0,25 $\mu$ L	0,25 $\mu$ L
DNA genómico 50 ng	1,0 $\mu$ L	1,0 $\mu$ L	1,0 $\mu$ L	1,0 $\mu$ L
Simbología: CA: Par de <i>primers</i> reportados por Cawthon utilizados en el <i>Master mix</i> A, CB: Par de <i>primers</i> reportados por Cawthon utilizados en el <i>Master mix</i> B, OA: Par de <i>primers</i> reportados por O'Callaghan utilizados en el <i>Master mix</i> A, OB: Par de <i>primers</i> reportados por O'Callaghan utilizados en el <i>Master mix</i> B.				



Para determinar las condiciones ideales de termociclado para la ATs, se empleó en primer lugar un gradiente de temperatura de alineamiento de oligonucleótidos de 54 °C a 60 °C, aumentando 1 °C cada vez. Adicionalmente se analizaron diferentes intervalos de desnaturalización del ADN a 15 s, 30 s, 45 s y 60 s. Este procedimiento se repitió para los intervalos de alineamiento de oligonucleótidos a 60 s, 75 s y 90 s. Se verificó también el número de ciclos necesarios para la correcta amplificación de los telómeros, empleando 18, 25, 30, 35 y 40 ciclos en el programa de PCR. Las condiciones óptimas de termociclado fueron: un ciclo de activación de la Platinum® *Taq* polimerasa a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 45 s a 95 °C (desnaturalización de ADN) y 56 °C por 1 min (alineamiento de oligonucleótidos) y un único ciclo de extensión a 72 °C por 5 min. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador Veriti® de 96 pozos (Applied Biosystems [AB] Foster City, CA).

### **Electroforesis en gel de acrilamida para los productos de PCR**

Para verificar los productos de amplificación de PCR, se preparó un gel de acrilamida al 10% mezclando 3.3 mL de acrilamida con 1 mL de *buffer* TAE 10X, 50 µL de APS al 20%, 8 µL de TEMED y 5.65 mL de agua destilada. Esta solución se mezcló por inversión y se dejó polimerizar por 20 min. Se agregaron 4 µL de *buffer* de carga (azul de bromofenol) a cada tubo de reacción que contenía los productos de amplificación de PCR y se cargaron 12 µL de esta solución en cada pozo del gel (un pozo por reacción de PCR), al primer pozo de cada gel se adicionaron 3 µL de un marcador de peso molecular de 100 pb. Una vez cargados todos los pozos, el gel se corrió en una cámara para electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad) a 100 V por 65 min con *buffer* TAE 1X. Transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio durante 5 min y se observó en un transiluminador UV ChemiDoc™ MP System 1708280 (Bio-Rad).

## **VI.2 Optimización del protocolo para la amplificación de telómeros (ATs) a partir de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

### **Cultivo celular de la línea de referencia HEK293**

Se descongeló un vial que contenía células de la línea de referencia HEK293, las cuales se encontraban en el pase número ocho de división celular. El contenido total de células se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2X de glutamina, el cultivo se realizó en una placa de petri marca Corning® de 100x20 mm y posteriormente se incubó a 37 °C durante 24 horas para que las células logaran un 80% de confluencia. Transcurrido este tiempo, el medio DMEM fue retirado de la placa de petri y las células adheridas se lavaron con 1 mL de PBS 1X, enseguida se retiró el PBS, se adicionó 1 mL de tripsina y la caja se incubó a 37 °C durante 1.5 min para “despegar” las células, Por último, se agregó 1 mL de DMEM para detener la acción de la tripsina, y 500 µL (dilución 1:4) de esta suspensión celular fueron cultivados en 9.5 mL de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2X de glutamina. El nuevo cultivo se incubó a 37 °C durante 96 horas para que las células logaran un 80% de confluencia. Transcurrido este tiempo, se verificó que las células se encontraran en la confluencia indicada, realizado lo anterior, el medio fue retirado de la placa, las células se lavaron con PBS 1X, se retiró el PBS y la placa se selló con Parafilm® para ser almacenada en un REVCO® a -70 °C hasta su utilización

### **Aislamiento de ADN genómico de células HEK293**

El ADN se obtuvo del cultivo celular HEK293 descrito anteriormente. En primer lugar, se prepararon 100 mL de una solución *buffer* de lisis que contenía proteinasa K (20 mg/mL). Se añadieron 250 µL de este *buffer* a la placa de células HEK previamente descongeladas y se incubaron en baño de agua a 60 °C por 60 min. Transcurrido este tiempo, el contenido se dividió en dos tubos Eppendorf® de 1.5 mL etiquetados como tubo 1 y 2. Posteriormente se adicionaron 250 µL del *buffer* de lisis a cada tubo y se incubaron por otros 120 min a 60 °C. Como siguiente paso, se agregaron 250 µL de fenolcloroformo a cada tubo y el contenido se mezcló por agitación manual hasta la formación de una emulsión. La emulsión se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y la extracción con cloroformo se repitió hasta que no había proteína visible

en la interfase de la emulsión. Posterior a esto, se llevaron a cabo dos lavados con 250 µl de cloroformo por cada tubo para eliminar las trazas de fenol, realizado lo anterior, se adicionaron 10 µl de NaCl 5 M y 20 µl de etanol frío, se mezcló por inversión, y esta solución etanólica se colocó en hielo durante 30 min para precipitar el ADN. Al término de este tiempo, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min a 0 °C, el sobrenadante se decantó, el *pellet* se cubrió con etanol al 70% y se centrifugó a 12,000 rpm, por 2 min a 4 °C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se desechó nuevamente y el tubo con el *pellet* se mantuvo abierto a temperatura ambiente para que las trazas de etanol pudieran evaporarse. Posteriormente el *pellet* se disolvió en 130 µl de Tris 10 mM pH 8.5 y se incubó a 37 °C por 60 min. Por último, el ADN genómico contenido en cada tubo se cuantificó en Nanodrop® y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

### **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

La estandarización del protocolo qPCR para la ATs se realizó utilizando ADN genómico de células HEK293 aislado previamente. Se evaluó la eficiencia de ATs de los dos pares de oligonucleótidos descritos anteriormente, Cawthon (C): Tel1, Tel2; O'Callaghan y Fenech (O): TeloF, TeloR; y además, el par de oligonucleótidos para la amplificación del GCU β-globina, cuyas secuencias de oligonucleótidos sentido y antisentido (escrita en dirección 5'→3') son las siguientes: GlobF, GCTTCTGACACA ACTGTGTTCACTAGC; y GlobR, AACGGCAGACTTCTCCTCAG respectivamente. Estos *primers* fueron sintetizados y purificados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBT. La estandarización se inició utilizando como base las concentraciones y condiciones de amplificación reportadas por Cawthon, Tel1: 270 nM, Tel2: 900 nM, GlobF: 400 nM, GlobR: 400 nM (Cawthon, 2002); y O'Callaghan y Fenech, TeloF: 100 nM, TeloR: 100 nM (O'Callaghan y Fenech, 2011), así como también las descritas en un protocolo proporcionado por la Dra. Elena García Arias-Salgado del Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM de la Universidad Autónoma de Madrid (EXP\_006\_004, TeloF: 100 nM, TeloR: 100 nM, GlobF: 300 nM, GlobR: 300 nM. Posteriormente se utilizaron para los tres pares de oligonucleótidos, y de manera uniforme, las siguientes concentraciones finales: 5 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM y 400 nM. Las concentraciones óptimas de cada par de oligonucleótidos para cada *Master mix* por reacción de qPCR (para preparar más de una reacción, se multiplica el número de reacciones a realizarse por el volumen especificado de cada reactivo) se especifican en la **Tabla 3**.

Cada muestra se preparó por duplicado y se elaboraron también mezclas de reacción que no contenían ADN (NTC: *Non template control*, por sus siglas en inglés) para ser utilizadas como control negativo de la amplificación, compensando la ausencia de ADN con un volumen equivalente de agua estéril libre de nucleasas (Thermo Scientific®) para mantener siempre el volumen final de 10  $\mu$ L.

<b>Tabla 3. Mezclas de reacción maestras para la amplificación de telómeros y GCU mediante qPCR. Concentraciones y volúmenes por reacción de qPCR para un volumen final de 10 <math>\mu</math>L</b>				
Reactivo	<i>Master mix C</i>	<i>Master mix O</i>	<i>Master mix Bg</i>	<i>Master mix NTC</i>
Agua estéril libre de nucleasas (Thermo Scientific®)	2,0 $\mu$ L	2,0 $\mu$ L	2,0 $\mu$ L	3,0 $\mu$ L
Power SYBR®Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems®, #Cat: 4367659)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Oligonucleotido 5'	tel 1: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 100 nM)	telo F: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 10 nM)	GlobF: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 30 nM)	1,0 $\mu$ L (concentración final según sea el caso)
Oligonucleotido 3'	tel 2: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 100 nM)	telo R: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 10 nM)	GlobR: 1,0 $\mu$ L (concentración final: 30 nM)	1,0 $\mu$ L (concentración final según sea el caso)
DNA genómico 50 ng	1,0 $\mu$ L	1,0 $\mu$ L	1,0 $\mu$ L	0 $\mu$ L
Nota: Se prepararon soluciones <i>stock</i> de cada oligonucleótido a diferentes concentraciones Simbología: C: Par de <i>primers</i> reportados por Cawthon, O: Par de <i>primers</i> reportados por O'Callaghan, $\beta$ G: Par de <i>primers</i> para $\beta$ -globina, NTC: Non template control.				

Para determinar las condiciones ideales de termociclado para la ATs, se empleó un gradiente de temperatura de alineamiento de oligonucleótidos de 56 °C a 62 °C, aumentando 2 °C cada vez. Las condiciones óptimas de termociclado fueron: un ciclo de activación de la polimerasa a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C (desnaturalización de ADN) y 58 °C por 1 min (alineamiento de oligonucleótidos). Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* de 48 pozos (Applied Biosystems™ Foster #Cat: 4376357).

## Curva estándar para la amplificación de telómeros

En primer lugar, se prepararon cinco diluciones seriadas (factor de dilución 1:10) a partir de una concentración conocida del oligonucleótido estándar (TEL STD) de 84 bases de longitud que contenía 14 repeticiones del hexámero TTAGGG. Las concentraciones utilizadas fueron: D1: 0.72 pg/ $\mu$ L D2:  $7.2 \times 10^{-2}$  pg/ $\mu$ L D3:  $7.2 \times 10^{-3}$  pg/ $\mu$ L D4:  $7.2 \times 10^{-4}$  pg/ $\mu$ L y D5:  $7.2 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu$ L. La curva estándar para la ATs se realizó utilizando el par de oligonucleótidos TeloF y TeloR. Los volúmenes y concentraciones finales de los reactivos en el *Master Mix Tel* para una reacción fueron: 5  $\mu$ L de Power SYBR®Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems®, #Cat: 4367659, concentración final 1X), TeloF: 1  $\mu$ L (concentración final 10 nM), TeloR: 1  $\mu$ L (concentración final 10 nM), agua estéril libre de nucleasas (Thermo Scientific®): 2  $\mu$ L. En total se preparó un volumen final de 171  $\mu$ L del *Master Mix Tel*, suficiente para 18 reacciones. Cada muestra se corrió por triplicado (1 triplicado por cada dilución de TEL STD, incluyendo el NTC), para este fin se adicionaron 9  $\mu$ L del *Master mix* a cada pocillo de la placa y 1  $\mu$ L del TEL STD. El perfil térmico de amplificación fue: un ciclo de activación de la polimerasa a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C (desnaturalización de ADN) y 58 °C por 1 min (alineamiento de oligonucleótidos). El perfil térmico de la curva de disociación fue: 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C.

La curva estándar permite calcular la longitud absoluta de los productos de amplificación en pares de bases de acuerdo al siguiente razonamiento: el oligonucleótido estándar TEL STD de 84 pb tiene un peso molecular (PM) de 28077.80 g/mol. Dado que el peso de una molécula es igual a PM/Número de Avogrado, entonces el peso del oligonucleótido estándar es  $28077.80 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} / 6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  que resulta en  $4.66 \times 10^{-20}$  g. La mayor concentración del oligonucleótido estándar (TEL STD D1) utilizada en la curva fue de 0.72 pg ( $7.2 \times 10^{-13}$  g) por reacción, de esta forma hay  $7.2 \times 10^{-13} \text{ g} / 4.66 \times 10^{-20} \text{ g} = 1.544 \times 10^7$  moléculas de oligonucleótido en el TEL STD D1. Por lo tanto la cantidad de secuencia telomérica contenida en TEL STD D1 se calcula de acuerdo a la longitud del oligonucleótido (84 pb), esto es  $1.544 \times 10^7 \times 84 = 1.29 \times 10^9$  pb. Estos cálculos se realizan para cada concentración incluida en la curva estándar.

Todos los *Master mix* se realizaron en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones, y todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador *StepOne™ Real-Time PCR System* de 48 pozos (Applied Biosystems™ Foster #Cat: 4376357).

## Curva estándar para la amplificación del gen de copia única

De la misma manera que para la ATs, se prepararon cinco diluciones seriadas (factor de dilución 1:10) a partir de una concentración conocida del oligonucleótido estándar (BGLOB STD) de 84 bases de longitud que contenía la secuencia de bases del GCU  $\beta$ -globina. Las concentraciones utilizadas fueron: D1:  $7.1 \times 10^{-3}$  pg/ $\mu$ L D2:  $7.1 \times 10^{-4}$  pg/ $\mu$ L D3:  $7.1 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu$ L D4:  $7.1 \times 10^{-6}$  pg/ $\mu$ L y D5:  $7.1 \times 10^{-7}$  pg/ $\mu$ L. La curva estándar para la amplificación del GCU se realizó utilizando el par de oligonucleótidos GlobF y GlobR. Los volúmenes y concentraciones finales de los reactivos en el *Master Mix GCU* para una reacción fueron: 5  $\mu$ L de *Power SYBR®Green PCR Master Mix (2X)* (Applied Biosystems®, #Cat: 4367659, concentración final 1X), GlobF: 1  $\mu$ L (concentración final 30 nM), GlobR: 1  $\mu$ L (concentración final 30 nM), agua estéril libre de nucleasas (Thermo Scientific®): 2  $\mu$ L. En total se preparó un volumen final de 171  $\mu$ L del *Master Mix GCU*, suficiente para 18 reacciones. Cada muestra se corrió por triplicado (1 triplicado por cada dilución del BGLOB STD, incluyendo el NTC), para este fin se adicionaron 9  $\mu$ L del *Master mix* a cada pocillo y 1  $\mu$ L del BGLOB STD. El perfil térmico de amplificación fue: un ciclo de activación de la polimerasa a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C (desnaturalización de ADN) y 58 °C por 1 min (alineamiento de oligonucleótidos). El perfil térmico de la curva de disociación fue: 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C.

El GCU se utiliza como control de amplificación y es crucial para la precisión de los resultados generados en el ensayo de qPCR. La curva estándar del GCU permite hacer una corrección en el cálculo de la longitud absoluta de los telómeros en base al número de copias contenidas dentro del genoma para cada muestra. El número de copias se determina de acuerdo al siguiente razonamiento: el oligonucleótido estándar BGLOB STD de 84 pb tiene un peso molecular (PM) de 27189.80 g/mol. Dado que el peso de una molécula es igual a  $PM/\text{Número de Avogrado}$ , entonces el peso del oligonucleótido estándar es  $27189.80 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} / 6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  que resulta en  $4.51 \times 10^{-20}$  g. La mayor concentración del oligonucleótido estándar (BGLOB STD D1) utilizada en la curva fue de  $7.1 \times 10^{-3}$  pg ( $7.1 \times 10^{-15}$  g) por reacción, de esta forma hay  $7.1 \times 10^{-15} \text{ g} / 4.51 \times 10^{-20} \text{ g} = 1.572 \times 10^5$  copias del amplicón  $\beta$ -globina en BGLOB STD D1. Por lo tanto BGLOB STD D1 es equivalente a  $7.86 \times 10^4$  copias por genoma diploide, ya que hay dos copias del gen  $\beta$ -globina por genoma diploide. Por último dividimos este valor por 92, el número total de telómeros encontrados en los 23 pares de cromosomas contenidos en células humanas, para determinar la longitud por cada telómero. Estos cálculos se realizan para cada concentración incluida en la curva estándar.

## **Electroforesis en gel de acrilamida para los productos de amplificación de las curvas estándar**

Para verificar los productos de amplificación de ambas curvas estándar, se preparó un gel de acrilamida al 10% mezclando 3.3 mL de acrilamida con 1 mL de *buffer* TAE 10X, 50 µL de APS al 20%, 8 µL de TEMED y 5.65 mL de agua destilada. Esta solución se mezcló por inversión y se dejó polimerizar por 20 min. Se agregaron 2 µL de *buffer* de carga (azul de bromofenol) a cada tubo de reacción que contenía los productos de amplificación de qPCR y se cargaron 7 µL de esta solución en cada pozo del gel (un pozo por reacción de PCR), al primer pozo de cada gel se adicionaron 3 µL de un marcador de peso molecular de 100 pb. Una vez cargados todos los pozos, el gel se corrió en una cámara para electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad) a 100 V por 65 min con *buffer* TAE 1X. Transcurrido este tiempo, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio durante 5 min y se observó en un transiluminador UV ChemiDoc™ MP System 1708280 (Bio-Rad).

### ***VI.3 Validación del protocolo qPCR para la medición de longitud de telómeros en un modelo de senescencia celular inducida in vitro***

---

#### **Estandarización del protocolo de senescencia celular inducida in vitro**

La estandarización del modelo de senescencia celular inducida *in vitro* por tratamiento con peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se inició partiendo del protocolo descrito por Zhang *et al.*, 2008. Para este fin, en primer lugar se realizó una cinética de crecimiento de la línea celular HEK293 para determinar el número de células que se necesitaban cultivar para lograr un 50 % de confluencia en 24 horas. Realizado lo anterior, como siguiente paso se determinó la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ideal para inducir senescencia sin matar al 50 % de las células en cultivo. Para lograr este objetivo, 250, 000 células HEK293 se cultivaron en placas de petri marca Corning® de 35x10 mm (15 placas en total; 250, 000 células por placa) que contenían cada una 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2X de glutamina, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para que las células logaran un 50% de confluencia. Transcurrido este lapso, las células se trataron con las siguientes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 100 µM, 200 µM, 400 µM, 600 µM y 800 µM (se trataron tres placas con cada concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como se describe a continuación: primero se retiró el medio de cultivo, las

células adheridas se lavaron con 1 mL de PBS 1X, acto seguido se retiró el PBS y se agregaron 2 mL de medio DMEM sin suplementar con el volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para lograr las concentraciones indicadas previamente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 h y al final de este periodo el medio fue retirado, las células se lavaron con 1 mL de PBS 1X y se adicionaron 2 mL del DMEM suplementado, incubándose nuevamente a 37 °C durante 24 horas. Este tratamiento se efectuó por cuatro días continuos. El mismo procedimiento se realizó posteriormente en placas de petri marca Corning® de 60x15 mm, cultivando en este caso 650, 000 células por placa (15 placas en total) que contenían cada una 3.7 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 2X de glutamina. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> óptima fue de 200 µM.

### **Determinación de la proliferación celular mediante conteos post-tratamiento**

Se realizaron conteos de células tratadas durante cuatro días continuos con 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como también de células control no tratadas, todas cultivadas en placas de petri de marca Corning® de 60x15 mm para determinar la proliferación celular, ambos grupos de células se encontraban en el pase número 34 de división celular. Los conteos se realizaron por triplicado y al término del tratamiento. Para este fin, células tratadas y no tratadas se procesaron de la siguiente manera: en primer lugar, se retiró el medio de cada placa, las células adheridas se lavaron con 1 mL de PBS 1X, enseguida el PBS fue retirado, se le adicionó a cada placa 1 mL de tripsina, las placas se incubaron a 37 °C durante 1.5 min y al finalizar este tiempo, se agregó 1 mL de medio DMEM suplementado para detener la acción de la tripsina. Posteriormente, la suspensión celular fue transferida a un tubo Corning® de 1.5 mL y se centrifugó a 1200 rpm a 25 °C durante 5 min, acto seguido, el medio fue desechado, el *pellet* de células se resuspendió en 3 mL de DMEM suplementado y 20 µL de la suspensión se mezclaron con 20 µL de azul tripano. Por último, 10 µL de la mezcla anterior se colocaron en cada extremo de una cámara de Neubauer y se contaron las células no teñidas de azul en ocho cuadrantes de la cámara con ayuda de un microscopio de campo claro. El número total de células por mililitro de suspensión se calculó de acuerdo a la formula: (promedio de células contadas en los ocho cuadrantes) X 2 X 10,000.



## **Detección de células senescentes mediante la tinción de $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia**

La tinción de  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia se realizó por triplicado, tanto en células tratadas con  $H_2O_2$ , como en aquellas no tratadas. Primero se prepararon 10 mL de solución de tinción de  $\beta$ -galactosidasa mezclando 400  $\mu$ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$  D-galactopiranosido al 10 % (X-gal, Sigma-Aldrich, concentración final 0.1 %), 200  $\mu$ L de ferro-ferricianuro 0.25 M (concentración final 5 mM), 1.5 mL de cloruro de sodio 1 M (NaCl, concentración final 150 mM), 20  $\mu$ L de cloruro de magnesio 1 M ( $MgCl_2$ , concentración final 2 mM), 1 mL de solución de fosfato de sodio/ácido cítrico 400 mM (concentración final 40 mM) y 6.88 mL de agua mQ. Por otro lado, las células se procesaron como se describe a continuación: se retiró el medio de cultivo de cada placa y las células adheridas fueron lavadas con 2 mL de PBS 1X, el PBS fue retirado y las células se fijaron durante 15 min con 2 mL de paraformaldehído al 4 %. Al finalizar este lapso, el paraformaldehído fue aspirado y se efectuaron dos lavados durante 5 min cada vez, con 2 mL de PBS 1X, agitando suavemente con la mano en cada lavado. Por último se aspiró el PBS, se adicionaron 2 mL de la solución de  $\beta$ -galactosidasa a cada placa, y todas las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h. Al finalizar este periodo de tiempo, la solución de tinción fue retirada, sustituida por agua destilada y las placas se observaron en el microscopio de campo claro.

## **Medición de la longitud de telómeros absoluta de células HEK293 utilizadas en el modelo de senescencia inducida *in vitro***

Se obtuvo ADN genómico de células HEK293 tratadas con  $H_2O_2$  y de células control no tratadas. En primer lugar, se prepararon 100 mL de una solución *buffer* de lisis que contenía proteinasa K (100  $\mu$ g/mL). Se añadieron 500  $\mu$ L de este *buffer* a cada placa de células HEK previamente descongeladas y se incubaron 37 °C por 90 min. Transcurrido este tiempo, el contenido se transfirió a tubos Eppendorf® de 1.5 mL etiquetados adecuadamente y se centrifugaron a 14, 000 rpm a 25 °C durante 5 min. Posteriormente el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos, se adicionó un volumen igual de isopropanol más 20  $\mu$ L de NaCl 5 M (concentración final 100 mM) y los tubos se incubaron toda la noche a -20 °C. Realizado lo anterior los tubos se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron a 14, 000 rpm a 25 °C durante 20 min, el isopropanol fue desechado, el *pellet* se resuspendió en 250  $\mu$ L de etanol al 70 % para ser purificado y los tubos se centrifugaron a 14, 000 rpm a 25 °C durante 5 min. Como siguiente paso, el etanol fue desechado y los tubos se dejaron abiertos a temperatura ambiente para que las trazas de etanol pudieran evaporarse. Por último el *pellet* se disolvió

en 50  $\mu\text{L}$  de agua mQ esteril, se cuantificó en Nanodrop® y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

### **Determinación de la longitud de telómeros absoluta de células utilizadas en el modelo de senescencia inducida *in vitro***

Como primer paso, soluciones stock de cada oligonucleótido sintetizado fueron preparadas: TeloF: 100 nM, TeloR 100 nM, GlobF 300 nM, GlobR, 300 nM, se dividieron en alícuotas y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización. El análisis se realizó utilizando el ADN aislado siguiendo el método descrito anteriormente. El protocolo qPCR empleado se describe a continuación: se prepararon dos *Master mix*, uno con el par de oligonucleótidos para la ATs (*Master mix TEL*) y otro con el par de oligonucleótidos necesarios para la amplificación del gen de  $\beta$ -globina (*Master mix BGLOB*). La composición de ambos *Master mix* fue idéntica, a excepción de los oligonucleótidos usados. Las concentraciones finales de cada reactivo por reacción fueron: 5  $\mu\text{L}$  de Power SYBR®Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems®, #Cat: 4367659, concentración final 1X), oligonucleótido F: 1  $\mu\text{L}$ , oligonucleótido R: 1  $\mu\text{L}$ , agua estéril libre de nucleasas (Thermo Scientific®): 2  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones finales de cada oligonucleótido fueron: TeloF: 10 nM, TeloR 10 nM, GlobF 30 nM, GlobR, 30 nM. Adicionalmente se prepararon las cinco diluciones seriadas (factor de dilución 1:10) utilizadas para cada curva estándar de los oligonucleótidos TEL STD (D1: 0.72 pg/ $\mu\text{L}$  D2:  $7.2 \times 10^{-2}$  pg/ $\mu\text{L}$  D3:  $7.2 \times 10^{-3}$  pg/ $\mu\text{L}$  D4:  $7.2 \times 10^{-4}$  pg/ $\mu\text{L}$  y D5:  $7.2 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu\text{L}$ ) y BGLOB STD (D1:  $7.1 \times 10^{-3}$  pg/ $\mu\text{L}$  D2:  $7.1 \times 10^{-4}$  pg/ $\mu\text{L}$  D3:  $7.1 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu\text{L}$  D4:  $7.1 \times 10^{-6}$  pg/ $\mu\text{L}$  y D5:  $7.1 \times 10^{-7}$  pg/ $\mu\text{L}$ ).

En total se preparó 459  $\mu\text{L}$  de cada *Master Mix* por placa, suficiente para 51 reacciones (se utilizaron placas de 48 pozos). Cada muestra se corrió en dos placas diferentes, una placa para la amplificación de secuencia telomérica y otra para la amplificación del gen de  $\beta$ -globina. A cada pozo se le adicionaron 9  $\mu\text{L}$  del *Master mix TEL* o *Master mix BGLOB* según fuera el caso. Además cada placa contenía las diluciones correspondientes de su curva estándar, TEL STD para la placa que contenía el *Master mix TEL* y BGLOB STD para la que contenía el *Master mix BGLOB*. Se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (5 ng) de muestra problema por pozo, 1  $\mu\text{L}$  de cada dilución de oligonucleótidos para las curvas estándar o 1  $\mu\text{L}$  para los pozos destinados al NTC. Cada muestra problema y dilución para las curvas estándar se corrió por triplicado en cada placa, incluyendo el NTC. El perfil térmico de qPCR utilizado para todas las amplificaciones fue: un ciclo de activación de la polimerasa a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de

15 s a 95 °C (desnaturalización de ADN) y 58 °C por 1 min (alineamiento de oligonucleótidos). El perfil térmico de la curva de disociación fue: 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C.

Los *Master mix*, así como las diluciones de los oligonucleótidos estándar se realizaron en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones, y todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System de 48 pozos (Applied Biosystems™ Foster #Cat: 4376357).

### **Procesamiento de datos**

Para cada muestra se conoce el valor promedio de  $C_t$ , de esta forma la cantidad total de secuencia telomérica y del GCU puede ser calculadas por el *software* del termociclador a partir sus respectivas curvas estándar. Estos valores se exportaron a un formato de Excel y fueron usados para calcular la longitud total de telómero en Kb por reacción. La longitud total en Kb por reacción fue entonces dividida por el número de copias por genoma diploide, calculado a partir de los datos obtenidos de la amplificación del GCU, de esta forma obtenemos la longitud absoluta en Kb por genoma diploide. Por último, el valor obtenido se dividió por 92 para calcular la longitud absoluta en Kb por telómero (ver sección de curvas estándar y cálculos asociados para más detalles).

### **Análisis estadístico**

Los valores de longitud absoluta de telómeros obtenidos fueron reportados como medias  $\pm$  error estándar. Se realizaron análisis de doble varianza (ANOVA) y pruebas *t* de *Student* para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas pruebas con un valor de  $p < 0.05$ .

#### ***VI.4 Determinación y comparación de la longitud de los telómeros de ADN genómico en las células salivales de niños mexicanos obesos y con peso normal***

---

##### **Selección de la muestra poblacional**

La selección de la muestra poblacional infantil se realizó en colaboración con la Dra. Mónica Viviana Martínez Martínez, Profesor Titular de la Especialidad de Medicina Familiar, adscrita al Hospital General Regional con Medicina Familiar No.1 (HGR1) “Lic. Ignacio García Téllez” del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Cuernavaca, Morelos, con el Dr. Cidronio Albavera Hernández, Médico Familiar, adscrito al HGR1, y con la Dra. Laura Karina Arenas Sandoval, Residente de Primer Año de Medicina Familiar, Adscrito al HGR1.

Se seleccionaron un total de 143 pacientes que incluían ambos sexos entre los 8 y 10 años de edad, los cuales acudieron a la consulta externa de Medicina Familiar del HGR1 acompañados de uno o ambos padres. Fueron excluidos aquellos participantes con padecimientos como trastornos mentales, cáncer, colagenopatías, diabetes, así como obesidad secundaria debida a síndromes endocrinos específicos, también fueron motivo de exclusión aquellos que se encontraban bajo tratamiento farmacológico, no cumplían con la edad solicitada, no eran derechohabientes del IMSS, niños que no dieron asentimiento o cuyos padres se negaron a firmar el consentimiento informado. Previa firma de consentimiento informado (anexos 1 y 2), se aplicó un instrumento de recolección de datos (anexo 3) a los padres de cada participante para conocer datos socioeconómicos, condiciones de nacimiento, actividad física, gasto de tiempo en entretenimiento y hábitos alimentarios de los pacientes, así como también otros aspectos de la vida familiar como el estado civil, grado de escolaridad y ocupación de los padres, adicionalmente se aplicó el instrumento FACES III para evaluar la funcionalidad familiar. Posterior a esto, a cada paciente se le practicó un examen físico que consistió en la toma de medidas antropométricas siguiendo procedimientos estándar tales como peso, talla y determinación del porcentaje de grasa corporal mediante impedancia bioeléctrica, esta última medición se realizó con una balanza de control corporal Omron® HBF-514C. Por último, se tomo una muestra de saliva mediante el *kit* de recolección Oragene•DNA® (OG-500). Las muestras salivales se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso.

## **Clasificación de pacientes de acuerdo al peso y al porcentaje de grasa corporal**

El índice de masa corporal (IMC) fue calculado dividiendo el peso por el cuadrado de la talla. La clasificación en base al peso de los participantes se determinó según las tablas de crecimiento por percentiles de acuerdo al género y edad del *Center Of Disease Control* (CDC, por sus siglas en inglés, anexo 4). Los pacientes con un percentil menor a 85 fueron diagnosticados con peso normal, mientras que aquellos con un percentil entre 85 y 95 con sobrepeso, la obesidad se definió con un percentil mayor a 95.

La clasificación de acuerdo al porcentaje de grasa corporal se realizó en base a las curvas de referencia de grasa corporal del *British Medical Journal* (anexo 5). Estas curvas clasifican el porcentaje de grasa corporal de acuerdo al género y edad. Para pacientes del sexo femenino, se consideró como porcentaje de grasa corporal alto valores mayores a 26% para niñas de 8 años, 27% para niñas de 9 años y 28% para aquellas pacientes de 10 años de edad, mientras que para el sexo masculino se consideraron altos los porcentajes mayores a 21%, 22% y 23% respectivamente.

## **Aislamiento de ADN genómico a partir de células salivales**

Cada tubo que contenía la muestra de saliva se mezcló invirtiendo y agitando suavemente durante unos segundos. Las muestras se incubaron a 50 °C en una incubadora de agua durante 60 min. Transcurrido este tiempo, se transfirieron 500 µL de la muestra a tubos Eppendorf® de 1,5 mL y se añadieron 20 µL (1/25 del volumen) de PT-L2P® (reactivo específico para el aislamiento de ADN a partir del *kit* de recolección Oragene•DNA® OG-500) a cada tubo, se mezcló durante unos segundos usando Vortex® y se incubaron en hielo por 10 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 5 min a 15.000 × *g*. A continuación, se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo Eppendorf® limpio y el *pellet* fue desechado. Como siguiente paso, se añadieron 600 µL de etanol al 100%, se mezcló suavemente por inversión 10 veces y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente por 10 min para permitir la precipitación completa del ADN. Los tubos se colocaron en la microcentrífuga en una orientación predeterminada y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 2 min a 15.000 × *g*. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo, se desechó, se conservó el *pellet*, y se le adicionaron 250 µL de etanol al 70%. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifugaron a 15000 rpm por 5 min y el etanol se desechó por decantación. Este paso de lavado

se repitió 3 veces. Por último, el *pellet* fue resuspendido en 50  $\mu\text{L}$  de *buffer* TE 1X, se mezcló mediante Vortex® por 5 segundos y se incubó a 50° C durante 60 min para asegurarse que el ADN estuviese completamente hidratado, seguido de otro paso de Vortex®. El ADN se cuantificó en Nanodrop®, se prepararon alícuotas de cada muestra a una concentración de 5 ng y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

### **Determinación de la longitud de telómeros absoluta de pacientes a partir de células salivales**

Como primer paso, soluciones stock de cada oligonucleótido sintetizado fueron preparadas: TeloF: 100 nM, TeloR 100 nM, GlobF 300 nM, GlobR, 300 nM, se dividieron en alícuotas y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización. El análisis se realizó utilizando el ADN aislado a partir de células salivales siguiendo el método descrito anteriormente. El protocolo qPCR empleado se describe a continuación: se prepararon dos *Master mix*, uno con el par de oligonucleótidos para la ATs (*Master mix TEL*) y otro con el par de oligonucleótidos necesarios para la amplificación del gen de  $\beta$ -globina (*Master mix BGLOB*). La composición de ambos *Master mix* fue idéntica, a excepción de los oligonucleótidos usados. Las concentraciones finales de cada reactivo por reacción fueron: 5  $\mu\text{L}$  de Power SYBR®Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems®, #Cat: 4367659, concentración final 1X), oligonucleótido F: 1  $\mu\text{L}$ , oligonucleótido R: 1  $\mu\text{L}$ , agua estéril libre de nucleasas (Thermo Scientific®): 2  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones finales de cada oligonucleótido fueron: TeloF: 10 nM, TeloR 10 nM, GlobF 30 nM, GlobR, 30 nM. Adicionalmente se prepararon las cinco diluciones seriadas (factor de dilución 1:10) utilizadas para cada curva estándar de los oligonucleótidos TEL STD (D1: 0.72 pg/ $\mu\text{L}$  D2:  $7.2 \times 10^{-2}$  pg/ $\mu\text{L}$  D3:  $7.2 \times 10^{-3}$  pg/ $\mu\text{L}$  D4:  $7.2 \times 10^{-4}$  pg/ $\mu\text{L}$  y D5:  $7.2 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu\text{L}$ ) y BGLOB STD (D1:  $7.1 \times 10^{-3}$  pg/ $\mu\text{L}$  D2:  $7.1 \times 10^{-4}$  pg/ $\mu\text{L}$  D3:  $7.1 \times 10^{-5}$  pg/ $\mu\text{L}$  D4:  $7.1 \times 10^{-6}$  pg/ $\mu\text{L}$  y D5:  $7.1 \times 10^{-7}$  pg/ $\mu\text{L}$ ).

En total se prepararon 459  $\mu\text{L}$  de cada *Master Mix* por placa, suficiente para 51 reacciones (se utilizaron placas de 48 pozos). Cada muestra se corrió en dos placas diferentes, una placa para la amplificación de secuencia telomérica y otra para la amplificación del gen de  $\beta$ -globina. A cada pozo se le adicionaron 9  $\mu\text{L}$  del *Master mix TEL* o *Master mix BGLOB* según fuera el caso. Además cada placa contenía las diluciones correspondientes de su curva estándar, TEL STD para la placa que contenía el *Master mix TEL* y BGLOB STD para la que contenía el *Master mix BGLOB*. Se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (5 ng) de muestra problema por pozo, 1  $\mu\text{L}$  de cada dilución de oligonucleótidos para las curvas estándar o 1  $\mu\text{L}$  para los pozos destinados al NTC. Cada muestra problema y

dilución para las curvas estándar se corrió por triplicado en cada placa, incluyendo el NTC. El perfil térmico de qPCR utilizado para todas las amplificaciones fue: un ciclo de activación de la polimerasa a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C (desnaturalización de ADN) y 58 °C por 1 min (alineamiento de oligonucleótidos). El perfil térmico de la curva de disociación fue: 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 95 °C.

Los *Master mix*, así como las diluciones de los oligonucleótidos estándar se realizaron en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones, y todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System de 48 pozos (Applied Biosystems™ Foster #Cat: 4376357).

### **Procesamiento de datos**

Para cada muestra se conoce el valor promedio de  $C_t$ , de esta forma la cantidad total de secuencia telomérica y del GCU puede ser calculadas por el *software* del termociclador a partir sus respectivas curvas estándar. Estos valores se exportaron a un formato de Excel y fueron usados para calcular la longitud total de telómero en Kb por reacción. La longitud total en Kb por reacción fue entonces dividida por el número de copias por genoma diploide, calculado a partir de los datos obtenidos de la amplificación del GCU, de esta forma obtenemos la longitud absoluta en Kb por genoma diploide. Por último, el valor obtenido se dividió por 92 para calcular la longitud absoluta en Kb por telómero (ver sección de curvas estándar y cálculos asociados para más detalles).

### **Análisis estadístico**

Los valores de longitud absoluta de telómeros obtenidos fueron reportados como medias  $\pm$  error estándar. Se realizaron análisis de doble varianza (ANOVA) y pruebas *t* de *Student* para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas pruebas con un valor de  $p < 0.05$ .

# VII. RESULTADOS

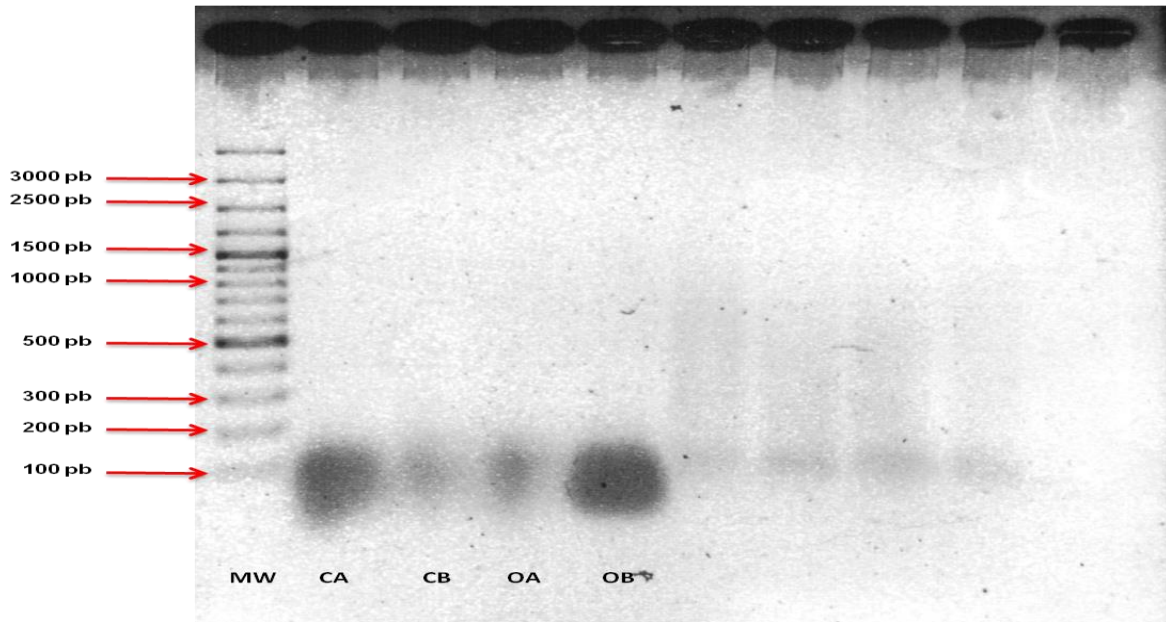
---

## ***VII.1 Estandarización del protocolo para la amplificación de telómeros (ATs) a partir de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final***

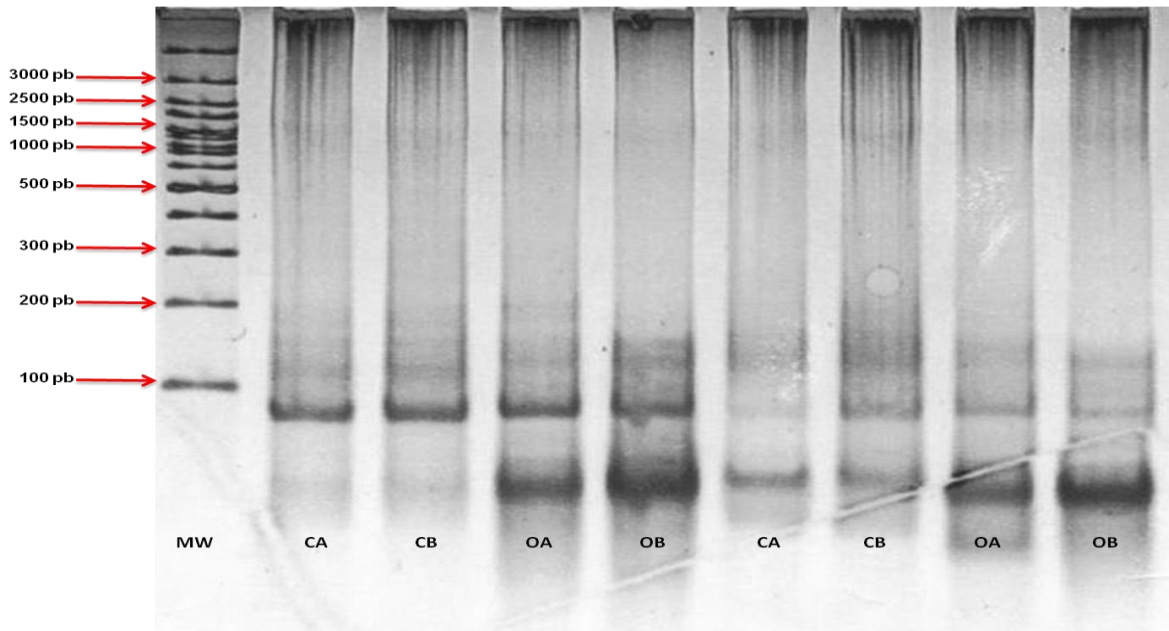
---

En el primer paso de estandarización, se intentó amplificar la secuencia telomérica de ADN genómico extraído de cerebro de ratón, empleando en cada *Master mix* las concentraciones de oligonucleótidos reportadas por cada autor (Cawthon, 2002; O'Callaghan y Fenech, 2011), tal y como se describe en materiales y métodos. La **Figura 6** corresponde a un gel de agarosa al 1% realizado con los productos de amplificación de este primer paso. No se detectaron productos con el patrón usual de bandas en las muestras analizadas, sin embargo se observó un barrido que no superó los 200 pb. Cawthon reporta barridos de mayor longitud y bandas perfectamente visibles de productos que varían desde los 100 pb a los 492 pb de longitud (Cawthon, 2002). La mayor concentración de productos se observó en la parte inferior de cada carril, por debajo de los 100 pb de longitud, lo cual indica la formación de un gran número de dímeros de oligonucleótidos, atribuible a un desbalance entre las concentraciones de ADN y oligonucleótidos. Se sabe que si la concentración de ADN es significativamente menor a la de los *primers*, se favorece la formación de dímeros debido a la poca disponibilidad de templado para su alineamiento (Cawthon, 2002). Cuando esto sucede, se reduce en gran porcentaje la posibilidad de amplificar la secuencia deseada. Después de evaluar diferentes concentraciones de oligonucleótidos llegamos a los resultados mostrados en la **Figura 7**. El gel fue de acrilamida 10% para obtener una mejor separación de los productos obtenidos. En efecto, se observaron bandas bien definidas de distintos tamaños, sin embargo tampoco superaron los 200 pb. Todavía se observaron dímeros de *primers*, sin embargo en una concentración menor. En este punto decidimos emplear otra fuente de ADN genómico, por recomendación de la Dra. Elena García Arias-Salgado del Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM de la Universidad Autónoma de Madrid, ya que en su experiencia es más complicado amplificar telómeros de ratón, debido a que su longitud es aproximadamente diez veces mayor que los telómeros humanos.



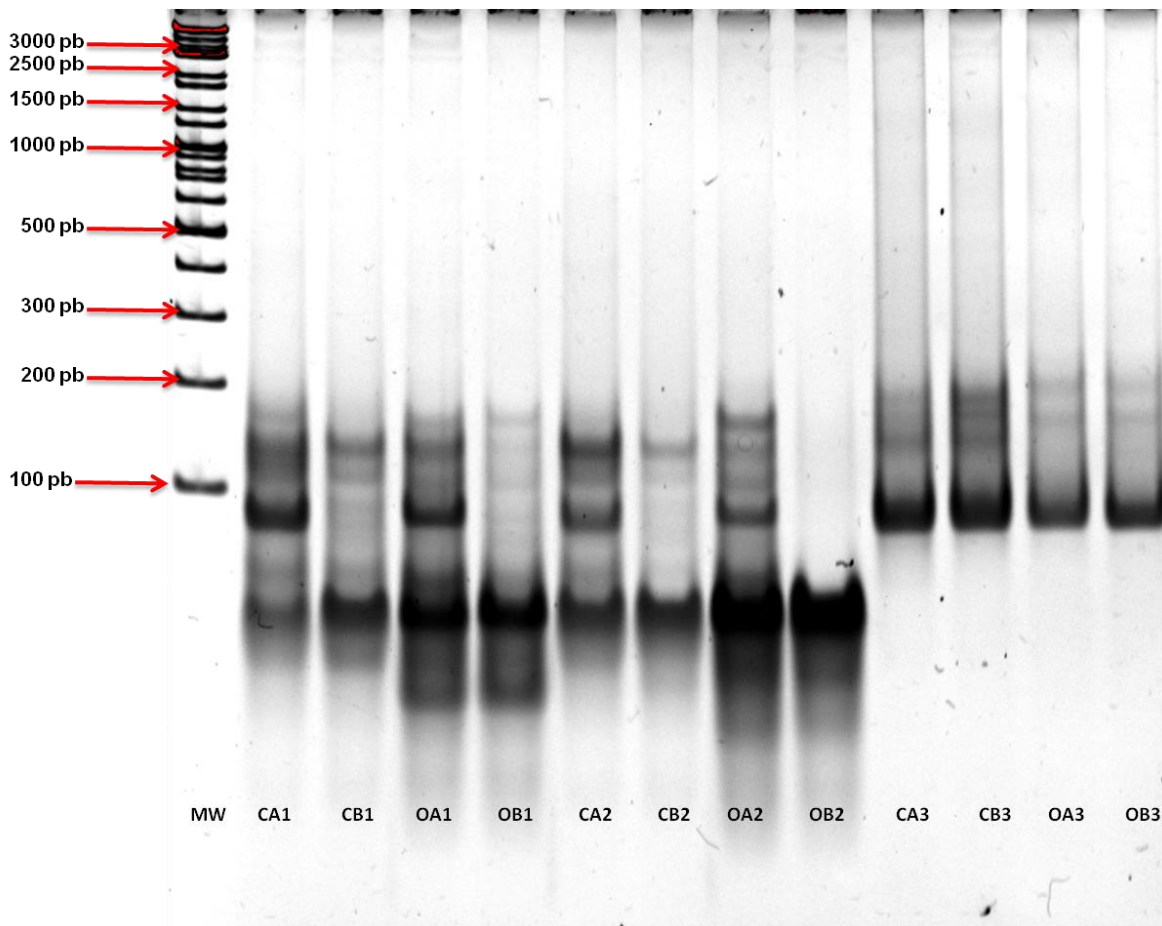


**Figura 6. Optimización de las condiciones de amplificación de la región telomérica a partir de ADN genómico de cerebro de ratón.** Gel de agarosa al 1% mostrando los productos de amplificación del protocolo PCR. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos Detalles en materiales y métodos. MW: marcador de peso molecular de 100 pb. CA: Par de *primers* Cawthon utilizados en el *Master mix A*, CB: Par de *primers* Cawthon utilizados en el *Master mix B*, OA: Par de *primers* O'Callaghan utilizados en el *Master mix A*, OB: Par de *primers* O'Callaghan utilizados en el *Master mix B*.



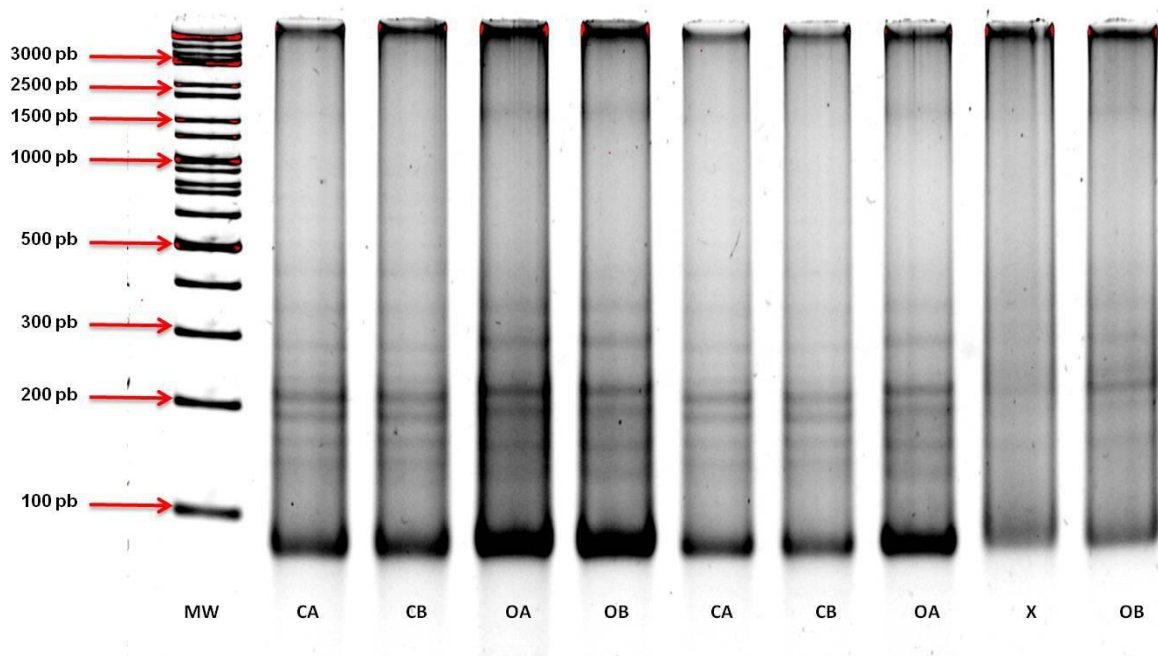
**Figura 7. Amplificación de la región telomérica a partir de ADN genómico de cerebro de ratón.** Gel de poliacrilamida al 10% mostrando los productos de amplificación del protocolo PCR. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos. MW: marcador de peso molecular de 100 pb. CA: Par de *primers* Cawthon utilizados en el *Master mix A*, CB: Par de *primers* Cawthon utilizados en el *Master mix B*, OA: Par de *primers* O'Callaghan utilizados en el *Master mix A*, OB: Par de *primers* O'Callaghan utilizados en el *Master mix B*. Se muestran resultados por duplicado.

Con base en lo anterior, se decidió usar ADN genómico extraído de células HEK y evaluar nuevamente diferentes concentraciones de oligonucleótidos. Adicionalmente, se modificaron las condiciones de termociclado tal y como se detalla en materiales y métodos. Sin embargo, aunque se logró mejorar la resolución de las bandas en el gel, los productos de amplificación permanecieron sin superar los 200 pb, y seguimos obteniendo una señal muy fuerte de dímeros de *primers* como se puede observar en la **Figura 8**. El análisis de estos resultados nos llevó a pensar que probablemente la pureza del ADN aislado no era la adecuada y que las impurezas presentes podrían estar afectando la amplificación. Debido a esto, se decidió utilizar una tercer fuente de ADN genómico, linfocitos T humanos (LTh) aislados anteriormente en el laboratorio. Los resultados obtenidos con esta línea celular (no mostrados) fueron iguales a los obtenidos con las células HEK.



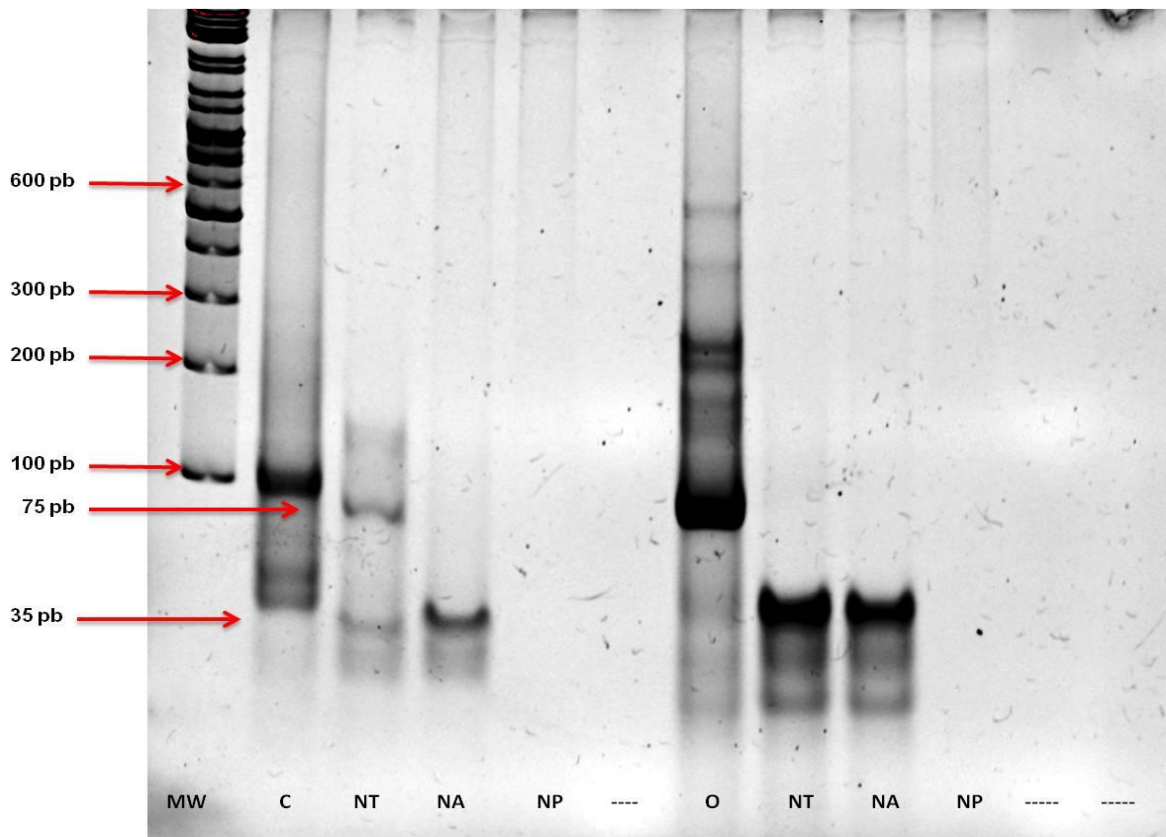
**Figura 8. Estandarización empleando ADN genómico de células HEK.** Gel de poliacrilamida al 10% mostrando los productos de amplificación del protocolo PCR. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos. MW: marcador de peso molecular de 100 pb. CA: Par de *primers* Cawthon en el *Master mix A*, CB: Par de *primers* Cawthon en el *Master mix B*, OA: Par de *primers* O'Callaghan en el *Master mix A*, OB: Par de *primers* O'Callaghan utilizados en el *Master mix B*. 1, 2 y 3 indican diferentes condiciones de termociclado.

Un nuevo análisis de los resultados mostrados en la **Figura 8** nos llevó a evaluar la eficiencia de la Taq polimerasa casera, utilizada hasta ese momento para la estandarización del protocolo. En efecto, al emplear la enzima Platinum® Taq High Fidelity en las mezclas de reacción mostradas en la Tabla 2 y ADN genómico de LTh, logramos obtener productos de amplificación mayores a los 200 pb. De hecho, el rango de tamaños detectados y perfectamente visibles en el gel de poliacrilamida mostrado en la **Figura 9**, va desde 100 pb a 500 pb, muy similar al patrón de bandeado reportado por Cawthon. Sin embargo, de manera sorprendente se observaron también productos de aproximadamente 1500 pb, obtenidos de los *Master mix* que contenían el par de oligonucleótidos TeloF y TeloR (O'Callaghan y Fenech, 2011). Aunque se observó la formación de dímeros, esta fue en menor grado. Cabe resaltar que no se observaron diferencias entre los *Master mix* A y B que contenían el mismo par de oligonucleótidos, por lo que la inclusión de DTT y DMSO en la mezcla de reacción no tuvo efecto en la amplificación.



**Figura 9. Estandarización empleando ADN genómico de LTh.** Gel de poliacrilamida al 10% mostrando los productos de amplificación del protocolo PCR. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos. MW: marcador de peso molecular de 100 pb. CA: Par de *primers* Cawthon en el *Master mix* A, CB: Par de *primers* Cawthon en el *Master mix* B, OA: Par de *primers* O'Callaghan en el *Master mix* A, OB: Par de *primers* O'Callaghan utilizados en el *Master mix* B. Se muestran duplicados de reacción. Composición de los *Master mix* detallada en la Tabla 2.

En experimentos posteriores realizados con la enzima Amplificasa® se incluyeron controles negativos de amplificación, utilizando ya solo el *Master mix A* para cada par de oligonucleótidos. La **Figura 10** muestra estos resultados: una vez más quedó demostrado que la calidad de la enzima polimerasa utilizada en la mezcla de reacción es determinante para la correcta amplificación de los telómeros, se observó que el par de *primers* O'Callghan (O) generó productos con un rango de tamaño de 100 pb a 600 pb, similar al patrón reportado Cawthon y no amplificó en aquellos *Master mix* usados como control, que no contenían ADN (*Non template control, NTC*), polimerasa u oligonucleótidos. La formación de dímeros aun es significativa por lo que se debe disminuir la concentración de oligonucleótidos al estandarizar el protocolo qPCR para evitar que interfiera con la señal del fluoróforo. En contraste, el par de *primers* Cawthon (C) mostró productos de amplificación menores a las 300 pb con esta enzima y la formación de dímeros fue obvia aun en los controles negativos, por lo que concluimos que el par de *primers* diseñados por O'Callaghan tuvo una mayor eficiencia para la amplificación de telómeros.

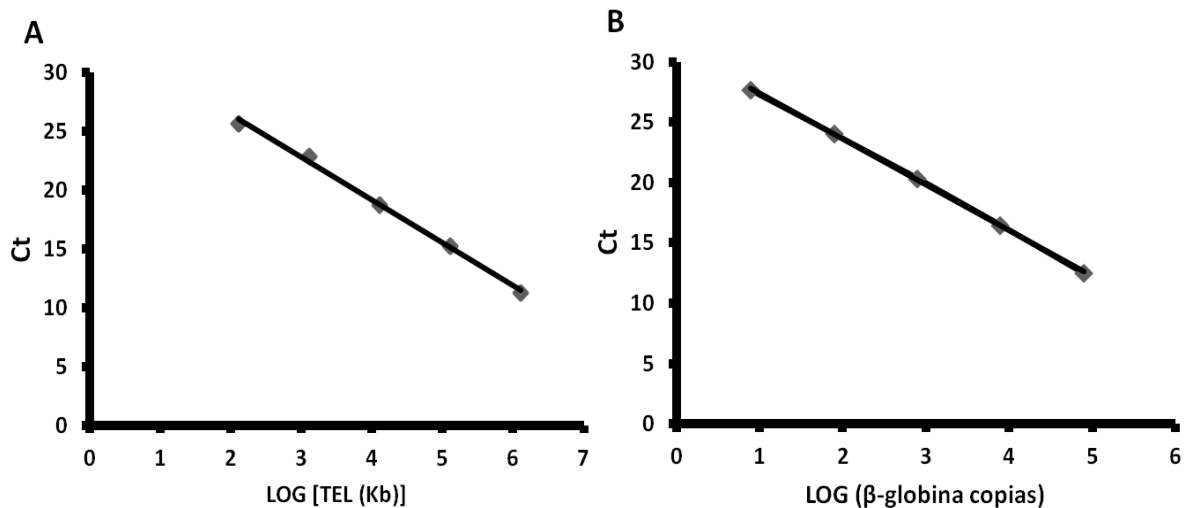


**Figura 10. Estandarización final empleando ADN genómico de LTh.** Gel de poliacrilamida al 10% mostrando los productos de amplificación del protocolo PCR con sus controles negativos. Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos. MW: marcador de peso molecular de 100 pb. C: Par de *primers* Cawthon en el *Master mix A*, O: Par de *primers* O'Callaghan en el *Master mix A*. NT: no templado. NA: no amplificasa. NP: no *primers*.

## VII.2 Optimización del protocolo para la amplificación de telómeros (ATs) a partir de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

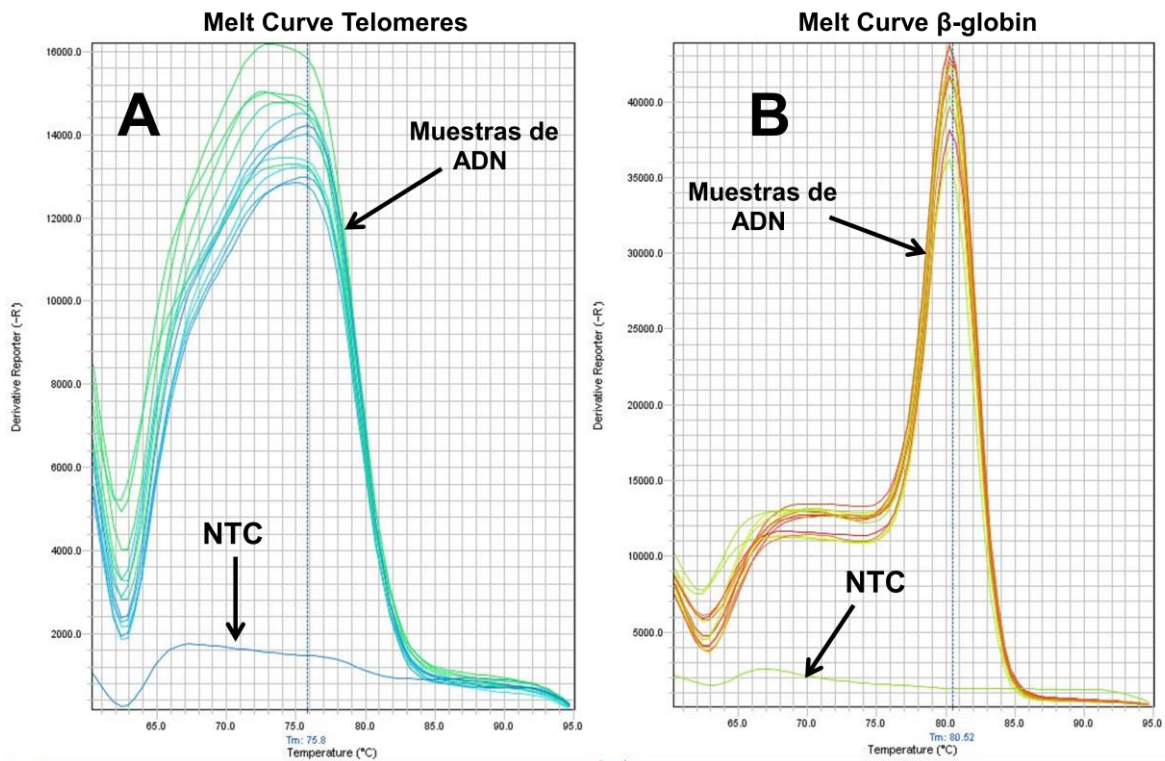
### Estandarización del protocolo qPCR para la amplificación de telómeros

Se estandarizaron las concentraciones de *Master mix*, cantidad de ADN y condiciones de termociclado (descritas en el apartado de materiales y métodos) para la amplificación tanto de la secuencia telomérica, como del gen de  $\beta$ -globina a partir de ADN genómico humano. Se obtuvieron ambas curvas de amplificación utilizando los oligonucleótidos estándar descritos anteriormente. La curva estándar para telómeros (TEL) (**Figura 11, panel A**) obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9968 y se usó para calcular la cantidad de secuencia telomérica por reacción. La cantidad de ADN utilizada de las muestras experimentales se optimizó en base al rango lineal obtenido de esta curva. Por otro lado, la curva estándar del GCU obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9996 y se usó para calcular el número de copias del gen de  $\beta$ -globina en el genoma. El coeficiente de correlación entre las dos curvas fue de 0.063, lo cual indica que ambas curvas son comparables.



**Figura 11. Curvas estándar utilizadas en el cálculo de la longitud de telómeros absoluta.** A) Curva estándar para calcular la cantidad de secuencia telomérica en Kb por reacción. El coeficiente de correlación dentro del rango lineal fue de 0.9968. B) Curva estándar utilizada para calcular el número de copias del gen  $\beta$ -globina en el genoma. El coeficiente de correlación dentro del rango lineal fue de 0.9996. Ambas curvas fueron generadas en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System de 48 pozos (Applied Biosystems™ Foster #Cat: 4376357).

Las curvas estándar se validaron utilizando 5 ng de ADN genómico aislado a partir de células HEK293 y de células salivales humanas. Todas las mediciones entraron dentro de los rangos lineales calculados de cada curva estándar. Para el control negativo NTC no se observó señal de amplificación, lo cual indica que la señal emitida por cada muestra corresponde a los productos específicos esperados y no a la formación de dímeros de *primers*. Adicionalmente, se realizó el análisis de las curvas de disociación. En las mediciones realizadas para calcular la cantidad de secuencia telomérica de cada una de las muestras, se observó la misma temperatura de fusión (75.8 °C), específica para el fragmento amplificado esperado, el NTC mostró un pico de fusión diferente (67 °C), correspondiente a una mínima cantidad formada de dímeros de *primers* (**Fig. 12, panel A**). Para el caso del GCU se obtuvo el mismo éxito, ya que todas las muestras mostraron la misma temperatura de fusión (80.52 °C), específica para el gen de  $\beta$ -globina, mientras que su respectivo NTC mostró un pico de fusión diferente (68 °C), correspondiente a una mínima cantidad formada de dímeros de *primer* (**Fig. 12, panel B**).



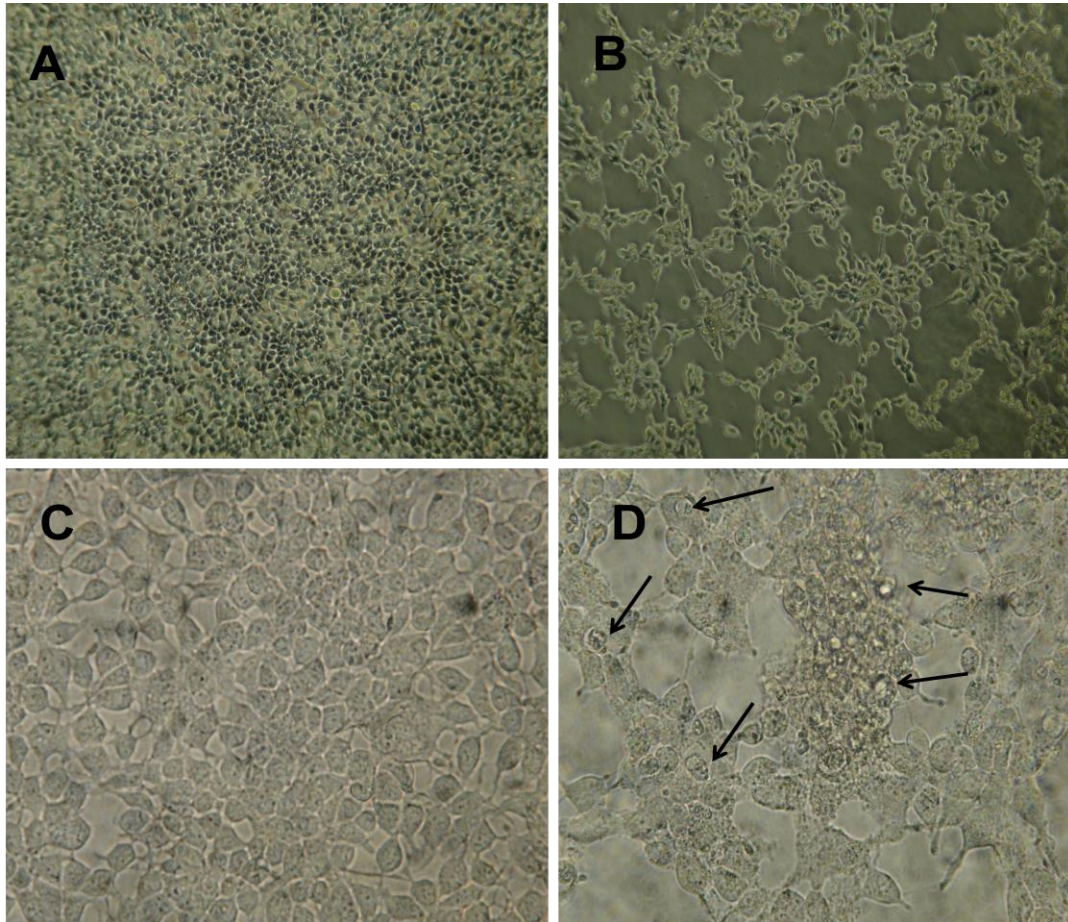
**Figura 12. Curvas de disociación de los productos obtenidos para cada curva estándar. Los picos de fusión marcados como NTC corresponden a dímeros de primer.**

### **VII.3 Validación del protocolo qPCR para la medición de longitud de telómeros en un modelo de senescencia celular inducida *in vitro***

---

#### **Modelo de senescencia inducida *in vitro***

Como se describe en materiales y métodos, las células HEK293 fueron tratadas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por cuatro días consecutivos para inducir senescencia celular (Zhang *et al.*, 2008). Transcurrido este tiempo, las placas de células fueron observadas en el microscopio invertido de campo claro, incluyendo las células control no tratadas, la figura 13 muestra la morfología de ambos grupos de células. Las células tratadas muestran una morfología larga, aplanada y de mayor tamaño (**Figura 13, panel B**), en comparación con las células no tratadas, cuya forma es más redondeada y reducida (**Figura 13, panel A**). Otra característica importante fue observable a un mayor aumento (40X): la presencia de grandes vesículas semejantes a vacuolas en las células tratadas (**Figura 13, panel D, flechas**), lo cual no fue visible en las células control (**Figura 13, panel C**). Es importante destacar la diferencia de confluencia entre los dos grupos, en las placas de células no tratadas se observó una confluencia del 100 %, las placas estaban llenas de células en la zona concéntrica, con excepción de las zonas correspondientes a las orillas, donde no hubo proliferación celular debido a la manipulación diaria, ya que, aunque estas células no fueron tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se sometieron a la misma manipulación mecánica que aquellas que si recibieron el tratamiento. En contraste, las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostraron una confluencia mucho menor, observándose grandes espacios sin células aun en las zonas centrales de las placas (**Figura 13**), lo cual sugiere que estas células proliferaron en menor grado o que detuvieron su proliferación durante el tratamiento. En conjunto, todas estas características observables coinciden con las reportadas en la literatura y publicaciones referentes a senescencia celular (Aubert y Lansdorp, 2008).



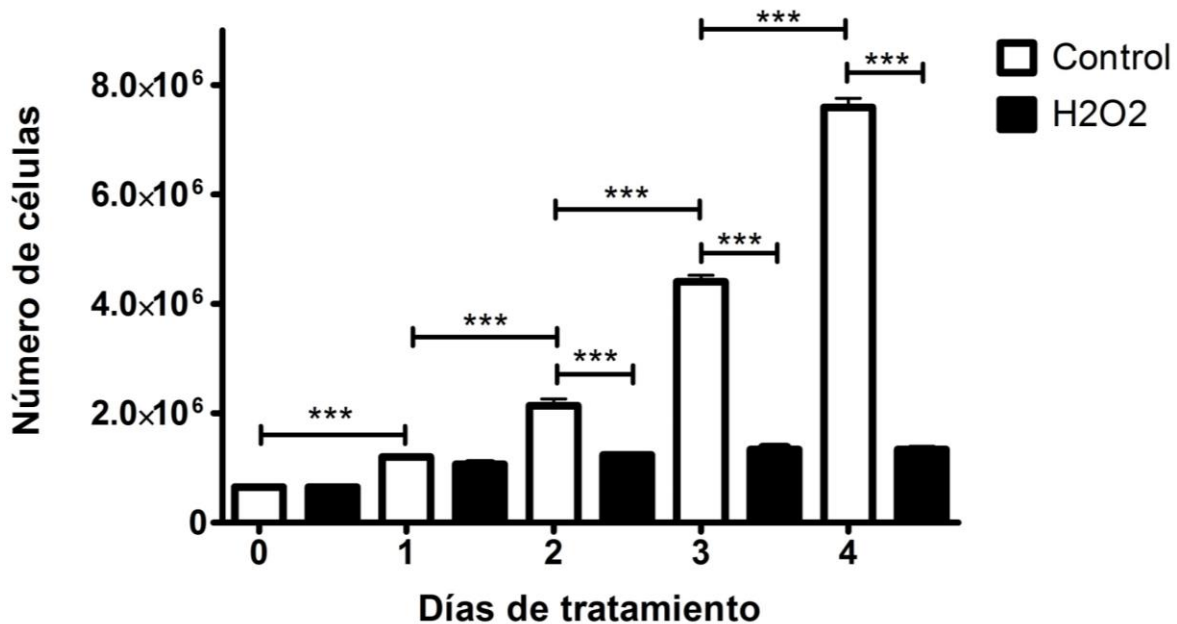
**Figura 13. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la morfología y confluencia de células HEK293.** Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro de células control (A y C) y células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B y D) a diferente ampliación: 10X (A y B) o 40X (C y D).

### Conteos celulares post-tratamiento

Los conteos celulares confirmaron diferencias estadísticas entre la proliferación celular de ambos grupos. Los conteos se realizaron durante los cuatro días de tratamiento. Al inicio del protocolo de senescencia inducida (día 0), se agregó el mismo número de células (650, 000) en placas control y placas en las que se realizaría el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La **Figura 14** muestra una diferencia estadísticamente significativa entre el número de células control y el número de células tratadas en los días 2, 3 y 4 del protocolo, así como también en el número de células control entre los días 0 y 4 del ensayo ( $p < 0.001$ ), esta diferencia no se observó entre las células tratadas en los mismos días. El promedio de células control para los días 1, 2, 3 y 4 fue de  $1.20 \times 10^6 \pm 105492$ ,  $2.14 \times 10^6 \pm 363998$ ,  $4.40 \times 10^6 \pm 345344$  y  $7.59 \times 10^6 \pm 493321$  respectivamente. Esto quiere decir que el número de células se duplicó cada día, coincidiendo con la cinética clásica de



proliferación celular. En contraparte, el promedio de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los días 1, 2, 3 y 4 fue de  $1.06 \times 10^6 \pm 73410$ ,  $1.24 \times 10^6 \pm 119383$ ,  $1.34 \times 10^6 \pm 110135$  y  $1.34 \times 10^6 \pm 164327$  respectivamente, sugiriendo que las células tratadas lograron un solo ciclo de duplicación, y prácticamente detuvieron su proliferación después del segundo día de tratamiento. Esto fue evidente al comparar el número de células control al día 4, que fue significativamente mayor al de las células tratadas en el mismo día ( $7.59 \times 10^6 \pm 493321$  vs.  $1.34 \times 10^6 \pm 164327$ ,  $p < 0.001$ ).

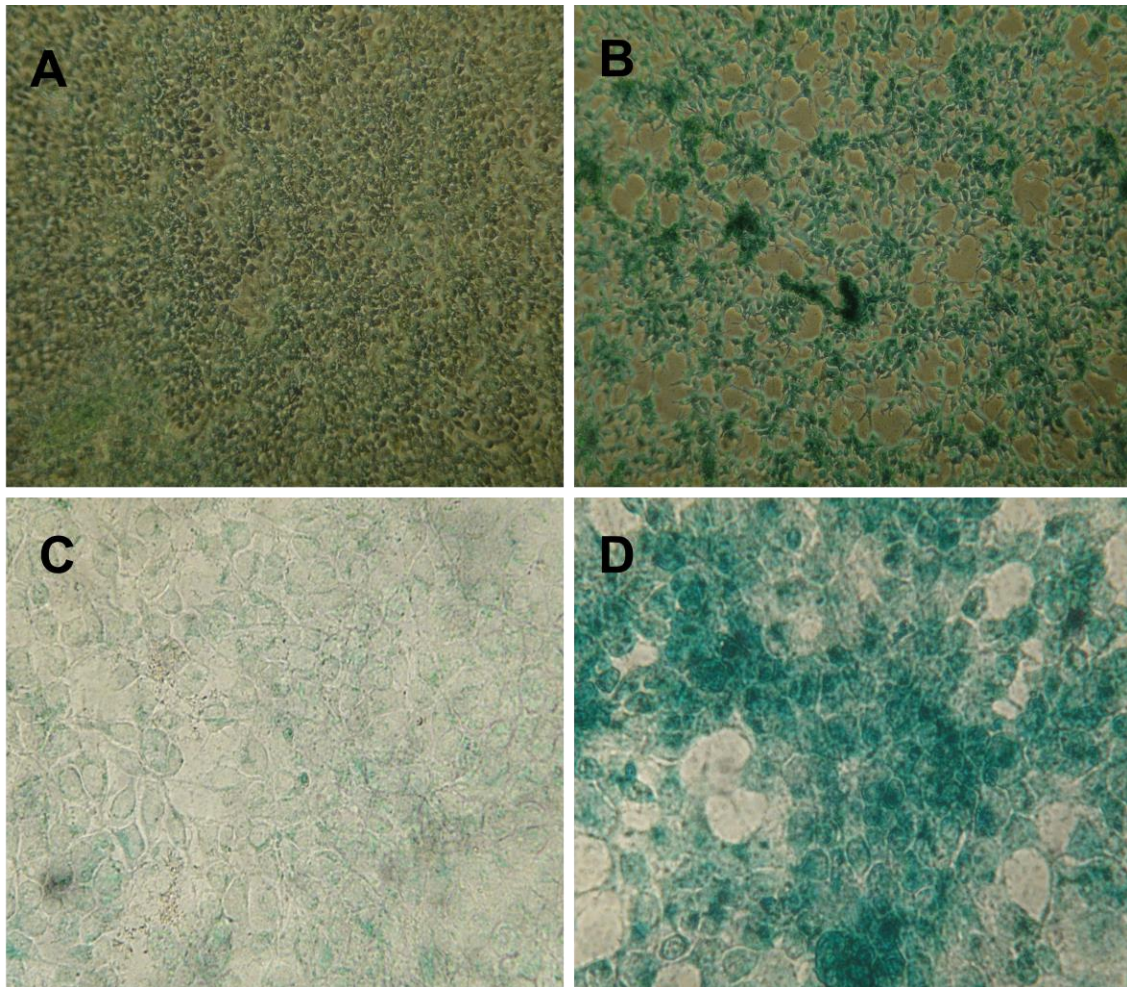


**Figura 14. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detiene la proliferación de células HEK293.** Número de células HEK293 a los días 0, 1, 2, 3 y 4 de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (barras negras), o células no tratadas (barras blancas). Los conteos se realizaron por triplicado y corresponden a ocho campos. Se muestran resultados de tres experimentos independientes. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar. \*\*\*  $p < 0.001$  (prueba ANOVA de una vía).

### Tinción de $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia

Una vez concluido el protocolo de senescencia inducida por tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se realizó la tinción de  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia tanto a células control, como a células tratadas. Como se aprecia en la figura 15, panel B, todas las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se tiñeron de azul, siendo positivas para senescencia, por el contrario, en las placas de células control, solo algunas células resultaron positivas (**Figura 15, panel A**). Es posible que estas células no tratadas que se tiñeron fueran ya de hecho senescentes, debido a que se encontraban en un pase avanzado de proliferación celular (pase número 34), sin embargo la mayoría resultó negativa para la tinción. La incorporación del colorante en células

positivas, resultó evidente cuando estas fueron observadas a un mayor aumento (40X) en el microscopio invertido de campo claro (**Figura 15, panel C y D**).



**Figura 15. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce senescencia en células HEK293.** Imágenes obtenidas por microscopía de campo claro de células control (A y C) y células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B y D) a diferente amplificación: 10X (A y B) o 40X (C y D), después de realizar la tinción de β-galactosidasa asociada a la senescencia.

En conjunto, todos estos datos sugieren que el protocolo de senescencia inducida con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue efectivo, y que las células tratadas durante el ensayo se volvieron senescentes.

## Medición de la longitud de telómeros absoluta de células HEK293 utilizadas en el modelo de senescencia inducida *in vitro*

El acortamiento de telómeros es un mecanismo conocido de senescencia celular prematura y pérdida de la longevidad (Campisi, 2005), por lo tanto, células senescentes deben poseer una LTA menor con respecto a aquellas que no son senescentes. Además, está bien documentado que los telómeros se acortan de 30 a 200 pb con cada división celular debido a el “problema de replicación del extremo del cromosoma” (Aubert y Lansdorp, 2008; von Zglinicki y Martin, 2005). Para este fin, se midió la LTA de células con diferentes ciclos de división, y también en aquellas sometidas al protocolo de senescencia celular inducida *in vitro* por tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La **Figura 16** muestra la LTA de células que cumplen con los criterios de los dos modelos de acortamiento telomérico descritos anteriormente. Como podemos observar, no existe diferencia significativa entre células con número de pase 8 (p8) o 14 (p14), ambos pases muy tempranos de división celular, aunque es importante señalar que se aprecia una marcada tendencia de LTA mayor en células con menor número de pases (p8 vs. P14). Sin embargo, si comparamos cualquiera de estos grupos de células con aquellas que tenían un pase mayor (p34) y fueron utilizadas como células control en el protocolo de senescencia inducida, observamos diferencias estadísticamente significativas entre las LTAs (13.37 Kb/telómero  $\pm$  1.894 p8 vs. 6.614 Kb/telómero  $\pm$  0.5865 p34,  $p < 0.01$  y 11.31 Kb/telómero  $\pm$  2.181 p14 vs. 6.614 Kb/telómero  $\pm$  0.5865 p34,  $p < 0.05$ ), siendo esta diferencia más significativa cuanto mayor número de pases existían entre los grupos.

Por otro lado, también hay diferencias significativas entre la LTA de células a las cuales se les indujo senescencia en comparación con las células control (2.477 Kb/telómero  $\pm$  0.9886 senescentes vs. 6.614 Kb/telómero  $\pm$  0.5865 control,  $p < 0.05$ ), aún cuando se encontraban en el mismo número de pase (p34). Es importante destacar que el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aceleró el acortamiento telomérico independientemente del número de pases, y en conjunto el proceso fue exacerbado en este grupo de células, ya que su LTA no solo fue menor en comparación con las células control, si no que además la significancia fue mayor al compararla con la LTA de los grupos de células de pases tempranos (13.37 Kb/telómero  $\pm$  1.894 p8 vs. 2.477 Kb/telómero  $\pm$  0.9886 senescentes,  $p < 0.001$  y 11.31 Kb/telómero  $\pm$  2.181 p14 vs. 2.477 Kb/telómero  $\pm$  0.9886 senescentes,  $p < 0.001$ ). Estos resultados corroboran por un lado, la hipótesis de que la longitud telomérica disminuye en función del número de divisiones celulares, y por, otro que las ERO promueven el acortamiento de los telómeros, además en conjunto, estos dos factores aceleran el acortamiento telomérico considerablemente.

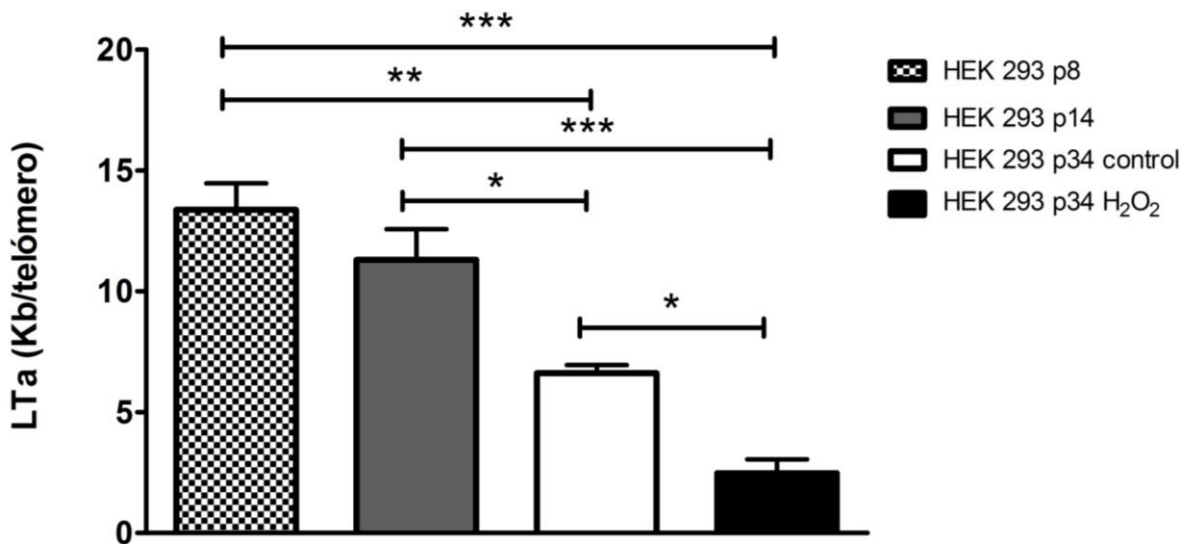


Figura 16. La longitud de los telómeros disminuye en función del número de divisiones celulares y en respuesta al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. LTa absoluta de células HEK293 con diferente número de pases de división celular (p8, p14 y p34), y células HEK293 utilizadas en el modelo de senescencia celular inducida *in vitro*. Se muestran resultados de tres experimentos independientes. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$ , \*\*\*  $p<0.001$  (prueba ANOVA de una vía).

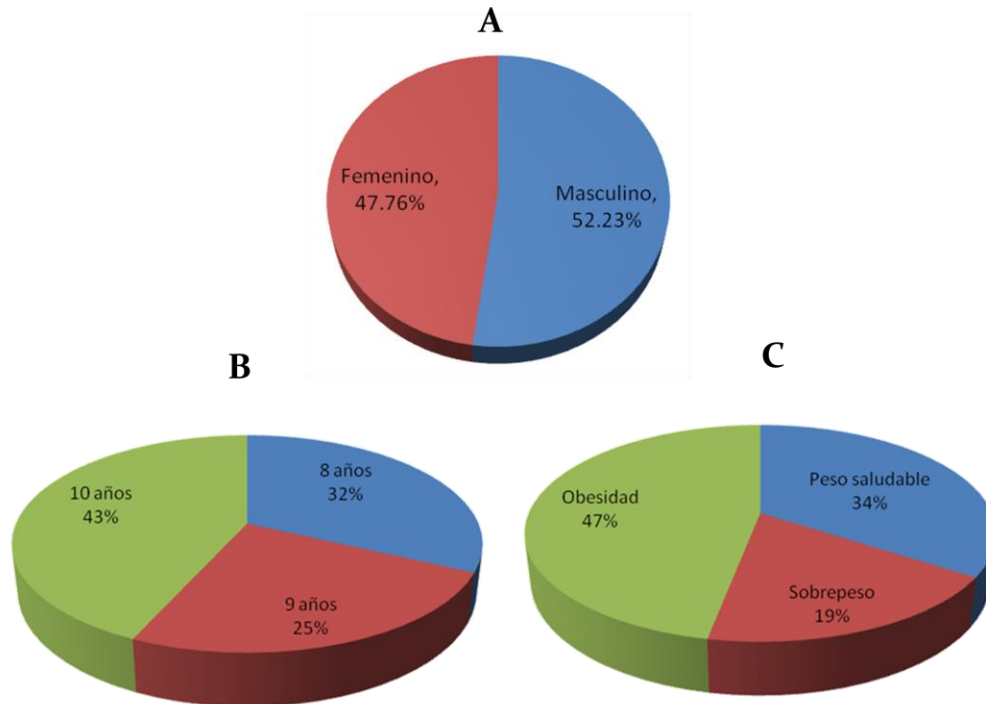
#### ***VII.4 Medición de la longitud de telómeros absoluta en la muestra poblacional***

---

##### **Resultados estadísticos de la muestra poblacional**

En total se determinó la LTa de 134 pacientes, quedando fuera del estudio aquellos cuya medición amplificó fuera del rango lineal de cualquiera de las dos curvas estándar utilizadas en el protocolo qPCR. Del total de pacientes, 70 fueron del sexo masculino y 64 de sexo femenino, representando el 52.23 y 47.76 por ciento respectivamente (**Figura 17, panel A**). La clasificación por edad (**Figura 17, panel B**) mostró que el 43 % de los niños incluidos en el estudio tenía 10 años de edad, 25 % 9 años y 32 % 8 años. Los datos estadísticos obtenidos de la muestra poblacional reflejan claramente la prevalencia de obesidad en el país, ya que un 47% de los participantes fueron diagnosticados con obesidad, mientras que el 19% con sobrepeso y el 34 % tuvieron peso saludable (**Figura 17, panel C**). La

prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad arrojó un total del 66 % de niños con peso alto.



**Figura 17. Características demográficas de la muestra poblacional.** A) Clasificación de la muestra poblacional de acuerdo al género. B) Clasificación de la muestra poblacional de acuerdo a la edad. C) Clasificación de la muestra poblacional de acuerdo al nivel de peso, basado en la clasificación del CDC. n=134.

Como era de esperarse, la comparación de las características antropométricas seleccionadas mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de niños con peso saludable y el grupo diagnosticado con peso alto (**Tabla 4**). Principalmente en aquellos parámetros relacionados con el nivel de peso, tales como peso, IMC y percentil de acuerdo a los parámetros del CDC, donde las medias fueron mayores para todos los casos, en el grupo de niños con peso alto ( $p < 0.001$ ). Interesantemente, también se encontró diferencia en el porcentaje de grasa corporal entre ambos grupos, un indicador del grado de adiposidad del paciente, siendo también significativamente mayor en el grupo de niños con peso alto ( $p < 0.001$ ). Estos resultados corroboran la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad dentro de la población de estudio.

**Tabla 4. Características antropométricas de la muestra poblacional**

	<b>Peso saludable (n = 46, 19 hombres, 27 mujeres)</b>	<b>Peso alto (n = 88, 51 hombres, 37 mujeres)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	9.152 ± 0.1242	9.091 ± 0.09374	0.6983
Talla (cm)	1.358 ± 0.01080	1.385 ± 0.009866	0.0928
Peso (kg)	30.18 ± 0.6144	44.82 ± 0.9958	< 0.0001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	16.30 ± 0.2040	23.16 ± 0.3211	< 0.0001
Percentil (CDC)	46.87 ± 3.801	95.32 ± 0.3495	< 0.0001
Porcentaje de grasa corporal	13.25 ± 0.7308	25.24 ± 1.060	< 0.0001

Las mediciones antropométricas se muestran como medias ± desviación estándar. Todas las mediciones se realizaron al total de participantes en el estudio. n=134.

Se evaluó la cantidad de tiempo que los participantes del estudio realizaban actividad física. Para este fin, se consideraron como físicamente activos aquellos niños que realizaban alguna actividad física por cinco o más horas a la semana, es decir, al menos una hora diaria en semana laboral, que es la cantidad mínima de tiempo recomendada al día. En contraparte, quienes realizaban actividad física por menos de cinco horas semanales fueron clasificados como inactivos físicamente. Dentro del grupo de actividades físicas destacaron el fútbol, karate y natación como las más practicadas, siendo además, las que se realizaron con más constancia entre el grupo de niños físicamente activos. Por otro lado, también se evaluó la cantidad de tiempo que cada niño invertía en entretenimiento sedentario, es decir, sin activación física de ninguna clase, incluyéndose dentro de esta variable las horas dedicadas a ver televisión o a jugar videojuegos. Como es posible apreciar en la **Tabla 5**, el mayor porcentaje de la población de estudio (77.6 %) fue clasificada como inactivamente física, existiendo una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los pacientes clasificados como físicamente activos (22.4 %,  $p < 0.0001$ ). El mismo caso se presentó en lo que respecta al tiempo de entretenimiento sedentario, ya que el 76.11 % de la población pasa más de tres horas diarias viendo televisión o jugando videojuegos, encontrándose también diferencias significativas al compararse con el grupo de niños que invierten menos de tres horas al día realizando estas actividades (23.89 %,  $p < 0.001$ ). Estos resultados pueden explicar la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad dentro de la muestra poblacional, ya que la inactividad física promueve la acumulación de grasa corporal y en consecuencia el aumento de peso.

	<b>&gt; 5 horas semanales (n = 30, 18 hombres, 12 mujeres)</b>	<b>&lt; 5 horas semanales (n = 104, 52 hombres, 52 mujeres)</b>	<b>p</b>
Actividad física	6.267 ± 0.3030	0.5192 ± 0.1040 N=104	< 0.0001
	<b>&gt; 3 horas diarias (n = 102, 52 hombres, 50 mujeres)</b>	<b>&lt; 3 horas diarias (n = 32, 14 hombres, 18 mujeres)</b>	
Horas de entretenimiento sedentario	3.118 ± 0.1217	0.8438 ± 0.06521	< 0.0001

Las horas de actividad física o entretenimiento sedentario se muestran como medias ± desviación estándar. Todas las mediciones se realizaron al total de participantes en el estudio. n=134.

Adicionalmente se tomaron en consideración condiciones *postpartum* asociadas al desarrollo de obesidad en la infancia, así como algunos parámetros cualitativos (**Tabla 6**) de la población que permitieron evaluar el contexto cultural y socioeconómico en el cual se desarrollan los niños. El objetivo de este análisis fue determinar si las condiciones de nacimiento o los factores ambientales influyen de alguna manera en el acortamiento telomérico.

<b>Condiciones <i>postpartum</i></b>	<b>Variables cualitativas</b>
Peso al nacer	Ingreso mensual
Vía de nacimiento	Tipo de familia
Lactancia Materna	Actividades culturales
	Tipo de escuela

## Medición de la longitud de telómeros absoluta mediante el protocolo qPCR

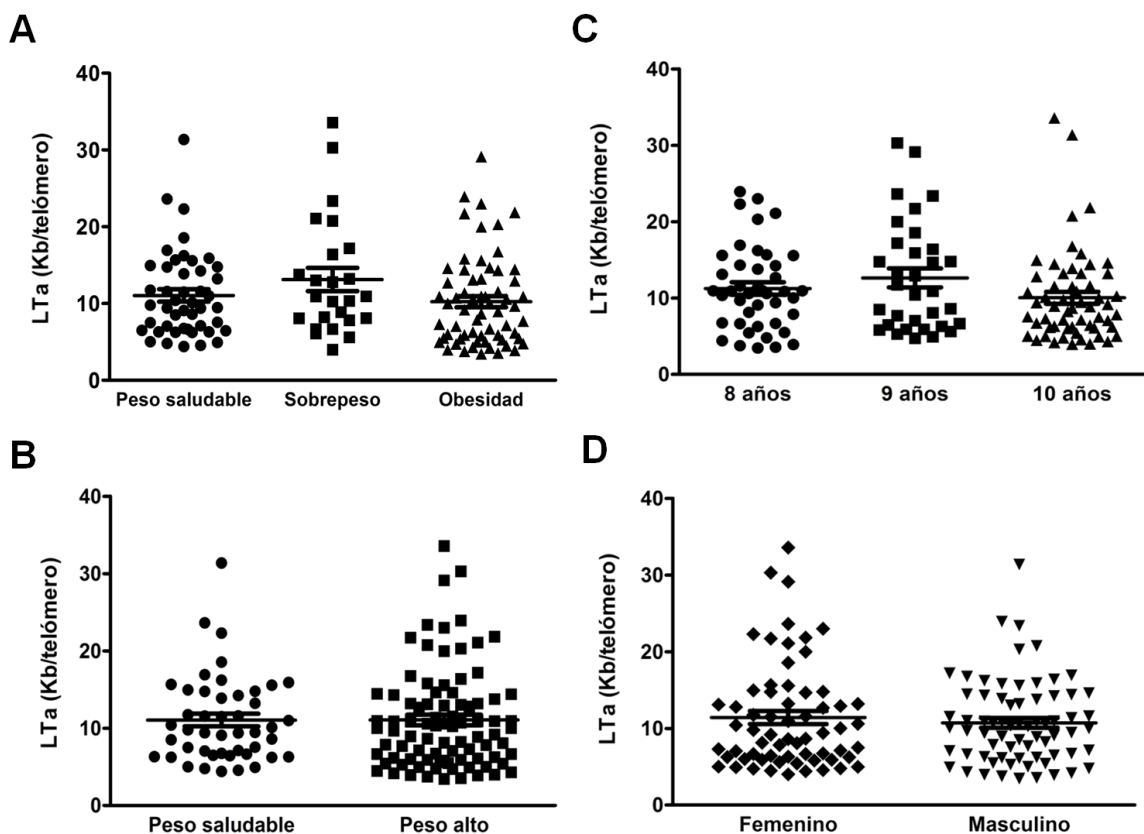
La amplificación de la secuencia telomérica se observó entre los ciclos 15 y 20 del protocolo qPCR. En el caso del gen de copia única ( $\beta$ -globina), las muestras amplificaron entre los ciclos 26 y 28. No se observó amplificación del NTC en la mayoría de las corridas de qPCR, a excepción de algunos casos, en los cuales la amplificación inició después del ciclo 33. La amplificación tardía en estos casos no representó ningún problema debido a que existió una diferencia de 5 ciclos con respecto al último ciclo de amplificación observado para el gen de copia única (ciclo 28). Las muestras que amplificaron fuera de su respectiva curva estándar fueron omitidas del estudio. La reproducibilidad del protocolo se evaluó mediante la amplificación de 10 muestras escogidas aleatoriamente. Se realizó un análisis de regresión lineal entre los  $C_T$  de las muestras obtenidos durante el estudio original y los  $C_T$  correspondientes a las mismas muestras analizadas otro día distinto. Este análisis reveló linealidad significativa entre las medias de  $C_T$  obtenidas en los diferentes ensayos,  $R^2 = 0.98$  para secuencia telomérica y  $R^2 = 0.99$  para  $\beta$ -globina. El coeficiente de variación en las medidas fue de 2.15% y 1.56% respectivamente. El rango de LTA/telómero en la muestra poblacional fue de 3.44–33.57 Kb/telómero, y el rango de longitud telomérica total por genoma diploide fue de 316.48-3088.44 Kb/genoma diploide.

## No existe relación entre el nivel de peso, género o edad y la longitud de telómeros absoluta

El análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir del protocolo de qPCR no mostró diferencias significativas entre los grupos de niños diagnosticados de acuerdo a los criterios establecidos por el CDC, con peso saludable, sobrepeso u obesidad (11.05 Kb/telómero  $\pm$  0.8228, peso saludable, n=46 vs. 13.13 Kb/telómero  $\pm$  1.520 sobrepeso, n=25, p= 0.1927 y 11.05 Kb/telómero  $\pm$  0.8228, peso saludable, n=46 vs. 10.24 Kb/telómero  $\pm$  0.7363 obesidad, n=63, p= 0.4654) **(Figura 18, panel A)**. Debido a lo anterior, decidimos clasificar la población de estudio en dos grupos: peso saludable y peso alto (que incluyó a los pacientes diagnosticados con sobrepeso y obesidad). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (11.05 Kb/telómero  $\pm$  0.8228, peso saludable, n=46 vs. 11.06 Kb/telómero  $\pm$  0.6908, obesidad, n=88, p= 0.9952) **(Figura 18, panel B)**.



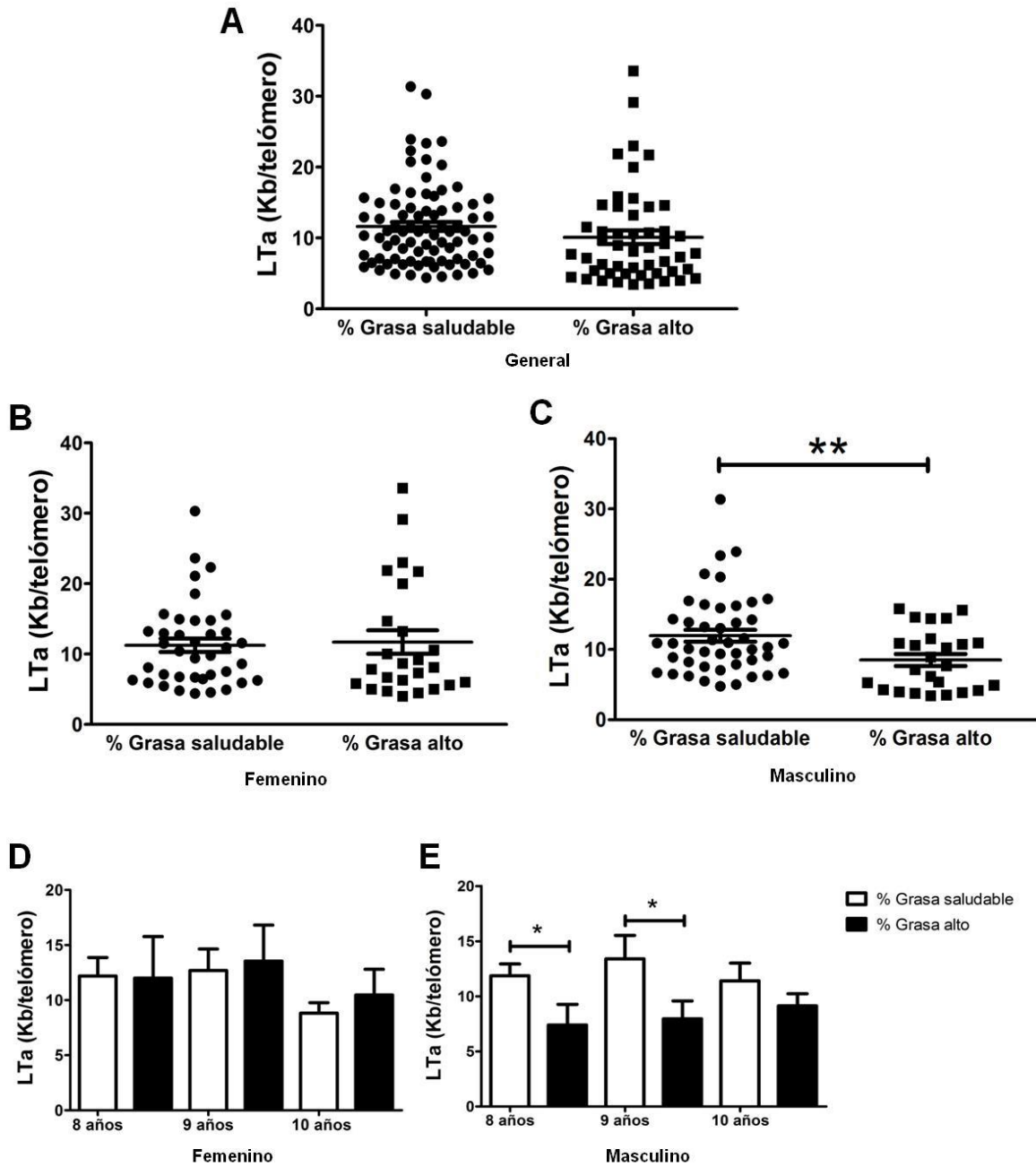
Estos resultados sugieren que el nivel de peso no tiene un efecto sobre la LTa. De manera similar, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de pacientes clasificados de acuerdo a la edad (11.24 Kb/telómero  $\pm$  0.8329, 8 años, n=43 vs. 12.64 Kb/telómero  $\pm$  1.248, 9 años, n=33, p= 0.3370 y 11.24 Kb/telómero  $\pm$  0.8329, 8 años, n=43 vs. 10.03 Kb/telómero  $\pm$  0.7801, 10 años, n=58, p= 0.2975, y 12.64 Kb/telómero  $\pm$  1.248, 9 años, n=33 vs. 10.03 Kb/telómero  $\pm$  0.7801, 10 años n=58, p= 0.0652) (**Figura 18, panel C**) o el género (11.42 Kb/telómero  $\pm$  0.8629, femenino, n=64 vs. 10.73 Kb/telómero  $\pm$  0.6494, masculino, n=70, p= 0.5169) (**Figura 18, panel D**).



**Figura 18. No existe relación entre el nivel de peso, género o edad y la longitud de telómeros absoluta.** Longitud de telómeros absoluta de la muestra poblacional de acuerdo a su clasificación por nivel de peso, edad o género. A) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo a la clasificación de peso según los requerimientos del CDC. B) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo al nivel de peso. C) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo a la edad. D) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo al género. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar (prueba *t* de *student*) n=134.

## **El porcentaje de grasa corporal elevado afecta la longitud de telómeros absoluta solo en el sexo masculino**

El porcentaje de grasa corporal (%GC) es otro indicador utilizado para determinar el nivel de peso. No se observaron diferencias significativas en la LTA de la muestra poblacional entre los grupos de %GC saludable o %GC alto. Sin embargo, se identificó una marcada tendencia de telómeros más cortos en el grupo de niños con %GC alto en comparación con el grupo que tuvo %GC saludable (11.63 Kb/telómero  $\pm$  0.6281 saludable, n=84 vs. 10.10 Kb/telómero  $\pm$  0.9544 alto n=50, p= 0.1662) **(Figura 19, panel A)**. Debido a lo anterior, y a la evidencia reportada de que telómeros cortos en niños se han asociado al sexo masculino, decidimos analizar la LTA de acuerdo al %GC por género. Aunque no se observaron diferencias en la LTA de niñas con %GC saludable o %GC alto (11.24 Kb/telómero  $\pm$  0.9474 saludable, n=39 vs. 11.70 Kb/telómero  $\pm$  1.668 alto n= 25, p= 0.7996) **(Figura 19, panel B)**, de manera interesante se observó que la LTA de niños con %GC saludable fue significativamente mayor en comparación con la LTA de niños con %GC alto (11.963 Kb/telómero  $\pm$  0.8437 saludable, n= 45 vs. 8.502 Kb/telómero  $\pm$  0.8520 alto n= 25, p< 0.01) **(Figura 19, panel C)**. Además, el análisis de la LTA de acuerdo al %GC por edad reveló que la LTA es significativamente mayor en niños de 8 y 9 años de edad con %GC saludable en comparación con aquellos niños de la misma edad con %GC alto (11.86 Kb/telómero  $\pm$  1.074, 8 años saludable, n= 20 vs. 7.398 Kb/telómero  $\pm$  1.862, 8 años alto n= 7, p< 0.05 y 13.40 Kb/telómero  $\pm$  2.118, 9 años saludable, n= 8 vs. 7.954 Kb/telómero  $\pm$  1.622, 9 años alto n= 3, p< 0.05) **(Figura 19, panel E)**. Este fenómeno no se observó en el sexo femenino a ninguna edad **(Figura 19, panel D)**.

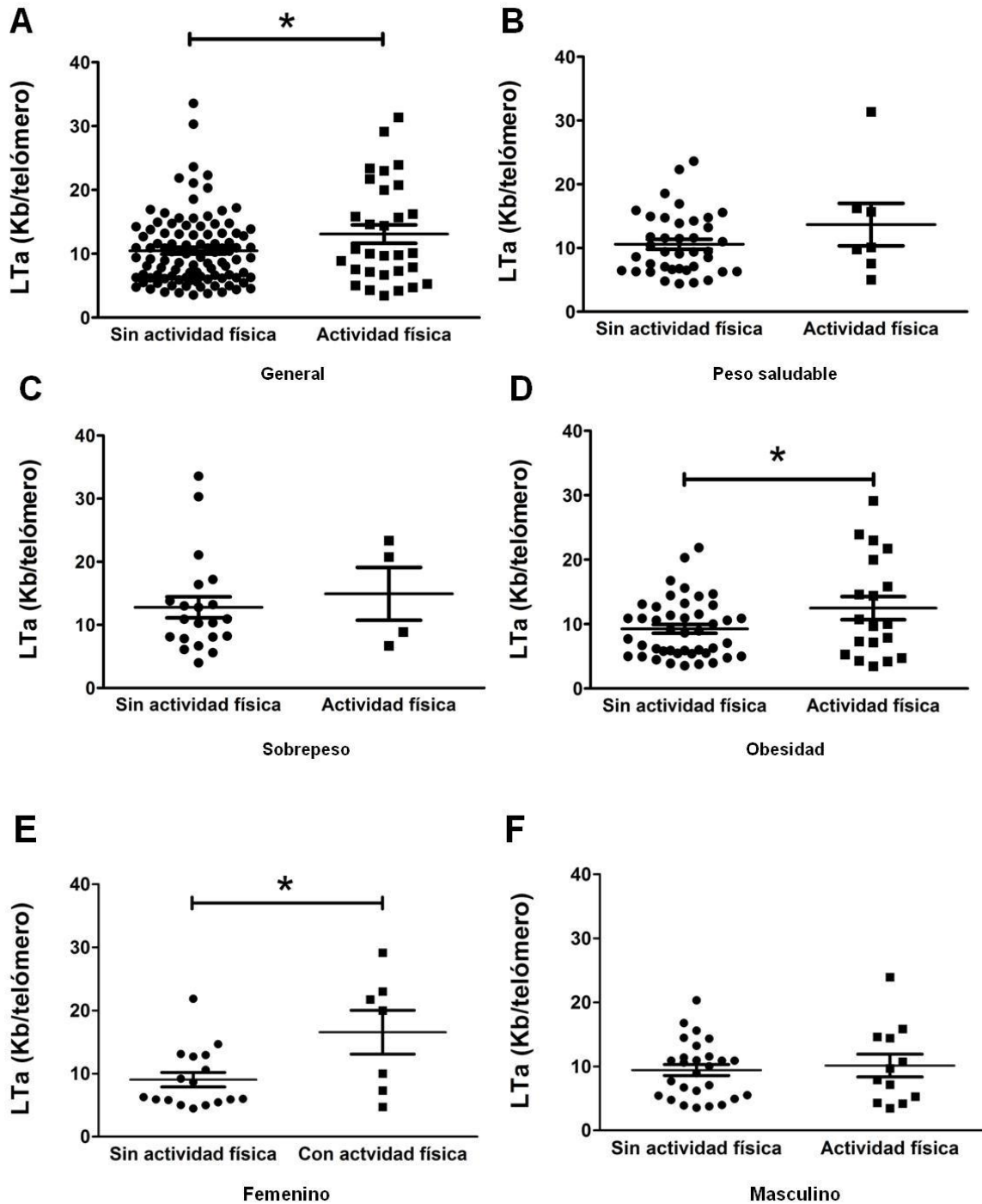


**Figura 19. El porcentaje de grasa corporal elevado afecta la longitud de telómeros absoluta solo en el sexo masculino.** Longitud de telómeros absoluta de la muestra poblacional de acuerdo a su clasificación por el porcentaje de grasa corporal. A) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo a la clasificación por el porcentaje de grasa corporal de la muestra poblacional. B) y C) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo a su clasificación por el porcentaje de grasa corporal en el sexo femenino (B) o masculino (C). D) y E) Longitud de telómeros absoluta por telómero de acuerdo a su clasificación por el porcentaje de grasa corporal, edad y sexo femenino (D) o masculino (E). En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar,  $n=134$ . \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$ , \*\*\*  $p<0.001$  (prueba ANOVA de una vía y  $t$  de student).

## **La actividad física previene el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños**

La actividad física regular provoca una disminución del porcentaje de grasa corporal, y en consecuencia tiene un efecto sobre el peso, por lo cual se analizó la relación entre la actividad física y la LTA en la población de estudio. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de niños que realizan actividad física (AF) y aquellos que no la realizan (SAF), siendo la LTA mayor en aquellos individuos que realizan de manera regular AF en comparación con los individuos SAF (10.47 Kb/telómero  $\pm$  0.5377 SAF n= 104 vs. 13.09 Kb/telómero  $\pm$  1.438 AF n= 30,  $p < 0.05$ ) (**Figura 20, panel A**).

Posteriormente, se comparó la LTA de acuerdo al diagnóstico de peso (CDC) en los grupos de niños que realizan AF o SAF. No se encontraron diferencias entre los niños con AF o SAF diagnosticados con peso saludable u obesidad (**Figura 20, panel B y C**), pero se encontró que en niños diagnosticados con obesidad, la LTA fue significativamente mayor en aquellos que realizaban AF con respecto a los del grupo SAF (9.26 Kb/telómero  $\pm$  0.6811 SAF n= 44 vs. 12.49 Kb/telómero  $\pm$  1.795 AF n= 19,  $p < 0.05$ ) (**Figura 20, panel D**). Además, este fenómeno fue exclusivo del sexo femenino (9.02 Kb/telómero  $\pm$  1.145, obesidad SAF n= 17 vs. 16.55 Kb/telómero  $\pm$  3.472, obesidad AF n= 7,  $p < 0.05$ ) (**Figura 20, panel E**) y no se presentó en individuos del sexo masculino (**Figura 20, panel F**). En conjunto estos resultados sugieren que la actividad física juega un papel importante en el mantenimiento de la LTA, previniendo el acortamiento telomérico, y este efecto protector se observa en niñas aún con diagnóstico de obesidad.

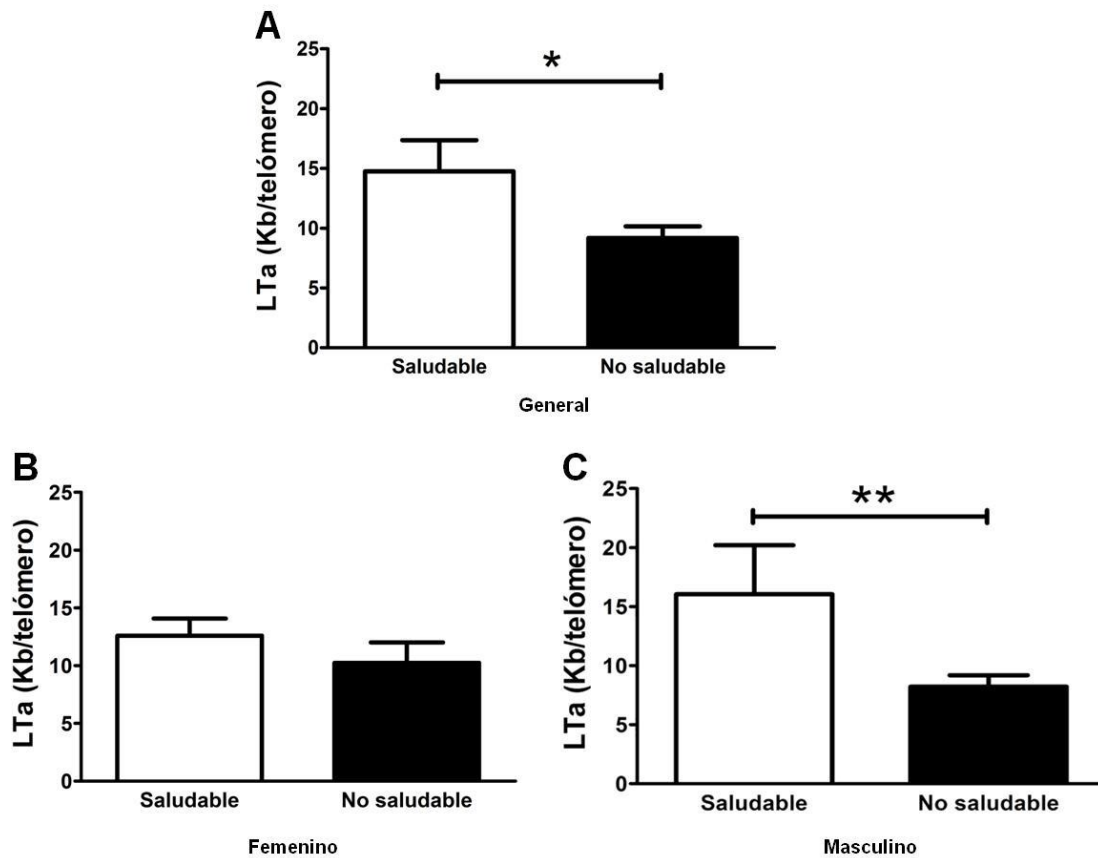


**Figura 20.** La actividad física previene el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños. Longitud de telómeros absoluta de la muestra poblacional de acuerdo a la actividad física. A) Longitud de telómeros absoluta por telómero en niños que realizan (AF) o no (SAF) actividad física. B) Longitud de telómeros absoluta por telómero en niños con peso saludable que realizan (AF) o no (SAF) actividad física. C) Longitud de telómeros absoluta por telómero en niños con sobrepeso que realizan (AF) o no (SAF) actividad física. D) Longitud de telómeros absoluta por telómero en niños con obesidad que realizan (AF) o no (SAF) actividad física. E) Longitud de telómeros absoluta por telómero en niños del sexo femenino que realizan (AF) o no (SAF) actividad física. F) Longitud de telómeros absoluta por telómero en niños del sexo masculino que realizan (AF) o no (SAF) actividad física. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar,  $n=134$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (prueba *t* de *student*).

## **En conjunto, la actividad física y el porcentaje de grasa corporal saludable previenen el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños**

Dado que nuestros resultados mostraron que el porcentaje de grasa corporal y la actividad física ejercen efectos la LTA de manera independiente, como siguiente objetivo, nos propusimos determinar si en conjunto podrían incrementar tales efectos. Para evaluar lo anterior se formaron dos grupos: un grupo denominado “*saludable*”, que incluyó niños de ambos sexos con diagnóstico de peso saludable, con un %GC también saludable y que además, realizaban AF, y un segundo grupo etiquetado como “*no saludable*” que incluyó niños de ambos sexos con diagnóstico de peso alto, con un %GC alto y SAF. Los resultados de este análisis mostraron que la LTA de los niños del grupo “*saludable*” fue significativamente mayor en comparación con los niños del grupo “*no saludable*” (14.75 Kb/telómero  $\pm$  2.600 saludable n= 8 vs. 9.12 Kb/telómero  $\pm$  0.9829 no saludable n= 36, p< 0.05) (**Figura 21, panel A**).

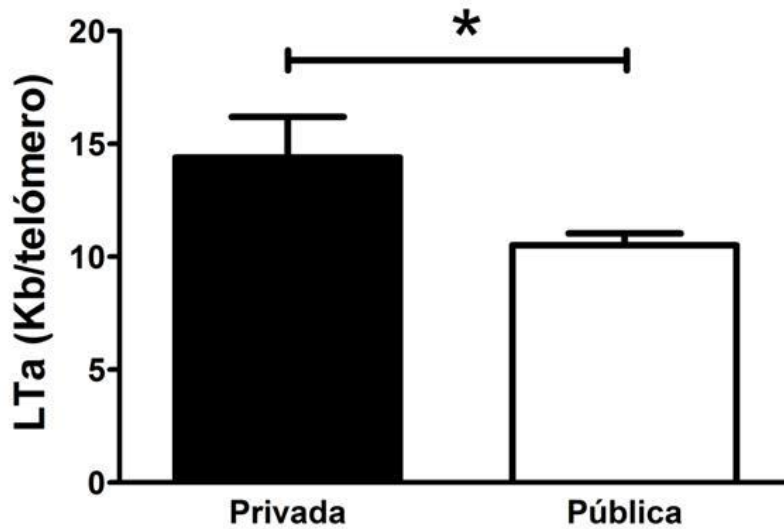
Posteriormente, se realizó el mismo análisis, clasificando además ambos grupos por género. Aunque se observó una tendencia de LTA mayor del grupo “*saludable*” en comparación con el grupo “*no saludable*” en el sexo femenino, esta tendencia no fue significativa (**Figura 21, panel B**). Sin embargo, encontramos que la LTA fue significativamente mayor en el grupo “*saludable*” versus el grupo “*no saludable*” para el sexo masculino (16.05 Kb/telómero  $\pm$  2.142 saludable n= 5 vs. 8.214 Kb/telómero  $\pm$  0.9782 no saludable n= 19, p< 0.01) (**Figura 21, panel C**). Además, la diferencia en la LTA entre ambos grupos para el sexo masculino fue de aproximadamente 8 Kb/telómero. Estos resultados sugieren que la actividad física y el porcentaje de grasa corporal saludable tienen un efecto sinérgico, previendo el acortamiento de la LTA en niños.



**Figura 21. En conjunto, la actividad física y el porcentaje de grasa corporal saludable previenen el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños.** Longitud de telómeros absoluta de la muestra poblacional de acuerdo al porcentaje de grasa corporal, nivel de peso y actividad física en conjunto. Niños de ambos sexos con nivel de peso saludable, porcentaje de grasa corporal saludable y que realizan actividad física fueron clasificados como “*saludables*” y niños con nivel de peso alto, porcentaje de grasa corporal alto y que no realizan actividad física fueron clasificados como “*no saludables*”. En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar,  $n=134$ . \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$ , \*\*\*  $p<0.001$  (prueba *t* de student).

## Existe una relación entre la longitud de telómeros absoluta y el tipo de escuela al que asisten los niños

Dentro de los parámetros cualitativos de la población que permitieron evaluar si el contexto cultural y socioeconómico en el cual se desarrollan los niños influye en la LTa, se consideró el tipo de escuela al que estos asisten. Para este fin se comparó la LTa de los niños inscritos en escuela privada con respecto a los niños inscritos en escuela pública. De manera interesante, se observó que la LTa de los niños que estudian en escuela privada es significativamente mayor en comparación con los niños que estudian en escuela pública (14.40 Kb/telómero  $\pm$  1.798 privada n= 19 vs. 10.51 Kb/telómero  $\pm$  0.5314 pública n= 115,  $p < 0.05$ ) (**Figura 22**).



**Figura 22.** Existe una relación entre la longitud de telómeros absoluta y el tipo de escuela al que asisten los niños. Longitud de telómeros absoluta de la muestra poblacional de acuerdo al tipo de escuela al que asisten los niños (privada o pública). En las gráficas se muestran las medias  $\pm$  error estándar, n=134. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (prueba *t* de student).



## VIII. DISCUSIÓN

---

La obesidad es uno de los problemas de salud más importantes a nivel mundial, principalmente en la población mexicana, por lo cual es necesario desarrollar nuevas herramientas que permitan ampliar el conocimiento sobre las consecuencias asociadas a esta enfermedad e implementar mejores estrategias que permitan disminuir su prevalencia. En el presente trabajo, corroboramos la utilidad de la qPCR en el estudio de la obesidad. Se logró optimizar un protocolo reproducible para medir la longitud absoluta de telómeros a partir de células salivales de niños menores de 10 años. Los rangos de longitud telomérica absoluta obtenidos en la muestra poblacional (3.44–33.57 Kb/telómero), coinciden con los rangos de longitud telomérica reportados en otros estudios realizados en niños con métodos de medición distintos (Zannolli *et al.*, 2008; Al-Attas *et al.*, 2010; Buxton *et al.*, 2011), lo cual indica que el protocolo por qPCR optimizado es confiable.

Experimentos llevados a cabo en diversos tipos de células cultivadas *in vitro*, han mostrado que el daño al ADN causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno, especialmente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), resulta en senescencia celular prematura inducida por el acortamiento acelerado de los telómeros (Bodnar *et al.* 1998; Campisi, 2005; Herbert *et al.*, 2008). La validación *in vitro* del protocolo por qPCR permitió corroborar estos datos, ya que en células cultivadas, se observó que el proceso de senescencia se produce en función de su número de divisiones y en respuesta al tratamiento con  $H_2O_2$ . Estas células senescentes tuvieron una longitud telomérica absoluta significativamente menor en comparación con aquellas células que no eran senescentes (Figura 16). La asociación de senescencia y acortamiento telomérico como consecuencia del estrés oxidativo se ha documentado también *in vivo*. Jurk y colaboradores demostraron que la inflamación crónica sistémica puede acelerar el envejecimiento en ratones, a través de la exacerbación de la disfunción de los telómeros y la senescencia celular mediada por las especies reactivas de oxígeno, en ausencia de cualquier otro factor genético o ambiental (Jurk *et al.*, 2014). En este sentido, quedan pendientes por realizar otros análisis que permitan demostrar que la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad, es la causa subyacente del acortamiento telomérico mediado por las especies reactivas de oxígeno en humanos.

Los resultados epidemiológicos de la muestra poblacional revelaron una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 66.4%. Esta cifra refleja la problemática nacional de obesidad que posiciona a México como el primer lugar en obesidad infantil a nivel mundial (UNICEF, 2015). Por otro lado, estos resultados mostraron que en la muestra poblacional estudiada, el sobrepeso y la obesidad prevalecen mayormente en el sexo masculino (prevalencia combinada de 39.5%) en comparación con el femenino (prevalencia combinada de 26.8%) (Figura 17), lo cual corrobora los datos de la ENSANUT 2012, que reportó prevalencias combinadas de 36.9% y 32% respectivamente para niños de 5-11 años de edad. La alta prevalencia de sobrepeso y obesidad es preocupante por los efectos adversos del exceso de peso en la salud, un problema de tal magnitud demanda acciones inmediatas para detener su avance. Una de las principales causas del desarrollo de sobrepeso y obesidad es la disminución o ausencia de actividad física (Lau *et al.*, 2017). Los resultados de presente estudio mostraron que el 77.6% de la población no realiza actividad física y el 76.11% pasa más de tres horas diarias viendo televisión o jugando videojuegos, corroborando los datos reportados por la ENSANUT de Medio Camino 2016, que indican una prevalencia de 82.8% y 71.7% respectivamente.

El análisis de la longitud telomérica absoluta en relación con la obesidad, mostró que telómeros más cortos se asocian al porcentaje de grasa corporal y no al nivel de peso en infantes del sexo masculino, principalmente a los 8 y 9 años de edad (Figura 19). Buxton y colaboradores demostraron una correlación entre la obesidad infantil y telómeros cortos en población francesa (Buxton *et al.*, 2011), mientras que Al-Attas y colaboradores demostraron la misma correlación solo en niños árabes del sexo masculino (Al-Attas *et al.*, 2010). Aunque en ambos casos esta correlación se basó en el diagnóstico de obesidad de acuerdo al nivel de peso, en ninguno de los estudios anteriores se midió el porcentaje de grasa corporal. El índice de masa corporal (IMC) es definido por la OMS como el parámetro estándar para el diagnóstico de obesidad y sobrepeso, sin embargo, la exactitud del IMC para estimar la composición corporal es discutible (Roubenoff *et al.*, 1995; Revicki e Israel, 1986), especialmente el grado de adiposidad. Es así como individuos diagnosticados con peso saludable según su IMC, pueden tener un porcentaje de grasa corporal elevado, mientras que otros diagnosticados con obesidad pueden tener un porcentaje de grasa corporal dentro de los límites establecidos. Esto es especialmente importante al considerar el diagnóstico de sobrepeso y obesidad infantil, ya que en los niños los patrones de crecimiento son diferentes a los de personas adultas (CDC, 2015), lo cual indica que su composición corporal también es diferente, variando de acuerdo a la raza, sexo y edad. La cantidad de tejido adiposo está en función del número y tamaño de sus células. Estos parámetros varían durante el crecimiento; el tamaño de las células

del tejido adiposo permanece relativamente estable hasta la adolescencia, mientras que el número aumenta paralelamente al crecimiento (Márquez y Garatachea, 2013). Por lo tanto, nuestros datos apoyan los resultados reportados por Buxton y Al-Attas, y aportan nueva evidencia científica sobre la relación existente entre la longitud absoluta de telómeros y la obesidad infantil masculina, basada en el porcentaje de grasa corporal. Así, este estudio puede contribuir a la futura inclusión del porcentaje de grasa corporal como otro parámetro estándar para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad infantil. Permanece por ser explicado el hecho de que este fenómeno no se presente en el sexo femenino, aunque es posible que estén involucrados procesos fisiológicos asociados a la entrada en la pubertad y a la capacidad biológica de las mujeres para almacenar más grasa corporal de forma natural, lo cual puede brindarles mayor tolerancia a algunos efectos nocivos desarrollados durante el proceso de obesidad.

La actividad física es un importante determinante del peso corporal (WHO, 2003). La actividad física favorece la disminución del porcentaje de grasa corporal y el aumento del peso libre de grasa (Márquez y Garatachea, 2013). La mayoría de los estudios epidemiológicos muestran un menor riesgo de aumento de peso, sobrepeso y obesidad entre las personas que realizan regularmente ejercicio físico de intensidad moderada a alta (Fogelholm *et al.*, 2000). Nuestros resultados muestran que la actividad física en niños previene el acortamiento de los telómeros, dado que telómeros significativamente más cortos se asociaron a niños inactivos físicamente (Figura 20). Además, este efecto protector se observó también en aquellos niños diagnosticados con obesidad que realizan actividad física regular. Estos datos corroboran la relación directa entre el porcentaje de grasa corporal y la actividad física, soportado por la evidencia proporcionada en este estudio, que muestra que niños con peso saludable, porcentaje de grasa saludable y que realizan actividad física tienen una longitud de telómeros absoluta significativamente mayor que aquellos niños con peso alto, porcentaje de grasa corporal alto y que no realizan actividad física (Figura 21).

Existe un consenso generalizado entre los especialistas de que la actividad física es necesaria para el crecimiento armónico y desarrollo integral del niño, ya que puede contribuir al desarrollo social de los niños y jóvenes, dándoles la oportunidad de expresarse, fomentando la autoconfianza, la interacción social y la integración, además, disminuye los niveles de estrés (OMS, 2010). Esto podría explicar el hecho de que niños inscritos en escuelas privadas tengan una longitud telomérica absoluta significativamente mayor que aquellos que asisten a escuelas públicas (Figura 22). Se sabe que los programas de escuelas privadas fomentan en mayor medida la activación física y la inclusión de sus estudiantes en deportes en equipo, así como su participación en torneos bien estructurados. En este

sentido, Mitchell y colaboradores demostraron que la exposición a entornos desfavorables en la infancia se asocia con acortamiento en la longitud de los telómeros (Mitchell et al., 2014), y otros estudios han revelado una correlación negativa entre la longitud de los telómeros y el estrés crónico (Shalev, *et al.* 2012). Sin embargo, las preguntas permanecen alrededor de los mecanismos moleculares y eventos biológicos mediante los cuales el entorno conduce a la erosión de los telómeros durante la infancia.

Los resultados de este estudio sustentan la hipótesis de que existe una relación directa entre la obesidad infantil y el acortamiento telomérico, al menos en el sexo masculino, basados en el diagnóstico de obesidad con respecto al índice de masa corporal y al porcentaje de grasa corporal; así mismo en células en cultivo, el acortamiento telomérico se asocia a la presencia de especies reactivas de oxígeno, resultando en senescencia celular. Estudios realizados en adultos han propuesto a la inflamación y el estrés oxidativo como los mecanismos subyacentes que asocian la obesidad con telómeros cortos, y de hecho, este acortamiento también correlaciona con un aumento de la morbilidad y envejecimiento prematuro en ciertos pacientes (Valdes *et al.*, 2005; Aulinas *et al.*, 2015). Por lo cuál, es lógico pensar que estas consecuencias podrían presentarse también en niños. Además, evidenciamos el papel protector de la actividad física en la longitud de los telómeros y la utilidad del porcentaje de grasa corporal como herramienta de diagnóstico útil para la obesidad. Dadas las graves consecuencias a la salud que acarrea el exceso de peso en la población mexicana es imprescindible enfatizar y sostener acciones de activación física y educación nutricional que permitan mantener un peso saludable desde edades tempranas.

# IX. CONCLUSIONES

---

- Se optimizó un protocolo por qPCR reproducible y confiable para medir la longitud de telómeros absoluta a partir de ADN aislado de células salivales y se validó en un modelo de senescencia celular inducida *in vitro*.
- Se demostró que células HEK293 senescentes tienen telómeros más cortos en función de su número de divisiones y a la presencia de especies reactivas de oxígeno.
- Existe una relación directa entre el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta y el porcentaje de grasa corporal alto en pacientes de ocho y nueve años de edad del sexo masculino. Esta relación no es evidente en el sexo femenino.
- La actividad física tiene un efecto protector en la longitud de telómeros absoluta, aún en presencia de obesidad.
- La actividad física y el porcentaje de grasa corporal saludable actúan en conjunto y previenen el acortamiento de la longitud de telómeros absoluta en niños del sexo masculino.
- La medición del porcentaje de grasa corporal es una herramienta útil en el diagnóstico de obesidad en la población infantil mexicana.

# X. ANEXOS

## Anexo 1. Consentimiento informado para niños



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN  
Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO (NIÑOS)

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio: **“Determinación de la relación entre la longitud de los telómeros y la obesidad en niños mexicanos”**

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Vamos a realizar un estudio para saber cuántos kilos pesas y cuantos centímetros mides, después a tus papas les aplicaremos un cuestionario muy fácil sobre algunos aspectos sociales y económicos de tu vida y también algunas preguntas de tu familia, para saber si todos se llevan bien o se llevan mal. Te pedimos que nos ayudes, porque es muy importante saber cómo se llevan los papas y los hijos.

Si aceptas estar en nuestro estudio, entonces te pesaremos en una báscula, te mediremos para saber tu estatura, y determinaremos también tu porcentaje de grasa corporal, todo esto para saber cuál es tu estado nutricional. Queremos saber si tu peso y tu talla están bien. Además, te pedimos nos regales una muestra de saliva, la cual usaremos para realizar estudios posteriores con tu ADN.

Puedes hacer preguntas las veces que quieras en cualquier momento del estudio. Además, si decides que no quieres terminar el estudio, puedes parar cuando quieras. Nadie puede enojarse o enfadarse contigo si decides que no quieres continuar en el estudio.

Toda información obtenida será confidencial, esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas, se le informará a tus padres y a ti los resultados, y en caso de existir alguna anomalía se te brindará atención médica y tratamiento adecuado. Los resultados solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio. Si firmas este papel quiere decir que lo leíste, o alguien te lo leyó y que quieres estar en el estudio. Si no quieres estar en el estudio, no lo firmes. Recuerda que tú decides estar en el estudio y nadie se puede enojar contigo.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante del estudio

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador

Fecha \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Consentimiento informado para padres



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**UNIDAD DE EDUCACION, INVESTIGACION Y POLITICAS**  
**DE SALUD**  
**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**  
**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**  
**(NIÑOS Y PERSONAS CON DISCAPACIDAD)**



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:

"Determinación de la relación entre la longitud de los telómeros y la obesidad en niños mexicanos"

Patrocinador externo (si aplica):

HGR MF-1 CUERNAVACA, MORELOS; A

DE 2016

Lugar y fecha:

Número de registro:

Justificación y objetivo del estudio:

El acelerado incremento en la prevalencia de la obesidad infantil en los últimos años debe ser una preocupación prioritaria para la sociedad mexicana. El objetivo de este estudio es dilucidar la relación entre la longitud de los telómeros y la obesidad a temprana edad, así como también, determinar si dicha relación tiene un impacto potencialmente nocivo sobre el futuro de la salud. De esta manera, podríamos tener nuevas evidencias y herramientas que nos ayuden a crear conciencia para combatir este grave problema de dimensión mundial y prevenir los diversos padecimientos asociados a ella en la edad adulta, así como el posible envejecimiento celular prematuro desarrollado desde la infancia.

Procedimientos:

El estudio se realizará a niños de 8 a 10 años que acudan a la consulta externa del HGR MF-1 de Cuernavaca, acompañados de algún tutor, al cual se le aplicará un instrumento de recolección de datos, posteriormente se realizará somatometría a cada niño y por último se tomará una muestra de saliva para el aislamiento de ADN.

Estudio de riesgo mínimo, sin molestias.

Posibles riesgos y molestias:  
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:

Participación o retiro:

El paciente tiene el derecho de retirarse del estudio cuando así lo considere

Privacidad y confidencialidad:

Se establece el compromiso de no identificar al participante en presentaciones o publicaciones que se deriven de este estudio y de mantener la confidencialidad de la información.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

No autoriza que se tome la muestra.

Si autoriza que se tome la muestra solo para este estudio.

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):  
Beneficios al término del estudio:

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:  
Investigador Responsable:  
Colaboradores:

Dra. Leonor Pérez Martínez, *Instituto de Biotecnología UNAM*, Teléfono 7773291777 Ext. 38310.  
Q.F.B. Roberto Carlos Licea Celudo, *estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM*, teléfono 7225559671, Dra. Mónica Viviana Martínez Martínez, *Profesor Titular de la Especialidad de Medicina Familiar*, Teléfono 7773155000 Ext 51315, HGR MF-1.



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores, México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: [comision.etica@imss.gob.mx](mailto:comision.etica@imss.gob.mx)

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de ambos padres o  
tutores o representante legal

Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma



### Anexo 3. Instrumento de recolección de datos

#### INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, COORDINACIÓN CLÍNICA DE  
EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2016

No. De folio \_\_\_\_\_

La información que nos proporcione sera estrictamente confidencial.

**Instrucciones:** Conteste correctamente las siguientes preguntas rellenando los espacios en blanco o marcando con una "X" según sea el caso.

#### I. FICHA DE IDENTIFICACIÓN DE LOS TUTORES DEL PACIENTE:

##### I.1 MADRE

- Consentimiento informado de participación voluntaria SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

1.- Nombre completo: \_\_\_\_\_

2.- Ocupación actual: \_\_\_\_\_ 3.- Edad: \_\_\_\_\_

4.- Escolaridad:

Primaria	
Secundaria	
Bachillerato	
Universidad	
Posgrado	

5.- Estado Civil:

Casada	
Soltera	
Unión libre	
Divorciada	
Viuda	

6.- Enfermedades de importancia:

a) SI \_\_\_\_ b) NO \_\_\_\_

##### I.2 PADRE

7.- Nombre completo: \_\_\_\_\_

8.- Ocupación actual: \_\_\_\_\_ 9.- Edad: \_\_\_\_\_

10.- Escolaridad:

Primaria	
Secundaria	
Bachillerato	
Universidad	
Posgrado	

11.- Estado Civil :

Casado	
Soltero	
Unión libre	
Divorciado	
Viudo	

12.- Enfermedades de importancia: a) SI \_\_\_\_\_ b) NO \_\_\_\_\_

13.- Ingreso mensual total (incluyendo ingresos de la pareja, ingresos extra, becas, pensiones, apoyos gubernamentales, etc):

Menor de \$3000 \_\_\_\_\_ Entre \$3001-4500 \_\_\_\_\_  
Entre \$4501-6000 \_\_\_\_\_ Mas de \$6000 \_\_\_\_\_

14.- En total ¿cuántas personas dependen económicamente (viven) del ingreso familiar?

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

15.- Tipo de familia:

Familia nuclear (formada solamente por padres e hijos) \_\_\_\_\_

Familia compuesta (derivada de otros matrimonios o uniones) \_\_\_\_\_

16.- Tipo de vivienda: Propia \_\_\_\_\_ Rentada \_\_\_\_\_

## II. FICHA DE IDENTIFICACIÓN DEL NIÑO(A)

-Asentimiento informado de participación voluntaria a) SI \_\_\_\_\_ b) NO \_\_\_\_\_

17.- Nombre del niño (a): \_\_\_\_\_

18.- NSS: \_\_\_\_\_

19.- Número de consultorio: \_\_\_\_\_ 20.- Turno:

a) Matutino	b) Vespertino
-------------	---------------

21.- Edad: a) 8 \_\_\_\_\_

b) 9 \_\_\_\_\_

c) 10 \_\_\_\_\_

22.- Sexo: a) Femenino \_\_\_\_\_ b) Masculino \_\_\_\_\_

### III. CARACTERISTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

23.- Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

24.- Lugar de residencia (calle, número, colonia, municipio, estado):  
\_\_\_\_\_

25.- Teléfono: \_\_\_\_\_

26.- Escolaridad: Primaria

1°	2°	3°	4°	5°	6°
----	----	----	----	----	----

27.- ¿Cuenta con todos los servicios intra y extradomiciliarios de urbanización?

a) SI                      b) NO

28.- Tipo de escuela a la que acude el infante:

Pública \_\_\_\_\_ Privada \_\_\_\_\_

### IV. ANTECEDENTES PERINATALES:

- 29.- Número de embarazo a) 1 b)2 c) 3 d)4 e) 5 f)6 g)7 h)8 i)9 j) 10
- 30.- Semanas de gestación a)36 b)37 c)38 d)39 e)40 f)41 g)42
- 31.- Tipo de nacimiento a) Cesárea \_\_\_\_\_ b) Parto \_\_\_\_\_
- 32.- ¿Cuanto pesó el niño(a) al nacer? a)2.5 kg – 3.0 kg b) 3.1kg – 3.5 kg  
c) 3.6 kg – 4.0 kg d)> 4.0 kg
- 33.- ¿Ameritó incubadora? a)SI b)NO
- 34.- Inicio de la ablactación: a) 6 meses b) 12 meses c) 18 meses
- 35.- Alimentación exclusiva del seno materno: a) SI \_\_\_\_\_ b) NO \_\_\_\_\_
- 36.- Duración de lactancia materna \_\_\_\_\_
- 37.- ¿Presentó diabetes gestacional (madre)? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_  
No sé \_\_\_\_\_
- 38.- Esquema de vacunación completo a) SI \_\_\_\_\_ b) NO \_\_\_\_\_

- 39.- ¿El niño(a) presentó enfermedades durante la infancia?  
 a) SI \_\_\_\_\_ b) NO \_\_\_\_\_

**V. HÁBITOS ALIMENTARIOS Y ACTIVIDAD FÍSICA DEL NIÑO(A)**

	HÁBITOS ALIMENTARIOS Y ACTIVIDAD FÍSICA (KRECE – PLUS)	SI	NO
40	Desayuna		
41	Desayuna un lácteo		
42	Desayuna cereal o un derivado		
43	Desayuna bollería industrial		
44	Toma una fruta o un zumo de fruta a diario		
45	Come una segunda fruta a diario		
46	Toma un segundo lácteo o derivado a diario		
47	Come verdura fresca o cocida una vez al día		
48	Come verdura fresca o cocida más de una vez al día.		
49	Acude más de una vez a la semana a la comida rápida		
50	Le gustan las legumbres		
51	Come dulces y frituras varias veces al día		
52	Come pasta o arroz casi a diario		
53	Utilizan aceite de oliva en casa		

- 54.- ¿Cuántas horas ve televisión o juega videojuegos el niño diariamente?

1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas	7 horas	8 horas	9 horas	10 horas
--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------

- 55.- ¿Cuántas horas dedica el niño(a) a actividades deportivas extraescolares semanalmente?

1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas	7 horas	8 horas	9 horas	10 horas
--------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	----------

- 56.- ¿El niño(a) realiza alguna actividad extraescolar cultural?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

## VI. SOMATOMETRÍA DEL PACIENTE (llenado por el investigador)

57.- Peso: \_\_\_\_\_ 58.- Talla: \_\_\_\_\_  
 59.- Percentil (CDC): \_\_\_\_\_ 60.- IMC: \_\_\_\_\_  
 61.- Estado nutricional \_\_\_\_\_ 62.- % grasa corporal \_\_\_\_\_

## VII CUESTIONARIO FACES III

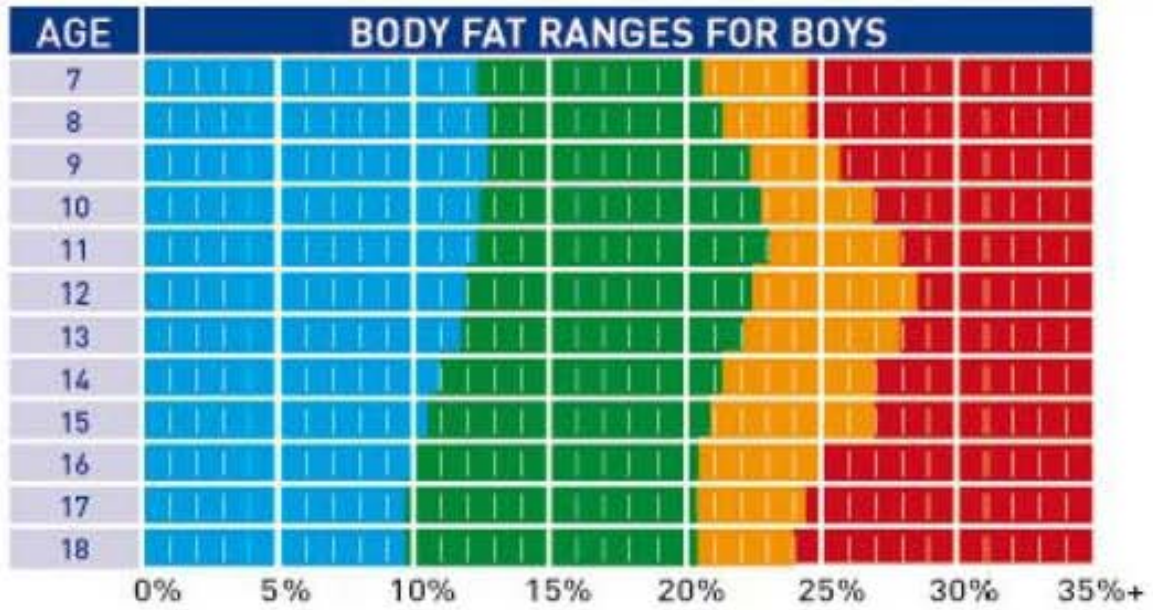
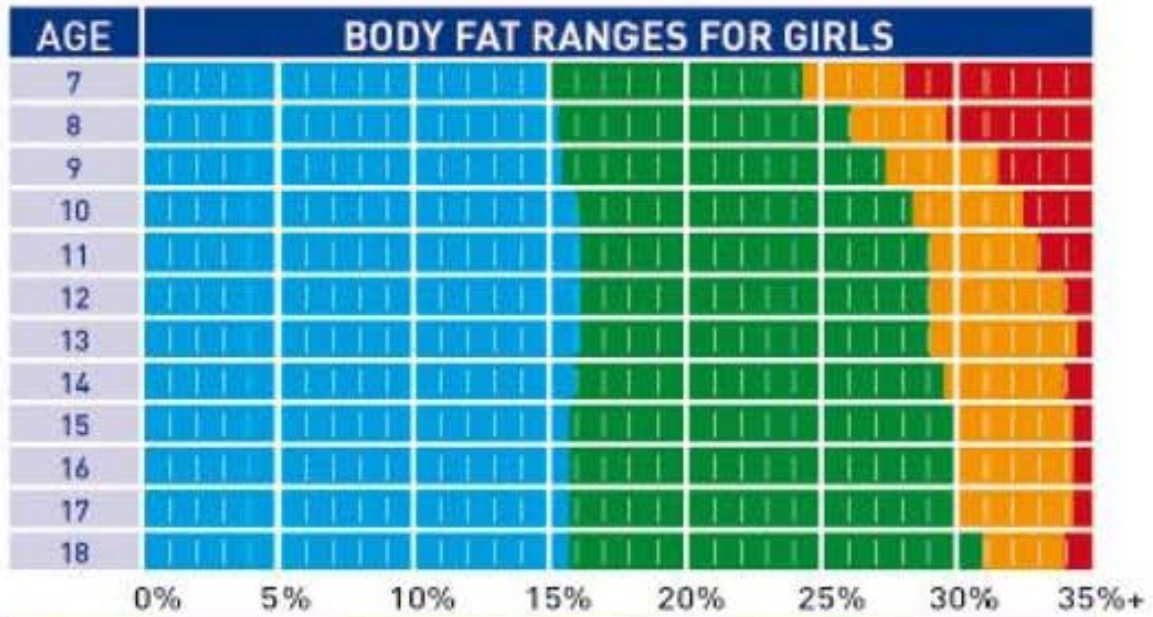
Instrucciones: Escriba en el espacio correspondiente a cada pregunta la respuesta que usted elija según el número indicado:

Nunca (1) Casi Nunca (2) Algunas veces (3) Casi siempre (4) Siempre (5)

No	DESCRIBA A SU FAMILIA	Nunca	Casi nunca	Algunas veces	Casi siempre	Siempre
1	Los miembros de nuestra familia se dan apoyo entre sí.					
2	En nuestra familia se toman en cuenta las sugerencias de los hijos para resolver los problemas.					
3	Aceptamos las amistades de los demás miembros de la familia.					
4	Los hijos pueden opinar en cuanto a su disciplina.					
5	Nos gusta convivir solamente con los familiares más cercanos.					
6	Cualquier miembro de la familia puede tomar la autoridad.					
7	Nos sentimos más unidos entre nosotros que con otras personas que no son de nuestra familia.					
8	Nuestra familia cambia el modo de hacer las cosas.					
9	Nos gusta pasar el tiempo libre en familia.					
10	Padres e hijos se ponen de acuerdo en relación con los castigos.					
11	Nos sentimos muy unidos.					
12	Cuando se toma una decisión importante, toda la familia está presente.					
13	Cuando nuestra familia se reúne para hacer algo no falta nadie.					
14	En nuestra familia las reglas cambian.					
15	Con facilidad podemos planear actividades en la familia.					
16	Intercambiamos los quehaceres del hogar entre nosotros.					
17	Consultamos unos con otros para tomar decisiones.					
18	En nuestra familia es difícil identificar quien tiene la autoridad.					
19	La unión familiar es muy importante.					
20	Es difícil decir quien hace las labores del hogar.					









# XI. BIBLIOGRAFÍA

---

- Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T. *et al.* 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*. 15(8):978–990.
- Ahima RS. 2009. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat. Med.* 9:996–997.
- Al-Attas OS, Al-Daghri N, Bamakhramah A, Shaun Sabico S, McTernan P, Huang TTK. 2010. Telomere length in relation to insulin resistance inflammation and obesity among Arab youth. *Acta Pædiatr.* 99:896–899.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barret JC. 1996. Involvement of the cyclindependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 93: 13742-1374.
- Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. 2007. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 356: 1317-1326.
- Armanios M. 2009. Syndromes of Telomere Shortening. *Annual review of genomics and human genetics*. 10:45.
- Artandi SE, Alson S, Tietze MK, Sharpless NE, Ye S, Greenberg RA, Castrillon DH, Horner JW, Weiler SR, Carrasco RD, DePinho RA. 2002. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8191–8196.
- Aubert G, Lansdorp PM. 2008. Telomeres and aging. *Physiological Reviews*. 88:557–579.
- Aulinas A, Ramírez MJ, Barahona MJ, Valassi E, Resmini E, Mato E, Santos A, Crespo I, Bell O, Surrallés J, Webb S. 2015. Dyslipidemia and Chronic Inflammation Markers Are Correlated with Telomere Length Shortening in Cushing’s Syndrome. *PLoS ONE* 10(3): e0120185.doi:10.1371/journal.pone.0120185
- Aviv A, Valdes AM, Spector TD. 2006. Human telomere biology: the pitfalls of moving from the laboratory to epidemiology. *Int J Epidemiol.* 35:1424–1429.
- Barlow SE and the Expert Committee Pediatrics. 2007. Expert Committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: Summary report *Pediatrics*. 120; 164–192.
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22: 4212-4222.
- Blackburn EH, Gall JG. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol.* 120:33–53.

- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. 2006. Telomeres and telomerase: The path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*. 12:1133–1138.
- Blasco MA, Funk W, Villaponteau B, Greider CW. 1995. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA component. *Science*. 269: 1267-1270.
- Blasco MA, Lee HW, Hande P, Samper E, Lansdorp P, DePinho RA, Greider CW. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 91: 25-34.
- Blasco MA. 2005. Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO J* 24:1095–1103
- Blasco MA. 2007. The Epigenetic Regulation of Mammalian Telomeres. *Nature Reviews Genetics*. 8: 299-309
- 
- Bleich S, Cutler D, Murray C, Adams A. 2008. Why is the developed world obese? *Annu. Rev. Public Health* 29, 273–295.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, *et al.* 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279:349–352.
- Bull C, Fenech M. 2008. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. *Proc. Nutr. Soc.* 67, 146–156.
- Bull CF, O'Callaghan NJ, Mayrhofer G, Fenech MF. 2009. Telomere length in lymphocytes of older South Australian men may be inversely associated with plasma homocysteine. *Rejuvenation Res.* 12,341–349.
- Buxton JL, Walters RG, Visvikis-Siest S, Meyre D, Froguel P, Blakemore AI. 2011. Childhood obesity is associated with shorter leukocyte telomere length. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 1500–5.
- Campisi J. 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*. 14:183-8
- Campisi J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120:513–22.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna. 2007. F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:729–40.
- Cassidy A, De Vivo I, Liu Y, Han J, Prescott J, Hunter DJ, Rimm EB. 2010. Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 1273–1280.
- Cawthon RM. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30(10):e47.
- Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*, 361, 393–395.
- Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre E, Bacou F, Penicaud L, *et al.* 2003. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 278:9850-5.

- Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR, Chavakis T. 2012 Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia*. 55(10):2583-92.
- Chen LY, Liu D, Songyang Z. 2007. Telomere maintenance through spatial control of telomeric proteins. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5898–5909.
- Chen Y, Yang Y, van Overbeek M, Donigian JR, Baciu P, de Lange T, Lei M. 2008. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science* 319, 1092–1096.
- Chen M, McLeskey SW. 2010. Telomere-based cancer treatment: Emerging targeted therapies. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 14:720–726.
- Collins K, Mitchell JR. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21: 564–579.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194–198
- Danese A, McEwen BS. 2011. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. *Physiol Behav.* 106:29–39.
- de Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19:2100–2110.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363–9367.
- El-Deiry, W. S. 1998. P21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:121-137.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf> Consultado el 12 de abril de 2015.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. 2004 Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:17312–17315
- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. 2007. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol.* 165:14–21.
- Flores I, Cayuela ML, Blasco MA. 2005. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309:1253–1256.
- Fogelholm M, Kukkonen-Harjula K. 2000. Does physical activity prevent weight gain - a systematic review. *Obesity Reviews.* 1:95-111.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761.
- Gall JG. Beginning of the end: origins of the telomere concept. 1995. In: Blackburn EH, Greider CW, editors. *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview, NY. pp. 1–10.

- Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, Lu X, Berenson GS, Aviv A. 2005 Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation*. 111:2171–2177
- Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, Austad SN, Venditti C, Pagel M, Shay JW, Wright WE. 2011. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*. 10;761–768.
- González-Suárez E, Samper E, Flores J M, Blasco M A. 2000. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nature Genetics*. 26: 114-117.
- Gonzalez-Suarez E, Samper E, Ramirez A, Flores JM, Martin-Caballero J, Jorcano JL, Blasco MA. 2001. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J* 20: 2619–2630.
- Greider CW, Blackburn EH. 1996. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci. Am.*, 274, 92–97.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503–514
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 345:458–460.
- Herbert KE, Mistry Y, Hastings R, Poolman T, Niklason L, Williams B. 2008. Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and independent pathways. *Circ Res* 102:201–208.
- Herrera E, Samper E, Martin-Caballero J, Flores JM, Lee HW, Blasco MA. 1999. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J* 18: 2950–2960.
- James C, Iwasiow RM, Birnboim HC. 2011. Human genomic DNA content of saliva samples collected with Oragene self-collection kit. Disponible en [www.DNAgenotek.com](http://www.DNAgenotek.com) Consultado el 27 de abril de 2015.
- Jurk D, Wilson C, Passos JF, Oakley F, Correia-Melo C, Greaves L, Saretzki G, Fox C, Lawless C, Anderson R, Hewitt G, Pender SL, Fullard N, Nelson G, Mann J, van de Sluis B, Mann DA, von Zglinicki T. 2014 Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat. Commun.* 2, 4172.
- Kawanishi S, Oikawa S. 2004. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1019:278–284.
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J. 2002. Telomeres, aging and cancer: In search of happy ending. *Oncogene*. 21:503-11.
- Kim SH, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J. 2004. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J. Biol. Chem.* 279, 43799–43804.
- Kim S, Parks CG, DeRoo LA, Chen H, Taylor JA, Cawthon RM, Sandler DP. 2009 Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:816–820.

- Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P, Prescott DM. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proceedings of the National Academy of Science*. 78:3015–3019.
- Lau DC, Douketis JD, Morrison KM, Hramiak IM, Sharma AM, Ur E. 2007. 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary]. *CMAJ* 176, S1–S13.
- Le Peuch C, Dorée M. 2000. Le temps du cycle cellulaire. *Med. Sci.* 16: 461-468.
- Lee HJ, Choi JH, Jung J, Kim JK, Lee SS, Kim GJ. 2014. Changes in PTTG1 by human TERT gene expression modulate the self-renewal of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Cell and Tissue Research*. 357(1):145–157.
- León-Pedroza JI, González-Tapia LA, Del Olmo-Gil E, et al. 2015. Lowgrade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: from the molecular evidence to the clinical practice, *Cir Cir*, 81;1-9.
- Leulier F, Lemaitre B. 2008. Toll-like receptors - taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genetics*. 9(3):165-78.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. 2013. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 22:139239.
- Manson JE et al. 1995. Body weight and mortality among women. *New England Journal of Medicine*. 333:677-685.
- Márquez S, Garatachea N. *Actividad física y salud*. 2013. Primera edición. Albasanz: Madrid.
- Martínez P, Blasco MA. 2010. Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell* 9, 653–666.
- Mitchell JR, Wood E, Collins K. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 402: 551-555.
- Mitchell C, Hobcraft J, McLanahan SS, Siegel SR, Berg A, Brooks-Gunn J, Garfinkel I, Notterman D. 2014. Social disadvantage, genetic sensitivity, and children's telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111:5944–5949.
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. 2008. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res*. 49(7):1562-8.
- Nussey DH, Baird D, Barrett E, Boner W, Fairlie J, Gemmell N, Hartmann N, Horn T, Hausmann M, Olsson M, et al. 2014. Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods Ecol Evol* 5:299–310.
- O'Callaghan NJ, Fenech M. 2011 A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 13:3.
- O'Sullivan RJ and Karlseder J. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 11, 171–181.
- Oeseburg H, Iusuf D, van der Harst P, van Gilst WH, Henning RH, Roks AJ. 2009. Bradykinin protects against oxidative stress induced endothelial cell senescence. *Hypertension* 53:417–422

- Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. 2010. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch.* 459, 259–268.
- Reddel RR, Bryan TM. 2003. Alternative lengthening of telomeres: dangerous road less travelled. *Lancet*, 361, 1840–1841.
- Russell SJ, Kahn CR. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:681–691.
- Sarin KY, Cheung P, Gilson D, Lee E, Tennen RI, Wang E, Artandi MK, Oro AE, Artandi SE. 2005. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 436:1048–1052
- Salpea KD, Talmud PJ, Cooper JA, Maubaret CG, Stephens JW, Abelak K, Humphries SE. 2010 Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis.* 209:42–50
- Shalev I, Moffitt TE, Sugden K, Williams B, *et al.* 2012. Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 Years of age: a longitudinal study. *Mol Psychiatr.*
- Shen J, Gammon MD, Terry MB, Wang Q, Bradshaw P, Teitelbaum SL, Santella RM. 2009. Telomere length, oxidative damage, antioxidants and breast cancer risk. *International Journal of Cancer.* 124:1637–1643.
- Sitte N, Saretzki G, von Zglinicki T. 1998. Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency *Free Radic. Biol. Med.*, 24;885–893.
- Stein GH., Beeson M, Gordon L. 1990. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescence human fibroblasts. *Science* 249: 666-669.
- Suárez-Álvarez K, Solís-Lozano L, Leon-Cabrera S, González-Chávez A, Gómez-Hernández G, Quiñones-Álvarez MS, *et al.* 2013. Serum IL-12 is increased in mexican obese subjects and associated with low-grade inflammation and obesity-related parameters. *Mediators Inflamm.* 2013:967067.
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K. 2002. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 37:523–531.
- Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, Vina J, Serrano M, Blasco MA. 2008. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135: 609–622.
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghunath G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. 2007. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:7552-7557.
- Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. 2005. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet.* 366:662–664.
- Van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. 2013. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med.* 71(4):174-87.
- Vasa-Nicotera M, Brouillette S, Mangino M. *et al.* 2005. Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 147–151.

- Vaziri H, Schachter F, Uchida I, Wei L, Zhu X, Effros R, Cohen D, Harley CB. 1993. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52:661–667.
- von Zglinicki T. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27:339–344.
- von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. 2005. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr. Mol. Med.* 5:197–203.
- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. 2001. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature.* 413: 432-435.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112(12):1796-808.
- Weng NP. 2001. Interplay between telomere length and telomerase in human leukocyte differentiation and aging. *Journal of Leukocyte Biology,* 70:861–867.
- World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Consultado el 12 de Abril de 2015.
- World Health Organization (WHO). 2002. Informe sobre la salud en el mundo 2002: Reducir los riesgos y promover una vida sana. Ginebra.
- World Health Organization (WHO). 2003. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra.
- Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Luo S, Hong WK, Spitz MR. 2003. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1211–1218.
- Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z. 2007. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 445, 559–562.
- Xu Q, Parks CG, DeRoo LA, Cawthon RM, Sandler DP, Chen H. 2009. Multivitamin use and telomere length in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1857–1863.
- Yang Z, Huang X, Jiang H, Zhang Y, Liu H, Qin C, Eisner GM, Jose PA, Jose P, Rudolph L, Ju Z. 2009. Short telomeres and prognosis of hypertension in a Chinese population. *Hypertension.* 53:639–645.
- Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, Yasuda M, Kume S, Morino K, et al. 2012. Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1):352-7.
- Zakian VA. 2012. Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Experimental Cell Research.* 318:1456–1460.
- Zanni GR, Wick JY. Telomeres: Unlocking the mystery of cell division and aging. 2011. *Consultant Pharmacist.* 26:78–90.
- Zannolli R, Mohn A, Buoni S, Pietrobelli A, Messina M, Chiarelli F, Miracco C. 2008. Telomere length and obesity. *Acta Paediatr.* 97:952–954.

- Zhang W, Ji W, Yang J, Yang L, Chen W, Zhuang Z. 2008. Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence. *Life Sci.* 83, 475–480.
- Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol.* Feb;11(2):136–40.
- Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation.* 105:804-9.